

UNIVERSITE DE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté de Technologie
Département de Génie des procédés

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Chimie Industrielle

APPORT DES BIOMARQUEURS ET DE LA MODELISATION
DANS LA SURVEILLANCE DES EAUX COTIERES PAR
L'UTILISATION DES BIOINTEGRATEURS DE
MICROPOLLUANTS.

Par

Abdellah MEKNACHI

Devant le jury composé de

O. BOURAS	Professeur, Université Saad Dahleb Blida 1	Président
M. BOULAHIDID	Professeur, ENSSMAL	Examineur
H. BELMESKINE	MCA, Université Saad Dahleb Blida 1	Examinatrice
S. FERHAT	Professeur, Université Yahia Fares, Médéa	Examinatrice
S. KOURDALI	Directeur de recherche, CNRDPA	Examineur
A. BADIS	Professeur, Université Saad Dahleb Blida 1	Directeur de thèse

Blida, 2024

ملخص:

تقييم تأثير الملوثات على الكائنات البحرية، خاصةً بلح البحر *Perna* و *Mytilus*، أمر بالغ الأهمية لفهم ديناميات النظم البيئية، لا سيما الساحلية. تهدف هذه الدراسة إلى المساهمة في دمج المؤشرات البيولوجية والنمذجة في رصد المياه الساحلية. على مدى فترة تعرض تمتد لـ 96 ساعة، ثبت أن إنزيم الكاتالاز (CAT) المضاد للأكسدة، والذي تم قياسه في بلح البحر، ذو أهمية كبيرة لتقييم سُمية العناصر النزرة المعدنية (Cu, Cd, Pb)، التي أظهرت تأثيرات تعتمد على نوع المعدن. وقد أبرز تواجد النحاس توزيعاً كيميائياً أوسع مقارنةً بـ Cd و Pb، مما يفسر سميته العالية. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت بلح البحر *Perna* حساسية أكبر للتلوث مقارنةً بـ *Mytilus*، كما أن الملوثات العضوية (الفينول والأصباغ) تظهر كل منها سُمية محددة. ويظل CAT حساساً وسريعاً، مما يوفر ميزة حاسمة لتقييم وفهم تأثيرات التلوث على حالة الأكسدة في الكائنات البحرية. كمؤشر بيولوجي للتوازن، كشف CAT عن فعالية إزالة السموم في بلح البحر، والتي تعتمد على تركيز ونوع الملوث، وكذلك على مدة إزالة السموم. عند دراسة تأثير التصريف الصناعي، تبين أن حالة الأكسدة في بلح البحر تعتمد على حجمها. البلح الصغير أكثر مقاومة، بينما الكبير يظهر آلية متضررة أو ضعيفة. كما لوحظ فرط النشاط لدى بلح البحر الصغير من كلا النوعين، *Mytilus* و *Perna*، بالإضافة إلى ذلك، يبدو أن تصريفات محطات تحلية المياه تشكل خطراً حقيقياً على المناطق الساحلية، نظراً لسميتها العالية مقارنةً بالتفريغات الصناعية والموانئ. تظهر استجابة بلح البحر للتصريفات الصناعية، مع زيادة في درجة الحرارة، حساسية المؤشرات البيولوجية SOD و CAT لشرح التأثير التآزري، مما يسلط الضوء على المخاطر التي تواجه النظم الطبيعية في ظل التغيرات المناخية العالمية. تم تقييم وتأكيد صلاحية استخدام الكائنات الحية البيولوجية كأدوات لقياس مستوى التلوث عبر برنامج مراقبة بيولوجي غير مباشر للمياه الساحلية في موقعي السفينة المحطمة والكرمة. إن الفهم الميكانيكي لاستجابات CAT والبروتينيز (Pase)، التي تمت دراستها في سلسلة مختلفة من الاختبارات في هذه الدراسة، سهل تفسير نتائج برنامج المراقبة البيولوجية لدينا. من الجدير بالذكر أيضاً أهمية النماذج الإحصائية لتحليل المتعدد المتغيرات، التي ساعدت في تحسين فهم الاستجابات البيولوجية وتفاعلها مع الجرعة ومدة التعرض. ولذلك، فإن دمج المؤشرات البيولوجية في شبكات المراقبة البيئية له أهمية كبيرة، بينما تلعب النمذجة دوراً حيوياً في وصف الجوانب الاستكشافية، مما يساعد في فهم الاستجابات البيولوجية للكائنات الحية المستخدمة كمؤشرات بيولوجية لمستوى تلوث المياه الساحلية.

كلمات مفتاحية: المؤشرات البيولوجية، الملوثات، الكاتالاز، *Perna* و *Mytilus*، المراقبة البيولوجية، النماذج الإحصائية.

Résumé :

L'évaluation des impacts des polluants sur les organismes marins, notamment les moules *Mytilus* et *Perna*, est cruciale pour comprendre la dynamique des écosystèmes, en particulier côtiers. Cette étude vise à contribuer à l'intégration des biomarqueurs et de la modélisation dans la surveillance des eaux côtières. Pour des durées d'exposition de 96 heures, l'enzyme antioxydante catalase (CAT), mesurée chez les moules, s'est avérée très pertinente pour évaluer la toxicité des éléments traces métalliques (Cu, Cd et Pb), qui ont montré des effets dépendant du métal. La spéciation du cuivre a mis en évidence une distribution plus large par rapport au Pb et Cd, expliquant sa plus forte toxicité. De plus, la moule *Perna* s'est révélée plus sensible à la contamination que la moule *Mytilus*. Les polluants organiques (phénol et colorants) présentent chacun une toxicité spécifique. La CAT se montre encore sensible et rapide, offrant un avantage crucial pour évaluer et comprendre les effets sur la perturbation du statut oxydatif des organismes marins. En tant que biomarqueur de l'homéostasie, la CAT a révélé l'efficacité de la détoxification des moules, celle-ci dépendant de la concentration et de la nature du contaminant, ainsi que de la durée de détoxification. En examinant l'effet d'un rejet industriel, il apparaît que le statut oxydatif des moules dépend de leur taille. Les jeunes moules sont plus résistantes, tandis que les grandes montrent un mécanisme réduit et/ou affaibli. L'hyperactivité est observée chez les petites moules des deux espèces, *Mytilus* et *Perna*. De plus, les rejets de la station de dessalement semblent poser un véritable danger, pour les zones côtières, en raison de leur toxicité élevée par rapport aux effluents industriels et portuaires. L'exposition des moules au rejet industriel, combinée à une augmentation de la température, démontre la sensibilité des biomarqueurs SOD et CAT à expliquer l'effet synergique, soulignant ainsi les risques pour les milieux naturels soumis aux changements globaux. L'applicabilité des biointégrateurs et de leurs réponses, traduites par les biomarqueurs, a été évaluée et validée en mettant en place un programme de biosurveillance passive des eaux côtières sur les sites de Bateau Cassé et Figuier. La compréhension mécanistique des réponses de la CAT et de la protéase (Pase), étudiées dans les différentes séries de tests de cette étude, a facilité l'interprétation des résultats de notre programme de biosurveillance. Il convient également de noter l'importance des modèles statistiques de régression multilinéaire, qui ont aidé à améliorer la compréhension des réponses biologiques et de leurs interactions avec la dose et la durée d'exposition. L'intégration des biomarqueurs dans les réseaux de surveillance environnementale est donc d'une grande pertinence, tandis que la modélisation joue un rôle crucial pour décrire les aspects exploratoires et prédictifs, aidant ainsi à comprendre les réponses biologiques des organismes utilisés comme bioindicateurs du niveau de contamination des eaux côtières.

Mots clés : biomarqueurs, polluants, catalase, *Mytilus* et *Perna*, biosurveillance passive, modèles statistiques.

Abstract :

Assessing the impacts of pollutants on marine organisms, such as *Mytilus* and *Perna* mussels, is essential for understanding the dynamics of coastal ecosystems. This study aims to advance the integration of biomarkers and modeling techniques in the monitoring of coastal waters. For exposure durations of 96 hours, the antioxidant enzyme catalase (CAT), measured in mussels, proved highly effective for evaluating the toxicity of trace metals (Cu, Cd, and Pb), which exhibited metal-dependent effects. Copper speciation, with a broader distribution compared to Pb and Cd, was found to be more toxic. Furthermore, *Perna* mussels demonstrated greater sensitivity to contamination than *Mytilus* mussels. Organic pollutants (phenol and dyes) showed specific toxic effects. CAT remained a sensitive and rapid indicator, crucial for assessing and understanding disruptions in the oxidative status of marine organisms. As a biomarker of homeostasis, CAT highlighted the efficiency of mussel detoxification, which varied based on the contaminant's concentration and nature, as well as the detoxification duration. The impact of industrial discharges revealed that the oxidative status of mussels is influenced by their size: young mussels were more resistant, while larger ones exhibited reduced or weakened mechanisms. Hyperactivity was noted in small mussels of both *Mytilus* and *Perna* species. Additionally, discharges from desalination plants presented a significant threat to coastal areas due to their higher toxicity compared to industrial and port effluents. The combined effect of industrial discharges and rising temperatures on mussels showed the sensitivity of superoxide dismutase SOD and CAT biomarkers to synergistic effects, emphasizing the risks posed to natural environments under global changes. The effectiveness of biointegrators and their responses, as indicated by biomarkers, was evaluated and validated through a passive biomonitoring program implemented at the Bateau Cassé and Figuier sites. The mechanistic understanding of CAT and protease (Pase) responses, explored through various test series, facilitated the interpretation of the biomonitoring results. Multilinear regression statistical models were instrumental in enhancing the understanding of biological responses and their interactions with dose and exposure duration. Integrating biomarkers into environmental monitoring networks is highly relevant, while modeling plays a critical role in exploring and predicting biological responses, thereby aiding in the assessment of contamination levels in coastal waters.

Keywords : biomarkers, pollutants, catalase, *Mytilus*, *Perna*, passive biomonitoring, statistical models.

REMERCIEMENT

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude en vers DIEU « Allah » pour sa clémence et pour m'avoir donné le courage, la volonté et surtout la santé pour réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Badis Abdelmalek, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir confié ce sujet de thèse. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez portée pendant ces longues années.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude aux membres du jury : Monsieur le Professeur Bouras Omar et Madame le Professeur Belmeskine Hayet de l'université de Blida, Monsieur le Professeur Boulahdid Mostefa de l'ENSSMAL-Alger, Madame le Professeur Ferhat Samira de l'université de Médéa, ainsi que Monsieur Kourdali Sid-Ali, directeur de recherche au CNRDPA-BouIsmaïl. Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de juger ce travail. J'espère que vous prendrez autant de plaisir à lire ce document que j'en ai eu à l'écrire.

Je suis très reconnaissant envers mes amis et collègues de travail : Benyahia Abdelwahab, Benathmen Yugurten, Zenati Bilal, Kourdali Sid-Ali, Dilmi Amar, Filali Tahar, Etsouri Mohamed, Menad Moussa et Bachouche Samir. Vous avez été essentiels à l'aboutissement de ce travail, et j'ai passé avec vous des moments formidables tant sur le plan scientifique qu'humain. Merci à vous tous. Vous m'avez fait confiance et m'avez permis d'avancer grâce à vos conseils et votre aide, me permettant ainsi de finaliser ce projet. Je vous remercie pour vos connaissances et pour le temps passé à m'aider dans mes expériences en laboratoire et lors des différentes campagnes de prélèvement des moules.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Mahraz Abdelkader, informaticien au CNRDPA, pour avoir récupéré les données perdues en raison de problèmes informatiques. Sans votre précieuse aide, ce travail n'aurait pas pu voir le jour. Merci infiniment. Veuillez trouver dans ce manuscrit toute ma reconnaissance. *Mille mercis, mon ami.*

Je tiens à exprimer ma gratitude toute particulière à Messieurs Djellali Mustafa et Annane Rachid, anciens directeurs du CNDPA, pour leurs qualités humaines et professionnelles exceptionnelles. Merci de m'avoir permis de réaliser mes travaux dans des conditions optimales. Je remercie également Monsieur Bouflih Nabil, directeur du CNRDPA, à qui j'adresse un remerciement spécial.

Je tiens à adresser un immense merci à tous les membres du laboratoire du CNRDPA, et plus particulièrement à Madame Benchamma Yasmine, Madame Bounakous Nabila et Monsieur Hazam Salah, pour m'avoir aidé à réaliser mes travaux dans les meilleures conditions possibles.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur Boudjenah Mustapha, directeur de la station expérimentale de conchyliculture du CNRDPA, et à Monsieur Mezian Noureddine, vétérinaire de la même station. Vous m'avez offert l'opportunité de réaliser ce travail, et les expériences de tests d'écotoxicité n'auraient pas pu voir le jour sans votre précieuse collaboration. Merci pour votre aide et votre soutien constants, avant et pendant la réalisation de ce projet.

Je veux également vous remercier, vous, le personnel que j'ai connu au CNRDPA pour vos caractères bien sympathiques et vos aides.

Je tiens à adresser une pensée particulière à mes stagiaires : Kritli Nabil, Raia Abderazek, Hammadat Chahrazed, Khrelifa Samir et Madame Benchamma Yasmine. Leur gentillesse, leur dynamisme, et leur aide précieuse ont marqué ce travail. Je suis particulièrement reconnaissant pour les moments de partage que nous avons vécus ensemble.

Je souhaite exprimer mes plus vifs remerciements à l'ensemble du département de chimie industrielle de l'Université de Blida, et tout particulièrement au Professeur Ouzen Slim, Professeur Boutoumi Hocine, Professeur Naceur Mohamed-Wahib ainsi qu'à M. Dahmouche Rachide, Zoubir, Morad et Mouloud.

Je tiens également à remercier mes amis et collègues du CRAPC, en particulier M. Aboumostafa Mohamed et M. Amraoui Rachid.

Et pour finir, bien que j'aurais pu commencer par eux, je suis extrêmement reconnaissant envers ma mère, mon père, ma femme et toute ma famille. Ils m'ont donné tous les éléments nécessaires pour arriver jusqu'ici. Ils sont ma force, ma confiance et ma richesse. Jamais je n'aurais réussi sans eux. Merci pour avoir toujours cru en moi, parfois même plus que moi-même, et pour m'avoir soutenu dans cette voie. Merci pour votre présence, vos encouragements, vos conseils et vos attentions constantes. Merci pour tout. J'espère pouvoir vous rendre le bonheur que vous m'avez toujours apporté. Je remercie tout particulièrement mon frère Mohamed pour ses bienfaits et pour l'aide qu'il m'a apportée lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, que ce soit par leur aide, leurs encouragements ou simplement leur amitié.

Je suis certain d'avoir oublié certains noms et je vous prie de bien vouloir m'en excuser.

DEDICACE

Je dédie cet humble travail :

- A mon père qui s'est sacrifié et privé pour me voir réussir ;
- A ma mère qui a veillé les nuits pour me voir grandir ;
- A mon épouse, source d'amour et de soutien, surtout dans les moments difficiles. Merci de m'avoir permis de vivre le bonheur des moments précieux avec nos filles Malak, Meriem, Rahma, et notre fils Abderrahmane ;
- A mes frères, chacun ayant contribué à ma réussite à sa manière : Mohamed, Djilali, Mustapha, Mokhtar, ainsi que notre unique sœur Fatma ;
- A ma grande famille ;
- A mes professeurs, qui n'ont épargné aucun effort pour me rendre dignes de ce Diplôme ;
- A mes amis d'enfance et à tous mes collègues.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	20
CHAPITRE I.....	23
LES POLLUANTS CHIMIQUES : PROPRIETES TOXICOLOGIQUES, BIOACCUMULATION ET TECHNIQUE DE BIOSURVEILLANCE	
I.1/- La pollution marine selon les organismes mondiaux	23
I.2/- La mer méditerranée et les changements globaux.....	23
I.3/- Les zones côtières.....	24
I.3.1/- Productivité et sensibilité des zones côtières.....	24
I.4/- Les principales sources de pollution.....	25
I.5/- Les polluants majeurs en Méditerranée	26
I.6/- Les contaminants métalliques et organiques dans l'environnement aquatique.....	26
I.6.1/- Les Métaux	26
I.6.1.1/- Le Cuivre « Cu »	28
I.6.1.2/- Le Cadmium « Cd »	30
I.6.1.3/- Le Plomb « Pb »	31
I.6.1.4/- Spéciation et biodisponibilité des métaux dans les écosystèmes aquatiques	33
I.6.1.5/- Processus physiologiques de bioaccumulation des métaux.....	34
I.6.1.6/- Mécanisme de capture des métaux	36
I.6.1.7/- Mécanisme d'excrétion des métaux	38
I.6.1.8/- Mécanisme de stockage des métaux.....	39
I.6.1.9/- Facteurs affectant la bioaccumulation des métaux.....	39
I.6.2/- polluants organiques	40
I.6.2.1/- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques : HAP.....	40
I.6.2.2/- Le Phénol.....	44
I.6.2.3/- Les colorants.....	45
I.7/- Rejets industriels	47
I.8/- Surveillance de la qualité de l'environnement	49
I.8.1/- La biosurveillance	50
CHAPITRE II.....	52
OUTILS D'EVALUATION EN ECOTOXICOLOGIE	
II.1/- Introduction	22
II.2/- Ecotoxicologie.....	53
II.2.1/- Tests écotoxicologiques	54
II.2.2/- Intérêt des bioessais.....	55
II.3/- Indicateurs biologiques (Bioindicateurs)	56
II.4/- Réponses à un stress au sein d'un système biologique	59

II.4.1/- Les biomarqueurs : notions et concepts	62
II.4.1.1/- Définition et intérêts biologiques	62
II.4.1.2/- Classification des biomarqueurs	64
II.4.1.3/- Qualités requises	65
II.5/- Etude du stress oxydant : Le système antioxydant cellulaire.....	66
II.5.1/- Les superoxydes dismutases (SOD).....	71
II.5.2/- La catalase (CAT)	71
II.5.1.3/- Les glutathion peroxydases (GPx)	72
II.6/- Perturbation du métabolisme énergétique.....	73
II.7/- Avantages et limites de l'utilisation des biomarqueurs.....	74
CHAPITRE III	77
MATERIEL ET METHODES : STRATEGIE EXPERIMENTALE, DISPOSITIFS ET METHODES ANALYTIQUES	
III.1/- Introduction.....	77
III.2/- Echantillonnage, transport et mise en adaptation des bivalves.....	78
III.3/- Effet du Cuivre (Cu ²⁺), Cadmium (Cd ²⁺) et Plomb (Pb ²⁺) : test courte durée.....	81
III.4/- Etude de l'effet des polluants organiques sur les réponses biologiques des espèces sentinelles : Cas du Phénol et des colorants chimiques (Vert de Malachite et Rouge Congo).84	
III.5/- Etude de l'effet des effluents réels sur les réponses biologiques des espèces sentinelles : Cas d'un rejet industriel (RI), d'effluent portuaire (HE) et d'un rejet de station de dessalement (DSE).....	85
III.6/- Etude de l'effet combiné de la contamination par un effluent industriel et de l'élévation de la température : simulation du réchauffement climatique,	87
III.7/- Utilisation de la biosurveillance passive des eaux côtières : cas de la baie d'Alger et de la baie de Zammouri.....	88
III.7.1/- Présentation de la zone de l'étude.....	89
III.9.2/- Prélèvement	91
III.9.2.1/-Prélèvement de l'eau de mer.....	91
III.9.2.2/- Prélèvement de moules	91
III.9.3/- Analyse physicochimique de l'eau de mer	92
III.10/- Méthodes analytiques	92
III.10.1/- Dosage des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	92
III.10.2/- Dosages biochimiques des biomarqueurs	93
III.10.2.1/- Dosages des protéines par la méthode de Lowry.....	94
III.10.2.2/- Dosages de la Catalase par mode Cinétique	95
III.10.2.3/- Dosages de la SOD (Méthode au pyrogallol)	95
III.10.2.4/- Dosage de la protéase	96
III.10.3/- Procédures des analyses des sels nutritifs (traitement au laboratoire).....	97

CHAPITRE IV	98
RESULTATS ET DISCUSSION	
IV.1/- Résultats préliminaires des analyses physico-chimiques et bactériologiques des moules et de leur eau d'élevage	98
IV.2/- Résultats du test d'écotoxicité, courte durée, par le cuivre	99
IV.2.1/- Paramètres d'élevage	99
IV.2.2/- Résultats du dosage de la catalase	101
IV.2.3/- Etude de l'effet du Cu sur le métabolisme d'excrétion azotée et phosphorée.....	106
IV.3/- Résultats du test d'écotoxicité, courte durée, par le plomb et le cadmium	112
IV.3.1/- Résultats du dosage de la catalase	112
IV.3.2/- Etude de l'effet du Pb et Cd sur le métabolisme d'excrétion azotée et phosphorée	118
IV.5/- Conclusion sur la première série d'expériences des tests courte durée de l'effet des ETM (Cu, Pb et Cd).	125
IV.6/- Etude de la spéciation des métaux testés	126
IV.7/- Résultats du test d'exposition chronique des moules <i>Mytilus</i> au cuivre	133
IV.7.1/- Mesure des paramètres physico-chimiques	133
IV.7.2/- Résultats des mesures biométriques	134
IV.7.3/- Résultats du dosage de la catalase (CAT).....	136
IV.7.4/- Résultats du dosage de la protéase	139
IV.8/- Modélisation des réponses biologiques (explicative, prédictive).....	149
IV.8.1/- Modélisation de la réponse CAT	151
IV.8.2/- Modélisation des réponses protéase P_{ase} et protéines Prot (modèles 1 ^{ier} degré)...	166
IV.8.3/- Comparaison des modèles : Modèle 1 ^{ier} degré (sans et avec interaction) et modèle 2 ^{ème} degré avec interaction	168
IV.8.4/- Introduction des réponses P_{ase} et Prot comme des variables explicatives.....	177
IV.9/- étude de l'effet des polluants organiques sur les moules <i>Mytilus</i> et <i>Perna</i>	182
IV.9.1/- Résultats du test d'exposition au phénol	182
IV.9.1.1/- Résultats des dosages biochimiques de la catalase.....	182
IV.9.1.2/- Résultats du dosage biochimique de la protéase.....	189
IV.9.1.3/- Résultats des dosages biochimiques des protéines	193
IV.9.2/- Résultats du test d'exposition aux colorants.....	205
IV.9.2.1/- Résultats du dosage de la catalase	205
IV.9.2.3/- Résultats du traitement global des réponses biochimiques.....	207
IV.10/- Résultats de l'étude de l'effet des effluents réels sur les réponses biologiques des espèces sentinelles : Cas d'un rejet industriel, d'effluent portuaire et d'un rejet d'une station de dessalement.....	211
IV.10.1/- Caractérisation des eaux de rejet industriel	211
IV.10.2/- Evolution de l'activité CAT durant le cycle de contamination	214

IV.10.3/- Evolution de la CAT durant le cycle de décontamination.....	218
IV.10.4/- Etude comparative entre les différents types de rejets (Moule <i>Mytilus</i> de taille moyenne).....	225
IV.11/- Etude de l'effet combiné de la contamination par le rejet industriel avec l'élévation de la température : Simulation du changement climatique	230
IV.11.1/- Résultats du dosage de la catalase	230
IV.11.2/- Résultats du dosage de la SOD	232
IV.12/- L'utilisation de l'approche passive pour la biosurveillance des eaux côtières : Cas de la baie d'Alger et de la baie de Zemmouri	237
IV.12.1/- Paramètres Hydrologiques.....	237
IV.12.2/- Résultats du suivi de l'azote ammoniacal.....	238
IV.12.3/- Résultats du suivi des nitrites	239
IV.12.4/- Résultats du suivi des phosphate	240
IV.12.5/- Résultats du suivi des matières en suspension MES	241
IV.12.6/- Résultats du dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP.....	242
IV.12.7/- Résultats des mesures biométriques de l'indice de condition	245
IV.12.8/- Variation de la Catalase CAT	247
IV.12.9/- Variation de l'activité de la Protéase.....	248
CONCLUSION GENERALE	262

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

ANNEXES

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : Les différents types de polluants et leurs effets biologiques	48
Tableau I.2 : Comparaison entre stratégies <i>in situ</i> /transplants	51
Tableau II.1 : Avantages des différents compartiments trophiques.	59
Tableau II.2 : Avantages et Inconvénients liés à l'utilisation de biomarqueurs.	76
Tableau IV.1 : L'analyse descriptive des données physicochimiques	100
Tableau IV.2 : matrice de corrélation (Le r de <i>Pearson</i>)	106
Tableau IV.3 : matrice de corrélation (p -values)	107
Tableau IV.4 : matrice de corrélation (p -values) ; test Pb et Cd	119
Tableau IV.5 : Matrice de corrélation (r de <i>Pearson</i>) test Pb et Cd	120
Tableau IV.6 : Etude de la spéciation du cuivre	127
Tableau IV.7 : Etude de la spéciation du plomb et du cadmium	128
Tableau IV.8 : Paramètres physicochimiques de l'eau d'élevage	133
Tableau IV.9 : Synthèse de la sélection des variables CAT	151
Tableau IV.10 : Analyse de la variance (pour CAT)	157
Tableau IV.11 : Analyse Type (I, III) Sum of Squares et Paramètres du modèle (CAT)	159
Tableau IV.12 : Résumé des méthodes statistiques <i>Stepwise</i> , <i>Ascendante</i> et <i>Descendante</i> .	164
Tableau IV.13 : Modélisation des réponses protéase P_{ase} et protéines Prot (modèles 1 ^{er} degré).	167
Tableau IV.14 : L'analyse de variance des approximations CAT	184
Tableau IV.15 : Analyse de la variance (CAT)	187
Tableau IV.16 : Paramètres du modèle (CAT)	187
Tableau IV.17 : Coefficients de la spline cubique	188
Tableau IV.18 : Analyse de la variance (P_{ase}) chez les moules <i>Perna</i> .	190
Tableau IV.19 : Paramètres du modèle (P_{ase}) chez la moule <i>Perna</i> .	190
Tableau IV.20 : Coefficients normalisés (P_{ase}) chez les moules <i>Perna</i> .	190
Tableau IV.21 : Synthèse pour tous les Y (les différents groupes de détox de <i>Mytilus</i>).	192
Tableau IV.22 : Synthèse pour tous les Y (les différents groupes de détox de <i>Perna</i>).	193
Tableau IV.23 : Analyse de la variance (Prot) chez les moules <i>Perna</i> .	193
Tableau IV.24 : Paramètres du modèle (Prot) chez la moule <i>Perna</i> .	193
Tableau IV.25 : Coefficients normalisés (Prot) chez les moules <i>Perna</i> .	193
Tableau IV.26 : Synthèse pour tous les Y (Prot) (les différents groupes de détox de <i>Mytilus</i>).	195
Tableau IV.27 : Synthèse pour tous les Y (Prot) (les différents groupes de détox de <i>Perna</i>).	196

Tableau IV.28 : Taux d'augmentation des réponse biochimiques	207
Tableau IV.29 : Paramètres physicochimiques de l'effluent industriel.	211
Tableau IV.30 : Paramètres physicochimiques mensuels pour les deux sites de prélèvement.	237
Tableau IV.31 : Pourcentage total en HAP dans les différentes localités de prélèvement	243
Tableau IV.32 : Matrice de corrélation de <i>Pearson</i> des variables de données.	250
Tableau IV.33 : Charges factorielles (<i>Factor loadings</i>) des variables de données.	251

LISTE DES FIGURES

Figure I.1: Cycle géochimique simplifié des métaux [75].	27
Figure I.2 : réactions d'échanges du métal M avec les constituants organiques et inorganiques du milieu.	33
Figure I.3 : Modèle conceptuel de certains processus physicochimiques importants menant à la prise d'un oligo-métal par micro-organisme aquatique	37
Figure I.4 : Schéma récapitulatif du modèle de l'ion libre (k_1 , k_2 , k_3 vitesses)	38
Figure I.5 : Métabolisme simplifié du B[a]P.	43
Figure I.6 : Voies d'activation métabolique du B[a]P.	43
Figure II.1 : Représentation graphique de l'ordre séquentiel des réponses à un stress au sein d'un système biologique.	61
Figure II.2 : Effets des métaux sur la génération cellulaire de ROS dans les algues et les activités enzymatiques antioxydantes (AEA).	68
Figure II.3 : Place des systèmes antioxydants dans la neutralisation des ROS (endogènes et exogènes) dans les cellules animales.	69
Figure II.4 : schéma général des dommages provoqués par les espèces réactives de l'oxygène sur les macromolécules.	70
Figure II.5 : Schéma représentant les réactions catalysées par les 3 principales enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT).	72
Figure III.1/- Les différentes localités d'échantillonnage de la présente étude.	79
Figure III.2 : Schéma du dispositif expérimental.	80
Figure III.3 : Planning expérimental des tests d'écotoxicité courte durée.	82
Figure III.4 : Planning expérimental du test chronique.	83
Figure III.5 : Planning expérimentale (Tests de polluants organiques).	84
Figure III.6 : Planning expérimentale (Test de RI).	86
Figure III.7 : Planning expérimental (Test HE et DES).	87
Figure III.8 : Planning expérimental des tests d'écotoxicité effet combiné (RI et T°C).	88
Figure III. 9 : illustration des moulières naturelles utilisées pour le programme de biosurveillance passive. S2 : site de Bateau cassé ; S2 : site de figuier.	90
Figure IV.1 : Variation des paramètres physicochimique de l'eau d'élevage	100
Figure IV.2 : Les variations CAT en fonction des concentrations en cuivre.	101
Figure IV.3 : Les variations CAT en fonction des concentrations en Pb et Cd.	112
Figure IV.4 : Représentation graphique radar des résultats tests coute durée.	125
Figure IV.5 : graphique de spéciation de cuivre (test courte durée).	127
Figure IV.6 : graphique de spéciation du plomb et du cadmium	128
Figure IV.6 : Evolution de l'indice de condition IC1 au cours de la période d'étude.	135
Figure IV.7 : Evolution de l'activité CAT durant la période d'étude.	137

Figure IV.8 : Evolution de l'activité protéase durant la période d'étude.	139
Figure IV.9 : représentation des graphiques résiduels pour la réponse CAT.	156
Figure IV.10 : Evolution des activités catalase (CAT) chez les moules <i>Mytilus</i> et <i>Perna</i> exposées au phénol	182
Figure IV.11 : Evolution de l'activité CAT, chez la moule <i>Mytilus</i> , durant le cycle de détoxification.	186
Figure IV.12 : Evolution de l'activité CAT, chez la moule <i>Perna</i> , durant le cycle de détoxification.	188
Figure IV.13 : Les variations Pase, mesurées chez les moules <i>Mytilus</i> , durant le cycle de décontamination.	191
Figure IV.14 : Les variations Pase, mesurées chez les moules <i>Perna</i> , durant le cycle de décontamination.	192
Figure IV.15 : Variations des teneurs en protéines (Prot), mesurées chez les moules <i>Mytilus</i> , durant le cycle de décontamination	195
Figure IV.16 : Variations des teneurs en protéines (Prot), mesurées chez les moules <i>Perna</i> , durant le cycle de décontamination	196
Figure IV.17 : Variation des activités catalase, sous l'effet des colorants RC (A) et VM (B).	205
Figure IV.18 : Variation de l'activité catalase chez la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> contaminé par les eaux du rejet industriel.	214
Figure IV.19 : Variation de l'activité catalase chez la moule <i>Perna pena</i> contaminé par les eaux du rejet industriel.	216
Figure IV.20 : Variation de l'activité catalase chez les moules <i>Mytilus</i> après le cycle de décontamination.	218
Figure IV.21 : Variation de l'activité catalase chez les moules <i>Perna</i> après le cycle de décontamination	220
Figure IV.22 : Variation de l'activité catalase chez les moules <i>Mytilus</i> jeune (classe de taille moyenne) sous l'effet des différents effluents.	225
Figure IV.23 : Variation de l'activité catalase chez la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> dans les deux groupes de test témoin et contaminé.	231
Figure IV.24 : Variation de l'activité SOD chez la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> dans les deux groupes de test témoin et contaminé.	232
Figure IV.25 : Variation mensuelle de la concentration en ammonium dans les deux sites.	239
Figure IV.26 : Variation mensuelle de la concentration en nitrites dans les deux sites.	240
Figure IV.27 : Variation mensuelle de la concentration des phosphates dans les deux sites.	241

Figure IV.28 : Variation des concentrations en MES en fonction du temps et du site de prélèvement.	242
Figure IV.28 : Variation de l'indice de condition.	246
Figure IV.29 : Variation spatiotemporelles de l'activité Catalase.	247
Figure IV.30 : Variation spatiotemporelle de l'activité de la protéase.	249
Figure IV.31 : Contribution des variables dans la formation des axes F1 et F2 en ACP.	251
Figure IV.32 : Présentation biplot des moulières naturelles prélevées à chaque moi et des variables influençant.	252

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIEA : Agence internationale de l'énergie atomique

ATP : Adénosine triphosphate

ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry

BioMar : Biological Markers of environmental contamination in marine ecosystem

BEEP : Biological Effects of Environmental Pollution in marine coastal ecosystems

BLM : Biotic ligand model

CAT : Catalase

CIEM : Conseil International pour l'Exploration de la Mer

CNRDPA : Centre national de recherche et de développement de la pêche et de l'aquaculture

COI : Commission océanographique intergouvernementale

EDTA : Ethylène-diamine tétra acétique

ETM : Eléments Traces Métalliques

FBC : Facteur de bioconcentration

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations

FIAM : Free Ion Activity Model, le modèle de l'ion libre

GESAMP : Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection

GP_x : Glutathion peroxydases

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

GST : Glutathion S transférase

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

IC : Indice de condition

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne

MARPOL : MARine POLLution : désigne la Convention internationale pour la prévention de la pollution marine par les navires

MDA : Malonedialdéhyde (dialdéhyde malonique)

MES : Matière en suspension

MEDPOL : Mediterranean Pollution, c'est la composante d'évaluation et de maîtrise de la pollution marine du PAM, qui est responsable du suivi des travaux liés à la mise en œuvre du Protocole "tellurique".

MLR : Multilinear regression

MT : Méthylthionéines

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)

OMI : Organisation Maritime Internationale

OMM : Organisation météorologique mondiale

OMS : Organisation mondiale de la Santé

ONU : Organisation des Nations unies

OSPAR : Oslo-Paris, la Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est

PAM : le Plan d'action pour la Méditerranée

PNUE : Programme des Nations Unies pour l'environnement

PCB : Polychlorobiphényles

PVC : Polyvinylchlorure

RC : Rouge Congo

ROS : Espèces réactives de l'oxygène ou « *reactive oxygen species* »

SOD : Superoxydes dismutases

TCA : Acide Trichloroacétique

Unesco : United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization

USEPA : United States Environmental Protection Agency

VM : Vert Malachite

INTRODUCTION

Depuis des siècles, les milieux côtiers, d'intérêt écologique et socio-économique, subissent une pollution croissante due à l'urbanisation, la démographie et les activités humaines [1-5]. La préservation des écosystèmes aquatiques soulève des questions clés sur le devenir des polluants et leurs impacts sur les communautés animales et végétales [6-8].

Face aux dangers de la pollution marine pour les organismes, la santé humaine et la qualité des eaux, des programmes de surveillance internationaux, notamment en Méditerranée, visent à estimer en continu le niveau de pollution pour prévenir les risques et protéger les écosystèmes [9-12].

Les programmes de surveillance environnementale s'appuient traditionnellement sur l'analyse des contaminants chimiques (HAP, PCB, métaux, pesticides) dans l'eau, les sédiments et les organismes. Cependant, cette approche est limitée par la diversité croissante des substances, souvent à des concentrations infimes, et par l'apparition de nombreuses substances émergentes dépassant les capacités des analyses classiques.

Par ailleurs, les techniques de prélèvement et de mesure des contaminants sont complexes et exposées à des risques de contamination, nécessitant l'utilisation de méthodes « ultra-propres ». Malgré cela, les techniques analytiques sophistiquées requises pour les mesures directes restent difficilement applicables à un réseau de suivi régulier. De plus, la variabilité temporelle du milieu littoral limite la représentativité des mesures ponctuelles. Cette approche ne permet ni d'évaluer précisément les risques pour les populations exposées, ni de prédire les effets biologiques des mélanges de contaminants ou la biodisponibilité des polluants. Cela laisse les gestionnaires sans informations suffisantes pour prioriser les actions nécessaires à la préservation des écosystèmes [6-8, 13-15]. De ce fait, d'autres voies ont été explorées aux moyens de bioindicateurs et/ou biointégrateurs, ou encore de bioessais écotoxicologiques réalisés sur des organismes vivants tels que les coquillages, les poissons et les végétaux [16-19].

D'autre part, les scientifiques et les organisations internationales de surveillance de la pollution marine recommandent l'utilisation de biomarqueurs en complément des analyses chimiques pour évaluer les contaminants et leur biodisponibilité dans les sédiments, l'eau et les organismes, ainsi que leurs effets sur les écosystèmes [4, 5, 16, 20-26]. Les biomarqueurs permettent d'étudier les effets des polluants mesurés par des méthodes chimiques conventionnelles sur les réponses biologiques des organismes, contribuant ainsi à une meilleure compréhension de l'action des polluants [6-8, 22, 23, 26].

Les moules, telles que *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna*, ainsi que d'autres bivalves marins, sont couramment utilisées comme sentinelles pour la biosurveillance des milieux côtiers en raison de leurs propriétés de bioindicateurs [1, 4, 10, 20, 27-32]. Le Centre National de Recherche et du Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) de Bou-Ismaïl, où nos expérimentations ont eu lieu, développe un programme de gestion des écosystèmes aquatiques et de surveillance environnementale pour identifier des indicateurs de pollution.

Dans la première partie de cette étude, nous avons réalisé des tests d'écotoxicité en utilisant divers contaminants chimiques et des effluents réels provenant de rejets directs en mer. La démarche adoptée se divise comme suit :

L'étude a examiné l'effet des éléments traces métalliques (ETM), essentiels et non essentiels, sur les bivalves *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna*. Les tests ont évalué, d'une part, l'effet à court terme du cuivre (Cu^{2+}), du cadmium (Cd^{2+}) et du plomb (Pb^{2+}), et, d'autre part, l'effet de l'exposition chronique au cuivre suivie d'un cycle de décontamination.

L'étude a également examiné l'effet des polluants organiques sur les réponses biologiques des espèces sentinelles, en se concentrant sur des substances telles que le phénol et les colorants chimiques (Vert de Malachite et Rouge Congo).

En outre, l'effet des effluents réels sur les réponses biologiques des espèces sentinelles a été étudié. Les cas spécifiques incluent un rejet industriel, un effluent portuaire et le rejet d'une station de dessalement.

La deuxième partie de notre travail se concentre sur une étude *in situ* avec pour objectif principal l'adoption de l'approche de biosurveillance passive. Ainsi, nous avons

procédé à la biosurveillance des eaux côtières, en particulier dans la baie d'Alger et la baie de Zemmouri (wilaya de Boumerdes).

L'objectif principal de ces travaux est de mieux comprendre les enjeux actuels de l'écotoxicologie, tant en laboratoire qu'en milieu naturel. Ce travail vise à contribuer à la recherche de biomarqueurs, qui peuvent fournir des indicateurs précoces de l'état des écosystèmes aquatiques et des phénomènes de bioaccumulation.

Ce manuscrit est structuré en quatre chapitres :

- **Chapitre I** : Offre une synthèse bibliographique sur les polluants chimiques, leurs propriétés toxicologiques, les mécanismes de bioaccumulation, et les techniques de biosurveillance environnementale ;
- **Chapitre II** : Présente les outils d'évaluation écotoxicologique, en mettant l'accent sur les biomarqueurs, et détaille ceux sélectionnés pour notre étude sur l'interaction entre les éléments stressants et les bioindicateurs ;
- **Chapitre III** : Explique les stratégies expérimentales adoptées en fonction des objectifs de ce travail, en présentant les dispositifs, le matériel, et les méthodes analytiques employés tout au long de l'étude ;
- **Chapitre IV** : Regroupe les résultats obtenus lors des différentes expérimentations, tant en laboratoire qu'en milieu naturel, avec leurs interprétations et discussions.

Une synthèse et une conclusion générale couronne le travail effectué.

CHAPITRE I

LES POLLUANTS CHIMIQUES : PROPRIETES TOXICOLOGIQUES, BIOACCUMULATION ET TECHNIQUE DE BIOSURVEILLANCE.

I.1/- La pollution marine selon les organismes mondiaux

Le terme pollution a été défini plus précisément pour la première fois à la Conférence des Nations Unies sur l'environnement de Stockholm en 1972, pour préserver et améliorer l'environnement. Cette définition sera reprise par le GESAMP (Groupe mixte d'experts OMI/FAO/Unesco=COI/OMM/OMS/AIEA/ONU/PNUE chargé d'étudier les aspects scientifiques de la protection de l'environnement marin) et adaptée au milieu marin par la Convention de Montego Bay (CMB) du droit de la mer du 10/12/1982 dans son premier article, et modifiée en 1983 pour dire que la pollution du milieu marin est : « *L'introduction directe ou indirecte, par l'homme de substances ou d'énergie dans le milieu marin, y compris les estuaires, lorsqu'elle a ou peut avoir des effets nuisibles tels que des dommages aux ressources biologiques et à la faune et à la flore marine, des risques pour la santé humaine, des entraves aux activités maritime, y compris la pêche et les autres utilisations légitimes de la mer, des altérations à la qualité de l'eau de mer du point de vue de son utilisation et des dégradations de valeurs d'agrément* »

Le législateur algérien n'a pas donné une définition de la pollution mais a interdit en les énumérant les actes qui peuvent être considérés comme constituant une pollution. Or, les mêmes éléments de cette définition sont retrouvés dans la loi 03-10 du 19 juillet 2003 relative à la protection de l'environnement dans le cadre du développement durable [33].

I.2/- La mer méditerranée et les changements globaux

Située entre l'Europe, l'Afrique et l'Asie, la mer Méditerranée est une mer semi fermée qui couvre 0.8% de l'océan mondial et renferme 10% de la biodiversité marine. Malgré sa superficie restreinte la mer méditerranéenne constitue un pôle économique mondial soumis à une surexploitation humaine. En effet, plusieurs plates-formes côtières d'exploitation pétrolières sont implantées en méditerranée, 30% des navires marchands du monde y circulent, s'ajoutant à ceci toutes les perturbations d'origine terrigène tels que la forte croissance de l'urbanisme littoral, les rejets domestiques et industriels contenant tous les types de polluants [34].

Cette formule s'applique à l'Algérie qui, à l'instar des pays du bassin méditerranéen, est confronté au problème crucial de la pollution de l'environnement marin [33].

La pollution marine et terrestre affecte les eaux côtières de la Méditerranée. Les sources situées à terre sont responsables de 80% de la pollution totale affectant la Méditerranée et des réponses ont été développées pour la réduire et l'éliminer dans toute la mesure du possible. Les effluents urbains et industriels, sont dans la plupart du temps les acteurs majeurs du déséquilibre écologique au niveau des écosystèmes côtiers [35]. Les principaux facteurs qui occasionnent des altérations de la biodiversité et une dégradation de la qualité des écosystèmes méditerranéens sont ; l'eutrophisation résultant de l'agriculture, le développement urbain, la pollution industrielle, la pêche et la surexploitation des ressources biologiques, et les invasions biologiques liées au trafic maritime et à l'aquaculture [33, 34].

1.3/- Les zones côtières

Les zones côtières, riches en ressources, offrent divers produits et services. À l'interface terre/mer, elles forment un système complexe de relations spatiales, économiques, sociales et environnementales, marqué par une forte interdépendance des activités et des ressources. Les défis croissants qu'elles affrontent nécessitent des décisions orientées vers un développement durable [35].

Les océans, qui couvrent 71 % de la surface terrestre, jouent un rôle central dans la régulation du climat et des cycles biogéochimiques [36]. Réservoirs majeurs de carbone, ils fournissent des ressources naturelles vitales et remplissent des fonctions essentielles, notamment le recyclage des nutriments, la purification de l'eau, la gestion des inondations, la recharge des eaux souterraines et l'hébergement de la faune. De plus, les écosystèmes aquatiques sont cruciaux pour les industries et le tourisme, particulièrement dans les régions côtières [37].

1.3.1/- Productivité et sensibilité des zones côtières

Les écosystèmes côtiers sont des systèmes complexes qui jouent un rôle écologique majeur et l'importance de leurs préservations a été mise en évidence par l'adoption de plusieurs conventions et projets internationaux entre autres : projets européens BioMar (Biological Markers of environmental contamination in marine ecosystem), BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution in marine coastal

ecosystems), organisations européennes CIEM (International Council for the exploration of the Sea), OSPAR (Oslo-Paris Convention), WFD (The European Water Framework Directive) etc.

Les zones côtières, riches en récifs, mangroves, zones humides et intertidales, sont essentielles à la reproduction, la croissance et l'alimentation de nombreuses espèces marines. Grâce à leurs caractéristiques uniques, comme les faibles profondeurs, la chaleur des eaux et la protection contre les prédateurs, elles servent de lieux de ponte et d'alevinage, favorisant la survie des jeunes stades marins [38-41].

La croissance démographique et l'industrialisation menacent gravement l'environnement et les ressources aquatiques [42]. Les zones côtières sont aussi affectées par divers facteurs abiotiques, tels que la température, l'oxygène et la salinité [43-45], et subissent des changements climatiques notables, exposant les organismes à de nombreux stress environnementaux. Un consensus scientifique confirme que les écosystèmes marins côtiers sont particulièrement vulnérables au changement climatique anthropique, notamment au réchauffement global [46-48].

L'augmentation de la température des eaux de surface provoque des perturbations majeures dans les zones côtières [48-50]. Les températures extrêmes, souvent mortelles, influencent la biologie marine à tous les niveaux, de la physiologie aux interactions trophiques et à la biodiversité [51, 52]. Elles affectent également la reproduction, le développement des gamètes et le développement larvaire des invertébrés marins [48, 53-57].

1.4/- Les principales sources de pollution

Entre 1950 et 2019, la population des pays méditerranéens a plus que doublé [58], entraînant une pollution accrue par la décharge de déchets solides, notamment ménagers et plastiques, dans la mer. Cette pollution dégrade la frange côtière et la vie aquatique. La production moyenne de déchets solides atteint 254 kg par personne, avec un taux d'augmentation annuel de 2 à 3 % [34, 59].

Selon le programme MED POL/PAM, 30 à 40 millions de tonnes de déchets solides municipaux se déversent chaque année en Méditerranée, dont 30 à 50% proviendraient de décharges illégales.

La Méditerranée, supportant 30% du commerce maritime mondial et 22% du trafic pétrolier, subit une pollution chronique due aux rejets intentionnels ou accidentels d'hydrocarbures, malgré les interdictions de la Convention MARPOL 73/78 [59-61]. Bien que la pollution maritime soit moindre que celle d'origine terrestre, elle reste un risque majeur en raison de la nature des produits transportés et du danger d'accidents pétroliers dans cette mer semi-fermée.

1.5/- Les polluants majeurs en Méditerranée

Le faible échange d'eau rend la Méditerranée vulnérable à l'accumulation de polluants. L'industrie, l'agriculture et l'urbanisation des villes côtières génèrent une pollution persistante, posant un problème écologique majeur dans la région. Les produits chimiques utilisés dans les plastiques, pesticides, engrais, solvants et molécules pharmaceutiques menacent gravement cet écosystème [59, 62]. Ces substances chimiques toxiques sont rejetées dans l'environnement soit directement lorsqu'elles sont utilisées par l'homme, c'est le cas des pesticides, des fertilisants et des différents solvants, soit indirectement sous forme de déchets industriels provenant de diverses activités comme l'extraction minière, la fabrication industrielle, l'incinération, la consommation de carburants ou les rejets accidentels [34].

1.6/- Les contaminants métalliques et organiques dans l' environnement aquatique

1.6.1/- Les Métaux

Présents naturellement dans les sols, océans et roches, les métaux deviennent toxiques lorsqu'ils sont libérés dans l'environnement, avec des impacts significatifs sur les écosystèmes [63-65]. Ils se trouvent sous forme de minerais associés à des éléments comme l'oxygène et le soufre, et sont aussi présents dans les roches, les eaux et les poussières atmosphériques. Les volcans et les incendies de forêt constituent d'importantes sources naturelles de métaux [66, 67].

Les métaux sont utilisés depuis l'Antiquité pour diverses applications : plomb dans les carburants, sels d'argent en photographie, nickel et cadmium dans les batteries, zinc pour les gouttières, chrome dans les aciers inoxydables, cuivre en électricité et arsenic dans les phytosanitaires. Ces usages engendrent des rejets dans l'environnement, dans les eaux ou l'atmosphère, où ils se dispersent via les aérosols avant de se déposer sur terre ou en mer [14, 67, 68].

Les métaux traces, présents dans tous les compartiments de l'environnement (fig. I.1), contribuent à la dégradation des écosystèmes aquatiques et de leur biodiversité [69, 70]. Leur pollution entraîne des impacts sanitaires (eau, poissons) [71], écologiques (dégradation biologique) [72], industriels (qualité des eaux) et agricoles (sols, cultures, bétail), avec des répercussions socio-économiques [73].

Des métaux comme le fer, le cuivre et le zinc sont essentiels aux organismes vivants, mais deviennent toxiques à haute concentration. D'autres, comme le mercure, le plomb et le cadmium, sont toxiques même à faibles concentrations [67, 74]. Dans l'hydrosphère, les métaux traces contaminent l'eau, les sédiments et les organismes, ces compartiments étant interdépendants. Leur spéciation chimique dépend des facteurs physico-chimiques du milieu (température, pH, matière organique etc.) et des propriétés des métaux [68, 74].

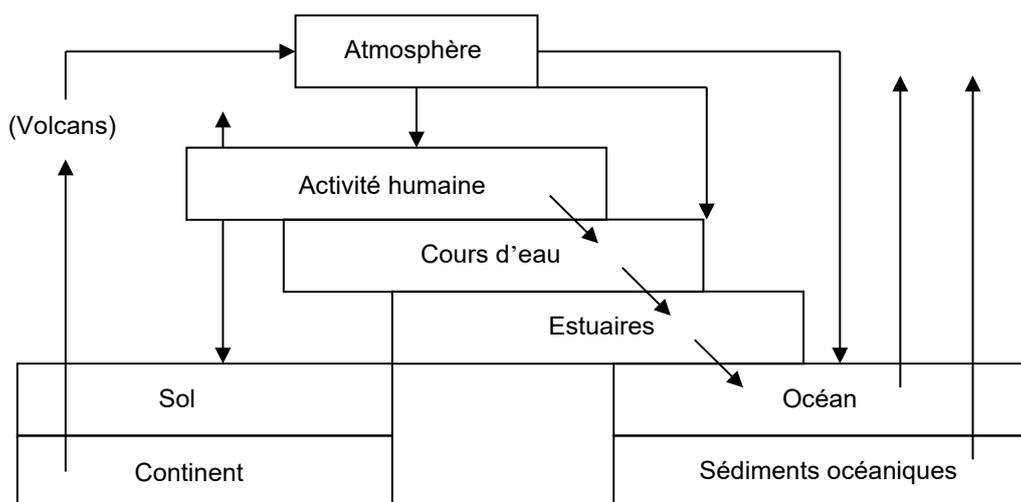


Figure I.1: Cycle géochimique simplifié des métaux [75].

L'activité humaine n'a pas modifié les volumes de métaux traces, mais leur flux vers l'hydrosphère et l'atmosphère dépasse souvent le flux naturel. Cela altère leur répartition, leur spéciation chimique et leurs concentrations, en introduisant de nouveaux modes de dispersion tels que fumées, égouts et véhicules [75, 76].

Nous présenterons ci-après, les métaux sélectionnés pour notre étude.

I.6.1.1/- Le Cuivre « Cu »

A/- Cycle et sources naturelles et anthropiques

Le cuivre, ubiquitaire dans l'environnement, est présent dans l'écorce terrestre à une concentration d'environ 70 ppm [14]. Ses principales sources naturelles incluent les poussières de sol, les éruptions volcaniques, les décompositions végétales, les feux de forêt et les aérosols marins [77]. Les activités anthropiques influencent fortement son cycle biogéochimique, générant des flux équivalents ou supérieurs aux flux naturels. Les principales sources anthropiques sont :

- L'industrie du cuivre et des métaux en général ;
- L'industrie du bois ;
- L'incinération des ordures ménagères ;
- La combustion de charbon, d'huile et d'essence ;
- La fabrication de fertilisants (phosphate).

Le sol est le principal récepteur du cuivre libéré dans l'environnement, avec 97 % contre 3% pour les eaux et 0,04% pour l'air [78]. La contamination des sols provient principalement des scories d'extraction de cuivre, ainsi que des boues des usines de traitement des eaux usées, de la galvanoplastie, de l'industrie du fer et de l'acier, et des déchets non recyclés [78, 79]. Dans les eaux, le cuivre provient majoritairement de l'érosion des sols (68%), du sulfate de cuivre (13%), et des rejets d'eaux usées [14]. Dans l'air, la principale source est le vent soulevant les poussières de sol, suivie des volcans, de la décomposition végétale, des feux de forêt et des aérosols marins [79].

B/- Propriétés biologiques et toxicité

Le cuivre est essentiel chez l'homme et l'animal, participant à la formation d'hémoglobine, à la maturation des polynucléaires neutrophiles, et agissant comme cofacteur pour de nombreuses enzymes et métalloprotéines [76, 80, 81].

Le cuivre est le troisième métal le plus abondant dans l'organisme humain, après le fer et le zinc. Son absorption se fait principalement par voie orale et gastro-intestinale [80, 82, 83]. Il se distribue largement via le sang, associé à des protéines comme la céruloplasmine (80-90%), l'albumine et divers acides aminés [80, 85]. Les concentrations les plus élevées sont dans le foie, les muscles et la moelle osseuse.

Le foie est le principal organe cible, avec des taux physiologiques de 18 à 45 mg/g de matière sèche. La demi-vie du cuivre dans le sang est de 13 à 33 jours, et les valeurs physiologiques dans le sérum sont de 800 à 1200 µg/L, plus élevées de 10% chez la femme [79, 80]. Le cuivre est associé à de nombreuses enzymes, dont la cytochrome oxydase, la superoxyde dismutase et la lysyl oxydase [86].

La cytotoxicité du cuivre, lors d'intoxications, résulte de l'inhibition enzymatique du système pyruvate-oxydase, par compétition avec les groupements sulfhydryles des protéines. Les enzymes glucose-6-phospho-deshydrogénase et glutathion-réductase sont inhibées proportionnellement à la concentration intracellulaire de cuivre [79]. L'excès de cuivre génère des radicaux libres, entraînant des lésions de l'ADN et des organites tels que les mitochondries et les lysosomes [80]. La principale voie d'élimination du cuivre est la bile (80% du cuivre hépatique), avec excrétion fécale (72%) et urinaire très faible (0,5-3%) [80, 85, 86]. Les intoxications par l'eau de boisson, à des doses élevées (35-200 mg/L), provoquent vomissements, léthargie, anémie, rhabdomyolyse, cytolyse hépatique, insuffisance rénale aiguë et syndrome dysentérique, parfois avec hémorragies digestives [79].

La toxicité du cuivre pour les organismes aquatiques est globalement basée sur ses interactions avec les protéines, enzymes, acides nucléiques et métabolites, de la paroi cellulaire, de la membrane et dans le cytoplasme. Le métal toxique ou biodisponible est transporté de la solution vers le cytoplasme, à travers la membrane. Ceci dépend de l'affinité du métal pour les ligands de la solution et le récepteur membranaire, ou de la répartition solution-membrane pour un complexe lipophile [87, 88].

Pour les poissons, le cuivre pénètre principalement par les voies respiratoires et digestives. L'incorporation dans les cellules suit les mêmes principes que pour un organisme unicellulaire : adsorption à la surface, puis transport à travers la membrane. Toutefois, les conditions des cellules branchiales (contact direct avec l'eau) et épithéliales (milieu gastrique) diffèrent, et les changements de spéciation du cuivre dans l'appareil digestif (pH, désorption des particules) doivent être considérés [89].

La toxicité du cuivre dépend de sa forme chimique et de son état d'oxydation. Les caractéristiques physico-chimiques du milieu influencent la toxicité, le cuivre complexé étant moins toxique que le cuivre ionique [14, 90, 91].

I.6.1.2/- Le Cadmium « Cd »

A/- Cycle et sources naturelles et anthropiques

Le cadmium, présent comme impureté dans divers minerais, est extrait des minerais de Zn et de Pb sous forme de sulfures. Il est rejeté dans l'atmosphère par des sources naturelles et anthropiques, telles que l'érosion, les éruptions volcaniques, et des activités industrielles comme le raffinage des métaux non ferreux, la combustion de charbon, l'incinération des ordures ménagères et la métallurgie de l'acier [92-94]. Il provient également des automobiles et de l'incinération de batteries au nickel-cadmium [81]. Dans l'air, il est sous forme particulaire, principalement sous forme d'oxyde de cadmium. En milieu aquatique, il provient de l'érosion, du lessivage des sols, des décharges industrielles et du traitement des effluents, et se transporte sous forme de cations ou de complexes [93].

B/- Propriétés biologiques et toxicité

Contrairement à de nombreux métaux, le cadmium n'a aucun rôle métabolique connu et ne semble pas biologiquement essentiel ou bénéfique au métabolisme des êtres vivants [95, 96].

Les principales sources d'exposition au cadmium pour la population générale sont l'alimentation et le tabagisme. Il est présent dans les fruits de mer, les abats, certaines céréales, les champignons et légumes, et, dans une moindre mesure, dans le poisson, les fruits et la viande [94]. Le cadmium pénètre principalement par voie respiratoire (50% absorbé), et, de manière accessoire, par voie digestive (3 à 7%) [81]. L'absorption peut augmenter en cas de carence en calcium, fer, zinc, cuivre ou protéines [81, 94]. Le cadmium se fixe dans le sang aux métallothionéines et est stocké dans les reins et le foie, où il peut causer des lésions rénales et augmenter le risque d'ostéoporose [92, 94]. Sa demi-vie biologique varie de 10 à 30 ans, avec une excrétion principalement fécale et partiellement urinaire [81, 92, 94, 97]. Le cadmium peut contribuer à l'hypertension et au risque de cancers rénaux, prostatiques et pulmonaires, surtout chez les groupes à risque comme les personnes âgées, les diabétiques et les fumeurs, et pourrait affecter davantage les femmes [81, 94, 98, 99].

Les concentrations de cadmium dans les organismes aquatiques dépendent de facteurs tels que la teneur en cadmium de l'eau, la position trophique de l'organisme et les formes chimiques de cadmium.

Les algues sont moins sensibles que les organismes des niveaux trophiques supérieurs, car l'introduction du cadmium se fait principalement par l'eau. Les crustacés tolèrent des concentrations entre 5 et 10µg Cd/L, tandis que les mollusques montrent des effets similaires. Chez *Mytilus galloprovincialis*, de fortes concentrations de cadmium augmentent l'activité de l'anhydrase carbonique. Chez les poissons, à 5µg/L, des effets sur le développement sont observés, et à des concentrations plus élevées, une mortalité, une inhibition enzymatique et une inhibition de la régénération des nageoires surviennent [100-102].

I.6.1.3/- Le Plomb « Pb »

A/- Cycle et sources naturelles et anthropiques

Les émissions de plomb provenant de poussières volcaniques sont mineures, tandis que les rejets atmosphériques sont principalement anthropiques [14]. L'atmosphère est le principal vecteur du plomb vers l'océan [103]. Des études sur les glaces de l'Antarctique montrent que plus de 99% du plomb dans la troposphère de l'hémisphère nord est d'origine humaine, notamment dû à l'ajout de composés alkylés dans les essences. Les rapports des isotopes stables du plomb indiquent que les émissions industrielles surpassent largement les émissions naturelles [103, 104].

Dans les temps préhistoriques, le principal apport de plomb à l'océan était fluvial, mais aujourd'hui, il provient principalement de l'atmosphère, surtout à cause de la combustion des carburants automobiles [14, 15, 103]. Plus de 90% des apports de plomb à l'océan viennent des retombées atmosphériques, les apports fluviaux étant désormais secondaires, bien qu'ils restent importants dans les zones littorales et péricontinentales [103].

Dans l'eau de mer, le plomb se présente sous formes dissoute et particulaire, principalement d'origine anthropique (émissions automobiles, pluies). Les formes solubles permettent une rapide incorporation dans les cycles biologiques, notamment via l'adsorption sur le phytoplancton. Bien que le plomb soit souvent lié aux particules sédimentaires, il peut être remis en solution lors de la dégradation aérobie de la matière organique ou par dissolution des oxydes de fer et de manganèse dans les sédiments [14, 15, 103]. En dépit d'une certaine mobilité du plomb constatée dans les sédiments, il est possible d'utiliser les sédiments comme enregistreurs de la chronologie de la contamination.

B/- Propriétés biologiques et toxicité

Le plomb est l'un des premiers métaux utilisés par l'homme, et sa toxicité est reconnue depuis longtemps [105]. La toxicité des composés minéraux du plomb dépend de leur hydrosolubilité. Par ordre décroissant de toxicité (du plus soluble au moins soluble), on trouve : le nitrate, le chlorure, l'acétate basique, le minium, le carbonate, le sulfure et le phosphate. L'acétate basique a causé de nombreux accidents aigus, souvent mortels. Bien que l'hydrocarbonate (céruse) soit insoluble dans l'eau, il peut être partiellement solubilisé par l'acide chlorhydrique gastrique, entraînant de graves intoxications, particulièrement chez les enfants. Le plomb est plus toxique lorsqu'il est ingéré avec l'eau de boisson que lorsqu'il est présent dans les aliments, ce qui explique la gravité des intoxications saturnines d'origine hydrique [81].

Le plomb pénètre principalement par voie digestive et pulmonaire. En milieu professionnel, l'inhalation de particules est courante, avec une rétention respiratoire de 30 à 50%, selon la granulométrie. Chez la population générale, il est ingéré par les aliments et l'eau de boisson provenant de canalisations en plomb [105]. Transporté par le sang, il se fixe dans divers tissus, notamment dans les os, où il est stocké à hauteur de 80 à 90% du plomb total. Sa demi-vie est de 30 jours dans les tissus mous et le sang, mais de 1 an dans l'os trabéculaire et de 10 à 20 ans dans l'os compact. Chez les femmes enceintes, il peut être mobilisé du squelette, traverser la barrière placentaire et contaminer le fœtus. Le plomb est éliminé principalement par les urines (75%) et dans une moindre mesure par les fèces (15-20%) [105, 106]. Il affecte la respiration, la croissance, la reproduction, le développement et le comportement des organismes aquatiques, en interférant avec les métaux essentiels et en inhibant des enzymes clés dans la biosynthèse de l'hème, la peroxydation des lipides, et les processus médiés par le calcium.

Le plomb tétra-éthyle, bien que peu stable dans l'eau de mer, peut être rapidement absorbé par les organismes. Des effets sur la croissance du phytoplancton ont été observés dès 0,5µg/L. Les invertébrés marins embryonnaires sont plus sensibles que les adultes. La concentration inhibitrice du développement embryonnaire de *Mytilus galloprovincialis* est d'environ 500µg/L, avec un grand nombre de larves anormales à cette concentration. Chez *Mytilus edulis*, à 0,1mg/L de plomb, le métabolisme d'autres métaux divalents (calcium, magnésium, cuivre) est perturbé [14, 15, 107, 108].

I.6.1.4/- Spéciation et biodisponibilité des métaux dans les écosystèmes aquatiques

Dans les systèmes environnementaux comme les sols ou l'eau, les métaux traces peuvent exister sous des formes chimiques variées (espèces) : libre, complexé avec un ligand « simple » organique ou inorganique, complexé avec un ligand colloïdal ou macromoléculaire, adsorbé ou incorporé à des particules en suspension, adsorbé ou assimilé par un organisme vivant (ligand biotique) (fig I.2). La répartition quantifiée du métal entre ces différentes formes physico-chimique définit sa spéciation. Cette spéciation conditionne son devenir et son transfert dans le milieu, ainsi que sa biodisponibilité et sa toxicité dans l'environnement [26, 109, 110].

Les transformations entre différentes espèces métalliques impliquent souvent des réactions de complexation (formation ou bris de liaisons coordonnées faibles) ou des réactions d'oxydation/réduction. Contrairement à la situation avec les contaminants organiques, ces réactions sont normalement réversibles, ce qui veut dire que la spéciation d'un métal est largement déterminée par la chimie du milieu dans lequel il se trouve (plutôt que par sa forme initiale, lorsque rejeté dans le milieu récepteur).

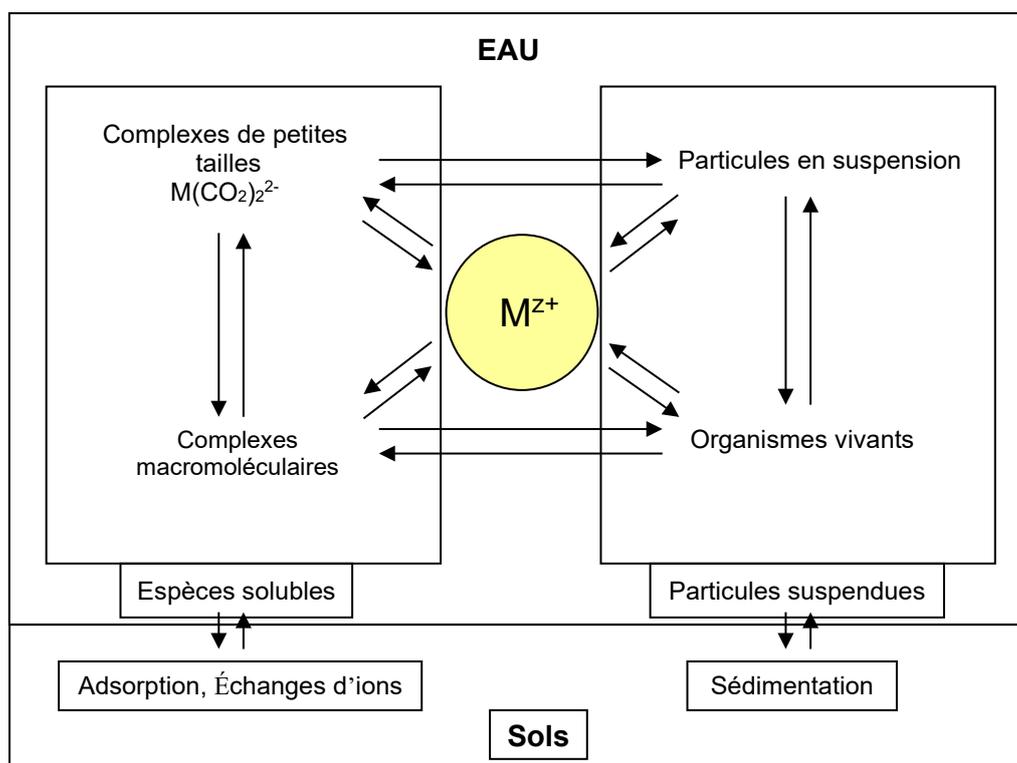


Figure I.2 : réactions d'échanges du métal **M** avec les constituants organiques et inorganiques du milieu.

La notion de spéciation existe aussi pour les contaminants organiques, mais dans ce cas, on parle d'une spéciation moléculaire (liaisons covalentes). La spéciation d'un contaminant organique est alors moins influencée par le milieu dans lequel il se trouve et davantage affectée par sa forme originale au moment où il entre dans le milieu récepteur [111].

Il a été montré que la toxicité d'un métal trace est dépendante de sa spéciation et que le métal ionique libre (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , etc.) est une des formes les plus réactives, avec les espèces neutres, puisque plus facilement assimilables par les organismes vivants [112-114].

La complexation des métaux est influencée par des paramètres physico-chimiques tels que le pH, le potentiel d'oxydoréduction et la capacité complexante (quantité de ligands disponibles), qui modifient leur spéciation et leur assimilation par les organismes [13, 109, 115]. Les concentrations métalliques totales sont souvent de mauvais indicateurs des effets sur les organismes aquatiques. Pour agir, les métaux doivent être sous une forme chimique biodisponible, capable d'atteindre les cibles biologiques [115].

La biodisponibilité des métaux est définie comme leur capacité à être assimilés par les organismes, certains y incluant leur potentiel à induire un effet [13]. Des outils comme le modèle de l'ion libre (FIAM "*Free Ion Activity Model*") et le modèle du ligand biologique (BLM "*Biotic Ligand Model*") ont été développés pour prédire la spéciation des métaux dans l'environnement et établir un lien avec leur biodisponibilité pour les organismes aquatiques [13, 115].

1.6.1.5/- Processus physiologiques de bioaccumulation des métaux

A/- Définitions

La bioaccumulation est le processus par lequel un organisme vivant absorbe une substance à une vitesse plus grande que celle avec laquelle il l'excrète ou la métabolise. Les micropolluants s'accumulent dans les organismes aquatiques à travers différents mécanismes : via l'absorption directe de l'eau par les branchies ou la peau (bioconcentration), via l'absorption de particules en suspension (ingestion) et via la consommation d'aliments contaminés (bioamplification) [14, 26, 116-119].

L'accumulation des substances chimiques dans les organismes dépend de plusieurs mécanismes :

- La bioconcentration, cas particulier de la bioaccumulation, désigne le processus par lequel une substance atteint une concentration dans un organisme vivant supérieure à celle de son milieu. Elle correspond à l'accumulation directe d'un contaminant de l'eau vers un organisme aquatique. Le facteur de bioconcentration (FBC) est une constante définie par le rapport entre la concentration d'un élément dans un organisme à l'équilibre et celle dans le milieu environnant [14, 26, 116, 120-122].
- La bioamplification est le processus par lequel un prédateur accumule une substance à un niveau supérieur à celui présent dans sa proie. La bioaccumulation résulte de la balance entre capture, stockage et excrétion d'une substance, liée à une exposition à l'eau, la nourriture, les sédiments ou l'air. Elle dépend de la quantité de métal absorbée à travers les barrières biologiques par rapport à celle excrétée. Les processus de pénétration, stockage dans les organes cibles et élimination sont influencés par les facteurs abiotiques, la nature du contaminant et les caractéristiques physiologiques et biochimiques de l'espèce [14, 26, 117, 118, 121].
- L'accumulation d'une substance dans un organisme va également dépendre de sa capacité à la métaboliser et à l'éliminer. C'est ce qu'on appelle la biotransformation qui peut réduire la toxicité d'une substance en l'éliminant ou au contraire l'augmenter en la métabolisant sous forme active [26, 116, 123, 124].

La bioaccumulation d'un composé dans un organisme est typique de ce composé, du milieu aquatique dans lequel il se trouve et de l'organisme ciblé. Même en l'absence de toxicité aiguë ou chronique avérée, la bioaccumulation d'une substance est un résultat en soit car certains effets ne sont mesurables qu'à un stade plus tardif ou bien se manifestent aux générations suivantes ou à un stade un plus haut de la chaîne alimentaire [26].

I.6.1.6/- Mécanisme de capture des métaux

Dans le milieu naturel, les organismes sont soumis à différentes sources de métaux, qui sont le milieu aqueux et l'alimentation qui comprend une source végétale ou animale selon le régime alimentaire, mais également des débris organiques présents dans les matières en suspension pour les organismes filtreurs, ainsi que dans le sédiment pour les dépositores [125, 126].

Pendant tout processus physiologique d'échange avec le milieu environnant, les molécules exogènes pénètrent à travers les barrières biologiques séparant l'environnement interne de l'organisme du milieu externe. Quand la contamination se fait, ces barrières (cutanées et respiratoires pour la contamination directe, et intestinale pour la contamination trophique) montrent des propriétés biologiques liées à leur structure et aux conditions physico-chimiques de l'environnement (température, pH, électrolytes, etc.). La membrane plasmique est la structure primaire impliquée dans ces processus [14].

A/- Capture des métaux en solution

La capture, par la surface perméable, de beaucoup de métaux traces en solution se fait généralement par diffusion passive ne requérant aucune dépense d'énergie [14, 19, 116]. Ainsi, les complexes métalliques liposolubles et les formes ioniques ou faiblement complexées sont considérées comme les plus biodisponibles [125]. La diffusion passive peut être facilitée (diffusion par gradients de concentration, déplacement dans un champ électrique, présence de solvants, transport par canaux spécifiques aux cations essentiels) en utilisant des protéines de transports associées à la membrane (les différents processus sont semblables à ceux rencontrés chez les microorganismes unicellulaire) (fig I.3) [7, 14, 19].

La concentration de l'ion libre métallique a une grande importance dans le contrôle de la capture métallique à partir des solutions. Le métal sous forme d'ion libre a été proposé comme l'espèce métallique dissoute la plus biodisponible [112-114].

Ainsi, le transport des ions métalliques passerait par la voie d'un canal protéique non spécifique sur la membrane cellulaire (fig I.3). Une fois dans la cellule, le métal sera capté par un autre ligand afin de prévenir sa diffusion vers l'extérieur.

Ces différents ligands constituent un système de « piégeage cinétique » dont l'efficacité dépend de l'importance de leur synthèse et de la force de liaison avec le métal.

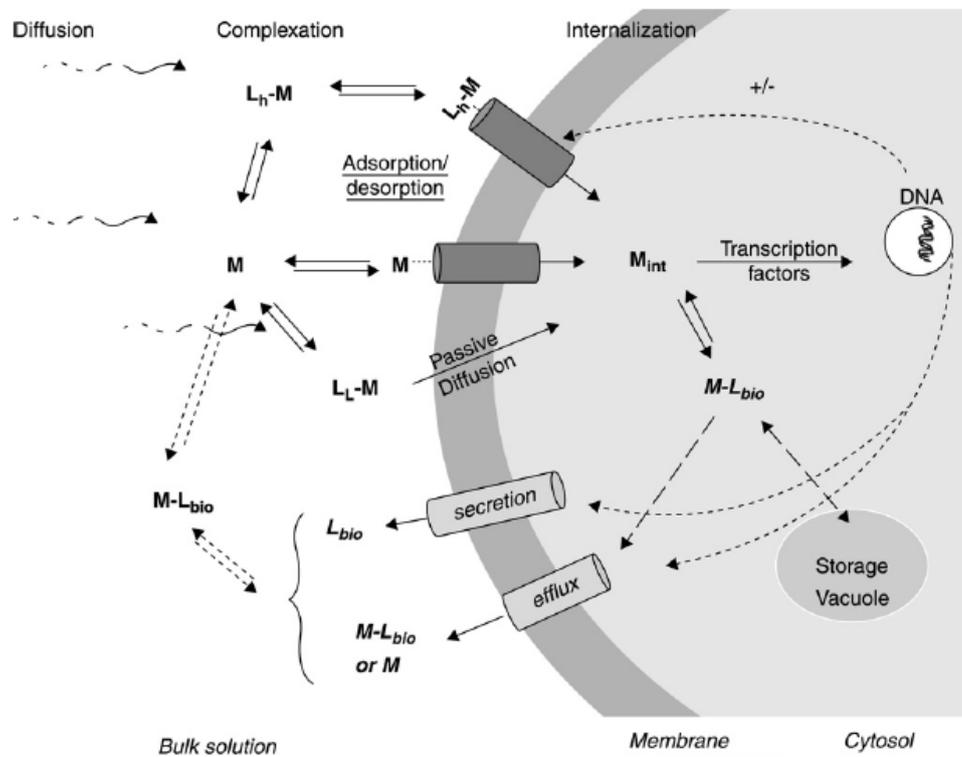


Figure I.3 : Modèle conceptuel de certains processus physicochimiques importants menant à la prise d'un oligo-métal par micro-organisme aquatique (L: ligand ; M:métal) (Indices inférieurs L : lipophile ; h : hydrophile ; bio : biologique ; int : internalisé) [127].

Le transport dans la cellule et dans les organes de stockage se fait par déplacement, par affinités successives (jusqu'au puits cinétique ou jusqu'à l'excrétion). La vitesse d'assimilation sera fonction de la réaction la plus lente (réaction limitante), qui est souvent le transfert intracellulaire.

Ainsi, le modèle de l'ion libre (FIAM) traduit l'interaction d'un métal (M^{Z+}) chez un organisme en trois étapes successives : advection/diffusion du métal à l'équilibre dans la solution « baignant » l'interface entre la membrane biologique et le milieu d'exposition (1), réaction de complexation avec un site de surface (2), transport à travers la membrane (3) (fig I.4) [14].

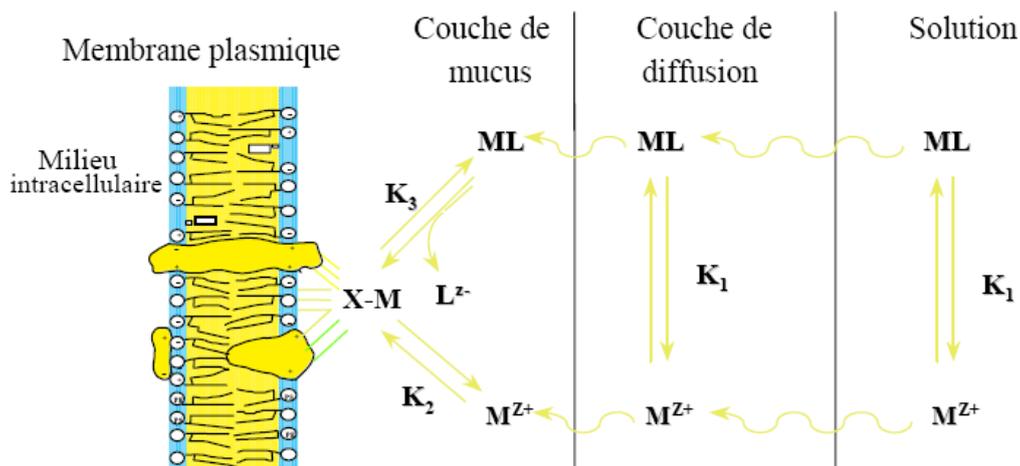


Figure I.4 : Schéma récapitulatif du modèle de l'ion libre (k_1 , k_2 , k_3 vitesses) [14].

B/- Capture des métaux par voie trophique

L'accumulation des métaux par la nourriture peut représenter une voie importante d'apport de métaux. En effet, les métaux en solution sont considérés comme les plus biodisponibles, mais les concentrations élevées enregistrées au niveau de la nourriture, du sédiment et des particules en suspension font de l'alimentation une source importante de métaux pour les organismes aquatiques. Cependant, différents facteurs tels que les formes physico-chimiques, les forces de liaisons des métaux aux aliments, la qualité de ces aliments et la position des espèces dans les chaînes alimentaires interviennent sur la disponibilité des métaux à partir de la nourriture [125, 126, 128].

I.6.1.7/- Mécanisme d'excrétion des métaux

La bioaccumulation des métaux chez les organismes aquatiques peut être contrôlée par leur excrétion, démontrée en transférant des organismes d'un milieu contaminé vers un milieu propre, en laboratoire ou en nature [125]. Plusieurs mécanismes physiologiques et biochimiques favorisent l'élimination des métaux [116]. Bien que les organismes aquatiques accumulent d'importantes quantités de métaux, leur excrétion reste significative dans de nombreuses espèces. Les principaux processus d'élimination sont la défécation, la perte par les surfaces perméables, la désorption passive et l'expulsion via les granules [14, 124]. Le rein joue un rôle clé, tandis que les métaux stockés dans les granules sont souvent éliminés par le tractus alimentaire sous forme de fèces, faisant de l'égestion fécale le principal mécanisme de décontamination métallique.

Les métaux présents dans les lysosomes ou les sphérocristaux sont excrétés par exocytose, épanchement de podocytes rénaux ou diapédèse de granules dans le tractus urinaire. Chez les bivalves, s'ajoutent des voies trans-tégumentaires, notamment par le byssus, la coquille ou les gamètes lors de la ponte. Certains mécanismes, de nature épisodique, amplifient les variations temporelles des concentrations en métaux chez ces organismes [13, 14].

I.6.1.8/- Mécanisme de stockage des métaux

Après la capture et l'excrétion, la séquestration des métaux absorbés dans les tissus constitue un facteur clé de l'accumulation des éléments traces. Cela inclut le piégeage des métaux et leur stockage dans des granules ou dépôts insolubles, parfois associés à des lysosomes [14, 125]. De nombreux ligands, tels que des protéines à forte affinité, des lysosomes et des concrétions minérales ou organiques, fixent les métaux essentiels et non essentiels.

Ces ligands, présents chez divers organismes, varient selon l'élément, le tissu ou l'espèce. Les métallothionéines (MT) chez les animaux et les phytochélatines chez les végétaux jouent un rôle majeur dans la régulation des métaux essentiels (Cu, Zn) et la protection contre les métaux toxiques (Cd, Hg) [125, 129]. D'autres composés comme les acides aminés (taurine, lysine) et le glutathion (GSH) participent à la séquestration, mais les MT restent essentielles pour l'homéostasie des métaux au niveau cytosolique [8, 19, 129]. Enfin, la biominéralisation, voie privilégiée chez les invertébrés marins, constitue un mécanisme répandu de détoxification métallique [125].

I.6.1.9/- Facteurs affectant la bioaccumulation des métaux

Les processus de contamination et de décontamination sont simultanés et leur importance varie selon les modalités de contamination (voies d'entrée, doses absorbées), les niveaux d'accumulation dans l'organisme et les organes, ainsi que les facteurs physicochimiques du milieu [14, 125].

La bioaccumulation résulte donc de mécanismes agissant simultanément ou de manière décalée. Pour un même contaminant, elle varie selon l'espèce, le stade de développement, les caractéristiques écologiques et les propriétés du contaminant [14, 19].

Comprendre l'interaction entre contaminants et barrières biologiques est essentiel en écotoxicologie, notamment pour la bioaccumulation et les transferts trophiques. Les concentrations métalliques dans les organismes ne dépendent pas uniquement de la biodisponibilité environnementale. Trois groupes de facteurs liés régissent les interactions entre métaux et barrières biologiques [13, 14, 19, 109, 115, 125] :

- Les caractéristiques physico-chimiques du milieu : température, pH, concentration en chlorures et en MES, nature et abondance des ligands organiques et inorganiques dans les phases dissoutes et particulaires, condition trophique, etc.
- Les propriétés chimiques du contaminant qui correspondent à la nature du contaminant, aux formes chimiques dans le biotope (colonne d'eau, sédiments), à leur spéciation et biodisponibilité, à leur concentration, etc.
- Les facteurs biologiques de l'organisme notamment les propriétés structurales et les fonctions des barrières biologiques : surface d'échange et accessibilité des sites de fixation, processus de transport et capacité d'absorption, mais aussi à une échelle plus importante les différentes étapes du cycle biologique tels que la croissance, la reproduction, la nutrition, l'excrétion, etc.

I.6.2/- Polluants organiques

I.6.2.1/- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques : HAP

A/- Définition et sources d'émission des HAP

Les HAP sont des molécules organiques neutres et apolaires composées de cycles benzéniques formés d'atomes de carbone et d'hydrogène, avec des structures allant de 2 à 10 cycles. Leur formule chimique est C_nH_m , et plus de 130 HAP ont été identifiés. Seize HAP, dont le naphthalène, l'anthracène et le fluoranthène, sont classés prioritaires par l'agence de protection de l'environnement américaine (US EPA) en raison de leur abondance ou de leur usage industriel. Ces composés figurent également parmi les substances dangereuses prioritaires de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) en raison de leur toxicité aiguë ou chronique et de leurs effets mutagènes (génétoxiques) chez les vertébrés et invertébrés [34, 130-132].

Les HAP proviennent de la formation naturelle du pétrole (origine diagénétique), de la combustion incomplète de matière organique d'origine naturelle (feux, volcanisme) ou anthropique (activités domestiques ou industrielles, origine pyrolytique) et de sources pétrogéniques anthropiques [133]. Tous les processus de combustion de carburants organiques peuvent en produire, notamment la combustion incomplète de matières fossiles, l'incinération des déchets, la fusion de l'alumine pour produire de l'aluminium, le craquage catalytique du pétrole brut et la liquéfaction ou gazéification du charbon.

Les HAP sont des hydrocarbures à deux ou plusieurs cycles aromatiques fusionnés, comprenant des composés parents (non alkylés) et leurs homologues alkylés.

Les HAP d'origine pétrogénique sont principalement des HAP alkylés à 2 et 3 anneaux, tandis que ceux d'origine pyrolytique sont surtout des HAP parents plus lourds (non alkylés). L'évaluation du profil des HAP, comme les rapports phénanthrène/antracène ou fluoranthène/pyrène, peut indiquer leur source [130, 134].

Au niveau anthropique, les fonderies d'aluminium représentent 925 tonnes par an de rejet de HAP dans l'atmosphère, alors qu'en milieu aquatique et terrestre, les principales sources sont les produits créosotés (jusqu'à 2000 tonnes par an), les usines métallurgiques (4 tonnes par an), les déversements de produits pétrolifères (76 tonnes par an) ainsi que la déposition des HAP contenus dans l'atmosphère [132, 135].

B/- Propriétés et toxicité des HPA

Les HAP sont peu volatils et se présentent à l'état pur sous forme de solide ou de liquide plus ou moins visqueux. Parallèlement, leurs coefficients de partage octanol/eau (K_{ow}) sont relativement élevés. L'arrangement linéaire ou angulaire des cycles influence leur stabilité, les HAP angulaires étant plus stables que les linéaires. De plus, la présence de cycles à 5 atomes de carbone associés à des cycles benzéniques augmenterait leur stabilité face à la biodégradation [34, 136].

Les HAP à faible masse moléculaire (ex. naphthalène) comptent moins de 4 anneaux aromatiques, sont relativement solubles, volatils et peu liés aux particules. En revanche, les HAP à masse moléculaire élevée (ex. benzo[g,h,i]pérylène, benzo[a]pyrène [133]) comptent 4 anneaux ou plus, sont peu solubles, non volatils et fortement adsorbés sur les particules, se transportant et se dégradant lentement.

Dans le milieu marin, les HAP pénètrent via les dépôts atmosphériques, le ruissellement, les rejets industriels ou les déversements d'hydrocarbures. Les sédiments constituent leur principal réservoir [130, 137].

Les hydrocarbures doivent leur toxicité à leur noyau benzénique, certains étant faiblement toxiques tandis que d'autres, comme le benzo[a]pyrène, sont reconnus comme cancérigènes. Plus d'une dizaine de HAP, tels que le phénanthrène, l'anthracène, le pyrène et le fluoranthène, sont cancérigènes chez les animaux. Contaminants ubiquistes, les HAP se retrouvent dans l'atmosphère, le sol et les milieux aquatiques [137].

Leur toxicité dépend fortement de la molécule et de la dose. En milieu aquatique, elle est liée à leur biodisponibilité et à leur bioaccumulation ou bioconcentration [138]. Les principaux effets toxiques incluent la cancérogénicité, la génotoxicité et la tératogénicité [130]. Par leur affinité pour les lipides, les HAP s'accumulent dans les tissus riches en lipides, pouvant entrer dans les réseaux trophiques et être bioamplifiés. Les animaux aquatiques, sensibles à cette contamination, sont de bons organismes sentinelles pour le suivi des HAP.

De nombreuses espèces sont affectées par les HAP, notamment les espèces endobenthiques et épibenthiques se nourrissant à la surface du sédiment, comme les poissons plats, certains annélides et mollusques bivalves [137]. Les organismes filtreurs, tels que les bivalves, peuvent accumuler de fortes concentrations de HAP [139]. En revanche, les vertébrés comme les poissons accumulent peu de HAP parents grâce à un système d'oxygénase à fonction mixte qui permet leur métabolisation et une excrétion partielle dans la bile [140-142].

Chez les organismes, l'exposition aux HAP affecte la physiologie et entraîne diverses réponses cellulaires et physiologiques, notamment des dommages oxydatifs et structuraux à l'ADN, des altérations du système immunitaire, des dysfonctionnements dans la biosynthèse des protéines, une diminution de l'activité enzymatique et des dommages membranaires.

C/- Métabolisation des HAP

La biotransformation métabolique des HAP, et en particulier celui du B[a]P, a fait l'objet de nombreuses études expérimentales. Schématiquement, il s'agit d'un métabolisme Enzymatique qui s'effectue en deux étapes qui sont représentées de façon simplifiée dans la figure I.5.

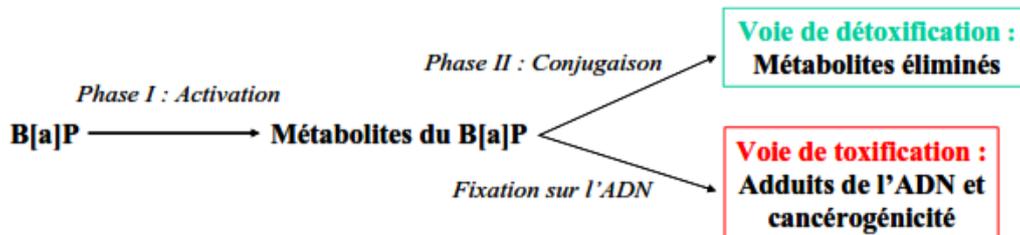


Figure I.5 : Métabolisme simplifié du B[a]P.

La phase I d'activation métabolique comprend trois voies présentées dans la Figure I.6.

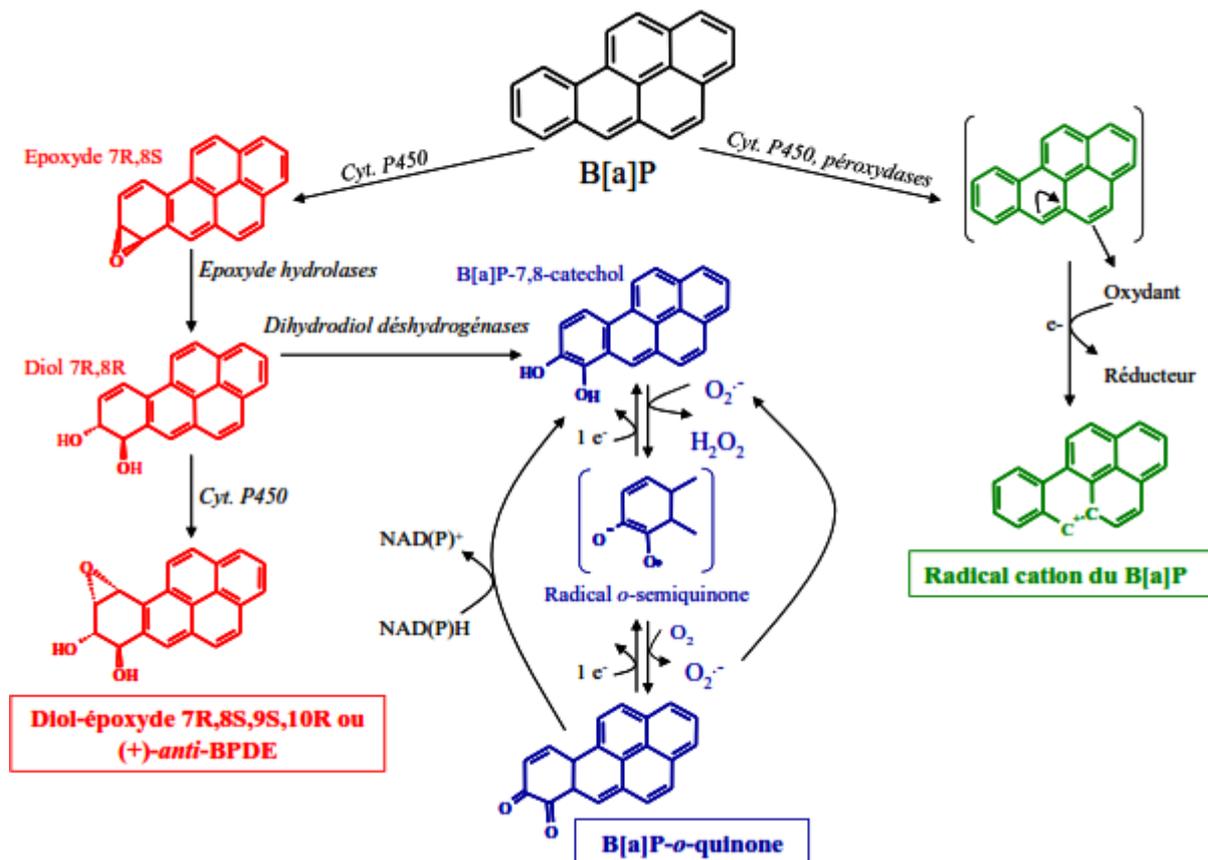


Figure I.6 : Voies d'activation métabolique du B[a]P [34].

La biotransformation vise à rendre les xénobiotiques plus hydrophiles, facilitant leur excrétion et réduisant les effets de la molécule mère. Les organismes possèdent des mécanismes de défense pour éliminer ces composés, notamment les HAP, qui peuvent être métabolisés. Une fois dans l'organisme, la molécule parent est transformée en métabolite excrétable. Ce processus se déroule en deux phases :

- Une phase de fonctionnalisation (Figure I.5) par des Cyt.P450, complexe enzymatique impliqué dans la lutte et l'élimination des molécules étrangères à l'organisme, ayant une activité monooxygénase. D'autres enzymes interviennent dans cette voie, entraînant la production de plusieurs métabolites aux propriétés différentes.
- Une phase de conjugaison avec l'ajout d'un groupement glutathion par une molécule Glutathion S-transférase (GST) qui rend la molécule hydrophile et donc excrétable.

Ce processus, illustré en figure I.6, peut produire divers métabolites, notamment pour des HAP comme le naphtalène, le phénanthrène, le fluoranthène, le pyrène, le chrysène et le benzo[a]pyrène. Les variations entre ces métabolites proviennent des positions variables des groupements ajoutés lors des réactions. Certains métabolites sont réactifs envers l'ADN ou les protéines [132].

I.6.2.2/- Le Phénol

A/- Phénol : propriétés et toxicité

Le phénol est une substance irritante, corrosive et narcotique, ciblant les systèmes cardiovasculaire et nerveux [143, 144]. Classé mutagène catégorie III par l'Union Européenne [145], il est également toxique et figure parmi les substances dangereuses selon l'ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) [146].

Après absorption, le phénol se distribue rapidement dans l'organisme, avec des concentrations élevées dans le foie, la rate, les reins et les surrénales [144, 147]. Une étude sur des volontaires a montré une absorption cutanée constante (0,08 mg/cm².h) à des concentrations de 2,5 à 10 g/L. Une application concentrée peut causer des lésions graves, et l'ingestion de 5-500 mg chez les nourrissons ou de 1-32 g chez les adultes peut être mortelle [148].

B/- Le phénol dans l'eau

Le phénol présent dans l'eau ou les aliments est rapidement absorbé par le tube digestif et distribué dans l'organisme, affectant particulièrement le cerveau et les reins [147]. En raison de sa toxicité élevée, les solutions aqueuses de phénol doivent être traitées avant leur rejet pour protéger la faune et la flore, principales cibles des effluents industriels [149].

Le phénol, très toxique et soluble dans l'eau, peut contaminer les sources d'eau potable, même à faibles concentrations, causant odeurs, goûts désagréables et risques pour la santé [150]. L'Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis (US EPA) fixe une limite de 0,001 mg/L dans l'eau potable, et la norme de rejet des effluents est de 0,05 mg/L [151]. L'OMS limite le phénol dans l'eau potable à 0,001 mg/L, tandis que l'Union Européenne impose une concentration maximale de 0,0005 mg/L [152-154].

La bioaccumulation du phénol à partir de 2 mg/L impacte le développement des poissons, et des concentrations de 10-100 mg/L peuvent éliminer la vie aquatique en 96 heures. Le rejet non traité de phénol entraîne des dommages graves au sol, aux eaux de surface et souterraines. Bien que le phénol soit rapidement métabolisé par les poissons, certains de ses métabolites restent retenus [155].

1.6.2.3/- Les colorants

Un colorant doit posséder, outre sa couleur propre, la propriété de teindre. Cette propriété résultant d'une affinité particulière entre le colorant et la fibre, est à l'origine des principales difficultés rencontrées lors des traitements. En effet, selon le type d'application et d'utilisation, les colorants synthétiques doivent répondre à un certain nombre de critères afin de prolonger la durée de vie des produits textiles sur lesquels ils sont appliqués : résistance à l'abrasion, stabilité photolytique des couleurs, résistance à l'oxydation chimique (notamment par les détergents) et aux attaques microbiennes.

L'affinité entre le colorant et la fibre est particulièrement développée pour les colorants qui possèdent un caractère acide ou basique accentué. Ces caractéristiques sont propres aux colorants organiques accroissent leur persistance dans l'environnement et les rendent peu biodégradables [156, 157].

A/- Utilisation des colorants

L'industrie des colorants constitue un marché économique considérable car de nombreux produits industriels peuvent être colorés, principalement [158-160] :

- Pigments (industrie des matières plastiques) ;
- Encre, papier (imprimerie) ;
- Colorants alimentaires (industrie agro-alimentaire) ;
- Pigments des peintures, matériaux de construction, céramiques (industrie du bâtiment) ;
- Colorants capillaires (industrie des cosmétiques) ;
- Colorants et conservateurs (industrie pharmaceutique) ;
- Carburants et huiles (industrie automobile etc.) ;
- Colorants textiles à usage vestimentaire, de décoration, du bâtiment, du transport, colorants textiles à usage médical etc.

B/- Toxicité des colorants sur les milieux aquatiques

Un certain nombre de colorants présente un caractère toxique sur le milieu aquatique provoquant la destruction directe des communautés aquatiques. La fuchsine, en concentration supérieure à 1mg/l, exerce un effet de ralentissement sur l'activité vitale des algues [161, 162].

Les rejets des usines de textile augmentent la DBO5 et la DCO, réduisant la réaération des cours d'eau et freinant la photosynthèse. Les poissons, indicateurs de la qualité de l'eau et source alimentaire humaine, sont des modèles efficaces pour les essais de toxicité [163]. Parmi plus de 3000 colorants analysés, 98 % ont une CL50 supérieure à 1 mg/L, seuil où la pollution colorée devient visible. Les 2 % restants incluent 27 structures chimiques, dont 10 colorants triphénylméthane. Le noir de luxanthol G est toxique pour les jeunes Guppies à 5 mg/L, mais seulement à 75 mg/L pour le Hotu. En revanche, l'éosine, la fluorescéine et l'auramine sont inoffensives pour la Truite et le Gardon jusqu'à 100 mg/L [161, 164, 165].

Face à un arsenal thérapeutique limité et parfois inefficace pour lutter contre de multiples maladies, les colorants, et en particulier le Vert de Malachite (VM), ont toujours constitué un recours malgré leur interdiction, du fait de leur large spectre d'efficacité.

En effet, les colorants sont principalement utilisés comme traitement des infections fongiques et parasitaires externes chez les poissons et pour protéger les œufs en incubation contre les champignons [165].

En raison de sa structure le vert de malachite peut affecter certains processus cellulaires (par exemple la respiration mitochondriale) [166]. Aussi, le vert de malachite et son métabolite majoritaire (leucomalachite), sont des composés génotoxiques, cancérigènes et reprotoxiques chez l'animal [165]. Le vert de malachite a de nombreuses autres utilisations en dehors de l'aquaculture et est fabriqué en quantité assez importante pour l'usage qui en est fait dans l'industrie comme colorant de matériaux divers tels que le cuir, le papier et les tissus.

1.7/- Rejets industriels

Tout processus, toute activité génère des produits et des rejets. Ce constat s'applique dans le cas de réactions physiques, chimiques, physiologiques : c'est ainsi que la photosynthèse, par exemple, permet la *production* de matière organique sous forme de glucose à partir de dioxyde de carbone et d'eau et *rejette* du dioxygène. Mais aussi pour les activités anthropiques : ainsi, chaque activité domestique, agricole ou industrielle génère des produits définis comme « déchets » s'ils ne sont pas *a priori* exploitables. Les rejets industriels (RI), par exemple, ont des conséquences, plus ou moins importantes selon la nature du/des rejets, sur l'environnement de l'Homme, proche ou lointain, et à plus ou moins long terme. La généralisation et la mondialisation de ces pollutions rendent essentielles les évaluations et diagnostics environnementaux, *via* des tests écotoxicologiques, *in vitro* ou *in situ*, sur des bioindicateurs [167, 168].

Il faut tout d'abord distinguer deux termes très souvent assimilés : **effluent** et **rejet**. En effet, si un effluent (ou une eau) industriel peut être traité, un rejet industriel est une eau traitée, bientôt déversée dans le milieu aquatique naturel ou envoyée en station d'épuration : en clair, un rejet est un effluent, un effluent n'est pas un rejet. Les rejets sont aussi divers que les secteurs industriels (Tableau I.1). Les RI varient même au sein d'un seul métier.

Les composés présents dans les eaux à traiter peuvent être classés en quatre grandes catégories : 1) Les matières en suspension (**MES**), (taille supérieure à 100 μ m ; minérales, organiques et/ou biologiques), 2) Les matières colloïdales (**MC**) (leur taille est d'environ 1 μ m), 3) Les matières dissoutes (**MD**), ou solubles, sont par définition invisibles (composées, pour les RI, de matière organique, de colorants, d'éléments traces métalliques ETM et de composés azotés et organophosphorés) et 4) les matières non miscibles (**MnM**), ou immiscibles, ne se mélangent pas à la fraction aqueuse de l'eau (les huiles , hydrocarbures, dégraissants etc.) [167, 169].

Les polluants, qu'ils soient naturels ou synthétiques, se répartissent en trois types : physiques, chimiques et biologiques. Le tableau (I.1) illustre ces catégories avec des exemples spécifiques aux milieux aquatiques.

Tableau I.1 : Les différents types de polluants et leurs effets biologiques

Type de polluant	<i>Physique</i>	<i>Chimique</i>	<i>Biologique</i>
Exemples	Radiations ionisantes ; Pollution thermique ; Pollution particulaire ;	Engrais, pesticides HAP, hydrocarbures Métaux Matières organiques	Bloom : algues, bactéries Champignons Espèces invasives
Sources principales	Centrales électriques Installations nucléaires Pots d'échappements	Agroalimentaire Tanneries, Incinérateurs Industries pétrolières	Agroalimentaire Papeterie Rejets domestiques
Effets	Altérations génétiques Modification des conditions abiotiques du milieu récepteur	Mortalité, bioaccumulation, bioamplification Altérations	Eutrophisation, anoxie et dérèglement des habitats

Les normes algériennes de rejet imposées par les différents textes réglementaires, notamment celle du décret exécutif n°06-141 du 20 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 19 avril 2006, définissent les valeurs limites à ne pas dépasser pour les rejets d'effluents liquides industriels.

En effet, les filières de traitement sont évaluées en fonction du taux d'abattement de la charge organique polluante (DCO, DBO5, COT, etc.), de la teneur en espèces minérales métalliques (métaux) et non métalliques (SO_4^{2-} , Cl^- , NO_3^- , etc.) ou bien encore par la valeur de certains paramètres physicochimiques (pH, conductivité, potentiel redox, etc.) [169, 170].

Au plan strict de l'impact réel sur les milieux récepteurs (souvent aquatique), la seule caractérisation des rejets montre rapidement ses limites dans la mesure où :

- Il est rarement possible par ce biais, d'identifier et donc de prendre en compte la totalité des espèces chimiques susceptibles de se retrouver dans un effluent,
- Ces paramètres ne constituent pas en soi, une approche suffisamment fiable de la toxicité, compte tenu des phénomènes de synergies et d'antagonisme et de la difficulté à évaluer une toxicité globale à partir de chaque composant pris isolément.

Les travaux réalisés sur l'aspect toxicologique des rejets liquides en général ont permis d'élaborer des tests qui permettent d'examiner l'effet exercé par des substances polluantes ou effluents sur les différentes réponses biologiques mesurées chez les espèces indicatrices. L'objectif principal étant de tirer des conclusions sur l'écotoxicité des substances ou effluents testés [171-173].

1.8/- Surveillance de la qualité de l'environnement

Les nombreuses méthodes permettant de surveiller la qualité de l'environnement peuvent être réparties en deux catégories, clairement distinctes : la détection des polluant et éventuellement leur quantification, dans les milieux physiques et biologiques, d'une part, et l'évaluation des effets des pollution sur les organismes vivants, soit au niveau des individus, soit au niveau des population et/ou communautés, d'autre part.

Après plusieurs années d'utilisation de ces différentes méthodologies, il apparaît qu'aucune d'entre elles n'est exclusive et ne peut, à elle seul, fournir des informations fiables et complètes sur l'état de l'environnement. En d'autres termes, c'est l'association judicieuse de ces différentes approches qui permet d'évaluer de façon précise l'état des milieux et des organismes qui y vivent [6, 8].

Dans les études de surveillance biologique, l'accent est aujourd'hui mis sur le couplage chimie/biologie car l'interdépendance de ces deux disciplines est une composante majeure de la surveillance des effets des polluants [174].

1.8.1/- La biosurveillance

Le concept de surveillance biologique (ou *biomonitoring*), qui repose sur l'étude de la réponse biologique des organismes aux polluants, est aujourd'hui en plein essor [174]. La biosurveillance se définit comme « l'utilisation des réponses à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique, écologique) d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre l'évolution » [175]. C'est aussi « l'étude de la réponse biologique des organismes aux contaminants chimiques » [176].

Selon Andral [177], La biosurveillance repose dans la capacité de la cible biologique à concentrer dans ses tissus les contaminants chimiques dans un facteur proportionnel à leur biodisponibilité. Ainsi, L'objectif des réseaux de surveillance environnementale est de suivre les variations spatiales et temporelles des niveaux de contamination chimique dans le champ moyen de dilution des différents apports de contaminant affectant chaque unité du référentiel géographique d'un site donné [19].

En général, on distingue deux principes de biosurveillance :

- La biosurveillance sensible utilise des organismes réagissant au stress polluant. Elle repose sur trois concepts : le biomarqueur (infra-individuel), le bioindicateur (altérations physiologiques, tissulaires ou morphologiques visibles au niveau individuel) et le biointégrateur (variations de population/communauté, présence/absence d'espèces) [19, 175].
- La biosurveillance par accumulation, qui utilise des organismes qui ont la capacité de stocker les polluants dans leurs tissus (bioaccumulateurs) suite à des mécanismes de fixation et/ou de transfert. Le bioaccumulateur sert ici de matrice de dosage de différents polluants [14, 19, 175].

La biosurveillance se divise en deux stratégies principales : la méthode *in situ* (ou passive), qui utilise les organismes indigènes déjà présents sur le site. Elle est rapide car les organismes ont déjà été exposés aux polluants, il suffit de les collecter et de les analyser [177].

La densité et la localisation des emplacements de prélèvement devront répondre aux objectifs de l'étude. Les enquêtes à grande échelle couvrant de plus grands domaines exigeront évidemment plus d'emplacements que des études de sources ponctuelles de pollution. Pour ces dernières, les sites d'échantillonnage sont fréquemment choisis le long des gradients par rapport à la source de pollution. Cependant, l'utilisation d'espèces indigènes détermine bien souvent le nombre et la localisation des emplacements [175].

La seconde appelée méthode des transplants (ou biosurveillance active) emploie des organismes dits transplantés [177]. Elle peut être utilisée par exemple lorsque la méthode *in situ* n'est pas envisageable (absence d'organismes correspondant aux critères de l'étude). Cette dernière nécessite plus de temps. En effet, il faut laisser le temps aux transplants (organismes provenant d'une zone « saine ») d'accumuler les polluants présents dans leur nouvel environnement, cette phase d'exposition pouvant être plus ou moins longue selon le type d'organismes choisi et le polluant étudié [19, 175].

Tableau I.2 : Comparaison entre stratégies *in situ*/transplants [175].

<i>In Situ</i>	Transplants
Les résultats peuvent être obtenus en quelques jours.	Les temps d'exposition des transplants sont plus longs (plusieurs semaines).
Les résultats démontrent la pollution des années précédentes.	Les résultats illustrent la pollution pendant la période d'exposition.
Les niveaux accumulés sont habituellement au-dessus des limites de détection (temps d'exposition plus long).	Les concentrations accumulées peuvent être indétectables sur une période d'exposition trop courte.
Faible surveillance, peu de risques de vandalisme.	Risques potentiels de vandalisme.
Coûts liés aux transports vers les sites de prélèvement et aux analyses chimiques.	Coûts supplémentaires relatifs aux matériaux et au temps de préparation des transplants avant exposition.
Manque potentiel d'échantillons indigènes pour obtenir une couverture géographique suffisante.	La densité des points de prélèvement, le nombre de transplants et les conditions d'étude sont contrôlées.

CHAPITRE II

OUTILS D'EVALUATION EN ECOTOXICOLOGIE

II.1/- Introduction

L'environnement est depuis longtemps connu pour sa capacité à véhiculer des substances toxiques pour l'homme ou les écosystèmes. Les chimistes ont pris l'habitude de mesurer la concentration d'un certain nombre de molécules présentes dans l'eau, l'air ou les sols afin de surveiller ainsi la qualité de ces milieux [178, 179]. Or, L'analyse chimique des polluants présents dans les différents compartiments des écosystèmes aquatiques n'est pas toujours possible du fait de la multiplicité des molécules présentes, et ceci souvent à des concentrations inférieures aux limites de détection analytique [6, 13-15, 180]. De même, la mesure directe des contaminants dans l'eau fait appel à des techniques analytiques sophistiquées et coûteuses, difficilement applicables à un réseau de surveillance [14, 15].

La variabilité temporelle des milieux aquatiques ne confère cependant que peu de signification à une mesure ponctuelle [14, 15, 177]. Par ailleurs, une telle approche ne renseigne pas sur les risques encourus par les populations animales ou végétales exposées aux polluants, et ne peut, à elle seule, prédire les effets biologiques des mélanges de contaminants (synergies...) ni quantifier simplement la biodisponibilité des polluants pour les organismes vivants. De ce fait, le gestionnaire manque d'informations sur l'urgence des mesures à prendre pour améliorer l'état de santé de ces écosystèmes, ou protéger la biodiversité et l'intégrité des écosystèmes [6-8].

Le suivi de la perturbation de cibles biologiques peut pallier cette difficulté [180]. Par exemple, la spécificité d'un biomarqueur pour certaines familles de molécules chimiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques, polychlorobiphényles, métaux lourds, produits phytosanitaires etc.) permet d'une part de révéler la présence de ces polluants, et d'autre part de renseigner sur la biodisponibilité de ces polluants ainsi que sur les effets biologiques précoces sur les organismes [6, 8, 19].

Une gestion adaptée et pertinente des milieux aquatiques doit reposer sur des outils d'évaluation de l'intégrité des écosystèmes mise à mal par le transfert et l'accumulation dans l'environnement des produits de l'activité humaine. Parallèlement aux mesures chimiques, désormais utilisées dans les programmes de surveillance, la mesure de variables biologiques est susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de l'écosystème aquatique ainsi que sur les phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification. De ce fait, les variables biologiques sont un complément indispensable au sein d'un programme de surveillance et d'alerte [6, 18].

II.2/- Ecotoxicologie

L'écotoxicologie a pour but d'étudier le comportement et les effets de polluants dans les écosystèmes. Face aux nombreuses substances issues des activités technologiques qui se retrouvent quotidiennement dans l'environnement, la détection rapide d'une présence excessive de contaminants, la détermination de leur toxicité et une prévention des atteintes nuisibles sont nécessaires pour assurer la protection des écosystèmes [181].

L'écotoxicologie est définie comme « *le domaine d'étude qui intègre les effets écologiques et toxiques des polluants chimiques sur les populations, les communautés et les écosystèmes ainsi que leur devenir (transfert, transformation, dégradation) dans l'environnement* » [182].

Cette discipline comporte plusieurs aspects ou domaines d'étude, tous interdépendants les uns des autres [182] :

- Le *monitoring* des polluants dans l'environnement par le biais d'analyses chimiques et l'usage d'espèces animales et végétales indicatrices de contamination et/ou de biomarqueurs d'exposition ;
- L'étude du devenir des polluants dans un écosystème récepteur ; leur transfert entre les différents compartiments abiotiques des écosystèmes ainsi qu'entre ces compartiments abiotiques et les organismes vivants, les transformations physico-chimiques et biologiques qu'ils peuvent subir et les conséquences sur leurs potentiels toxiques, etc. ;
- Les modalités et mécanismes d'action des polluants ;
- La prévision des effets des polluants sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes.

La protection des milieux et leur surveillance s'appuient aussi largement sur les méthodes de l'écotoxicologie, avec notamment la définition de normes de qualité environnementale (NQE). Ces normes sont à la base de l'évaluation de la qualité chimique des milieux et de leur surveillance imposée par la Directive Cadre Européenne sur l'Eau, et la réglementation des rejets. Il faut souligner que la mise en œuvre de cette Directive, qui s'appuie à la fois sur une description chimique de la qualité des milieux et sur une description de la qualité des biocénoses, met en évidence l'impérative nécessité d'une science prédictive de l'impact des substances chimiques qui s'appuie non seulement sur les mécanismes d'action biotique et abiotique des produits chimiques, mais s'intéresse également à la diversité biologique et la réalité du fonctionnement des écosystèmes. C'est sans aucun doute la prise en compte de cette double nécessité qui constituera l'objectif majeur de l'écotoxicologie, pour d'une part produire des prédictions du risque toxique les plus fiables possibles, et d'autre part contribuer à définir des méthodologies de remédiation des milieux efficaces et utiles aux gestionnaires.

II.2.1/- Tests écotoxicologiques

Dans les tests écotoxicologiques différents moyens sont utilisés pour mesurer la toxicité d'un produit. Le moyen le plus communément utilisé est la mesure de la mortalité ou de la reproduction, mais il y a un intérêt croissant dans l'utilisation de paramètres plus sensibles. Les effets biochimiques, physiologiques, reproductifs et comportementaux peuvent aussi apporter des mesures de la toxicité. La plupart des tests de toxicité apportent une estimation de la dose qui affecte 50% de la population. Ce peut être par exemple la concentration létale moyenne qui tue 50% de la population. Il est aussi possible d'estimer la concentration maximale qui ne provoque aucun effet.

Ces tests de toxicité ou bioessais, se distinguent en deux types :

- Les tests de toxicité aiguë qui se réalisent sur une durée très courte (par rapport au temps de génération de l'organisme). Leurs avantages sont leur rapidité et leur faible coût. Ces tests impliquent généralement des concentrations élevées du polluant; de ce fait, les effets à long terme des faibles concentrations ne sont pas mis en évidence.

- Les tests de toxicité chronique se déroulent sur une durée relativement longue par rapport au temps de génération de l'organisme. Ce sont par exemple les tests sur la reproduction. Ils sont plus longs et plus coûteux que les tests aigus, mais ils permettent de mettre en évidence des effets à long terme d'un polluant [125, 128].

Toutefois, la volonté de développer des méthodes plus sensibles et plus rapides que les tests classiques de mortalité ou reproduction a permis la mise en œuvre du concept de biomarqueurs.

II.2.2/- Intérêt des bioessais

La prédiction des effets de composés toxiques sur les écosystèmes récepteurs, qui est l'un des objectifs majeurs de l'écotoxicologie, est basée sur des outils et des méthodes dont la pertinence, au regard de l'objectif visé, est inversement proportionnelle au coût et à la simplicité. Les plus aisés à mettre en œuvre sont les tests monospécifiques réalisés au laboratoire dans des conditions standardisées. Une seule espèce, considérée comme représentative d'une classe d'organisme d'un niveau trophique donné ou/et comme cible privilégiée du toxique par sa place ou son rôle dans l'écosystème, est étudiée. Ces tests sont caractérisés par leur simplicité et rapidité de mise en œuvre, leur sensibilité, leur reproductibilité et leur coût économique modéré.

Les conditions biotiques (espèce, âge) et abiotiques (température, temps d'exposition, composition physicochimique du milieu) sont contrôlées et standardisées ce qui permet une comparaison des résultats obtenus notamment sur différents polluants et entre différents laboratoires. Ils constituent ainsi une première approche d'évaluation du danger. Par ailleurs, ces tests sont le plus souvent associés pour former une batterie de tests afin de réaliser un screening du potentiel toxique des contaminants considérés. Les espèces tests étudiées sont issues de différents niveaux trophiques d'un écosystème récepteur considéré [182].

A l'opposé des tests monospécifiques, les études *in situ* permettent d'étudier les impacts en conditions réelles et en vraie grandeur d'une contamination du milieu par une (ou des) substance(s) toxiques(s), mais posent d'énormes problèmes méthodologiques (comment isoler les effets des substances étudiées du bruit de fond provoqué par la présence d'un grand nombre d'autres substances, sur quel écosystème de référence se baser pour mesurer un effet ?) et sont très coûteuses [182].

Par ailleurs, l'approche expérimentale classique en écotoxicologie qui vise à générer des relations doses-effet, pour l'évaluation du risque à priori de produits chimiques ou, à posteriori d'échantillons environnementaux, ne rend pas compte, ou de manière limitée, des perturbations réelles et des interactions entre les individus et leur environnement, ni de la variabilité de la réponse biologique, dans l'espace, et dans le temps. A la diversité des sensibilités biologiques s'ajoute le rôle de la période d'exposition, dont les conséquences sur la survie et/ou les performances des organismes pourront être très différents, si par exemple des organismes ont été exposés au stade adulte ou juvénile, durant leur phase de maturité sexuelle ou durant l'embryogenèse. La durée d'exposition demeure également une variable majeure, puisque la pression des contaminants peut s'exercer non pas sur une seule génération mais plusieurs, et conduire à une diminution d'abondance d'organismes, ou encore des adaptations des populations à la pression par sélection des organismes les plus résistants, voire à des processus d'extinction.

II.3/- Indicateurs biologiques (Bioindicateurs)

Le terme de bioindicateur a été défini et employé de façons très diverses, certains auteurs l'employant même pour désigner des descripteurs de type biomarqueur. Selon Blandin [183], un indicateur biologique (ou bioindicateur) est un organisme ou un ensemble d'organismes qui par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques permet, de façon pratique et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications naturelles ou provoquées. Lagadic *et al.*, [8], préconisent d'utiliser comme définition celle de Guelorget et Perthuisot, qui considèrent que les bioindicateurs sont « des espèces ou groupe d'espèces qui, par leur présence et/ou absence, sont significatifs d'une ou de plusieurs propriétés de l'écosystème dont ils font partie ».

Globalement, les indicateurs biologiques renseignent sur l'état des écosystèmes à partir de la compilation de données biologiques qui peuvent être très diverses.

Il s'agit bien de mesurer des modifications liées surtout aux activités humaines qui détournent les écosystèmes de leur évolution naturelle.

L'utilisation des indicateurs est aujourd'hui reconnue comme l'une des techniques les plus efficaces pour la recherche écologique appliquée aux eaux de surface et aux eaux côtières. Lors de l'étude des relations de cause à effet entre stressseurs et santé des écosystèmes (incidences sur l'élément biologique), un grand nombre d'indicateurs biologiques et écologiques ont été élaborés comme autant d'outils susceptibles de suivre les modifications de la biodiversité du niveau moléculaire (gène) à celui de l'écosystème. Les indicateurs biologiques peuvent être définis comme des mesures de la santé des organismes face aux stressseurs environnementaux, qui portent sur plusieurs niveaux d'organisation biologique et d'échelle temporelle de réponse [184-186].

La mesure directe de la présence de contaminants dans les tissus de certains organismes, appelés « biomoniteurs », a fait l'objet d'une surveillance à long terme en Méditerranée. Un facteur important à prendre en compte lorsqu'on met en place un système de biosurveillance est l'organisme qu'il convient d'utiliser [14]. Des critères de sélection ont été proposés par plusieurs chercheurs [7, 14, 19, 187] ; les plus cités sont discutés ci-dessous :

- Leur sédentarité sur la zone d'étude afin que l'état des individus puisse être directement corrélé avec le niveau de pollution du site. Des animaux se déplaçant sur de grandes distances ou ne visitant les sites étudiés qu'occasionnellement ne peuvent en effet être le reflet du niveau de contamination du lieu où ils auront été capturés ;
- Leur facilité d'identification, de capture ou de récolte tout au long de l'année ;
- Une taille de la population suffisante car l'impact de prélèvement réguliers sur la structure et la densité de la population doit être négligeable ;
- Une aire de dispersion large et connue, ce qui permet les comparaisons entre différents sites, mais augmente également la probabilité de trouver des sites peu impactés que possible par la pollution ;

- Une longévité de plusieurs années et une résistance aux polluants présents, afin que les individus soient au contact des contaminants pendant des périodes suffisantes pour que les changements de réponses biologiques (ex biomarqueurs) atteignent un niveau mesurable. Cette persistance des individus dans le milieu permet également de suivre l'évolution des paramètres étudiés au cours de temps, et éventuellement d'apprécier la réversibilité des dommages si des mesures sont prises pour réduire le niveau de contamination ;
- Leur aptitude à concentrer le contaminant, sans effet létal, aux concentrations rencontrées dans le milieu ;
- Des relations dose/effet et cause/effet doivent pouvoir être établies ;
- La biologie de l'espèce doit être suffisamment connue pour différencier le signal du bruit de fond ;
- Les effets de variations des facteurs abiotiques doivent être connus.

Les chercheurs utilisent une large gamme d'organismes indicateurs, incluant des algues, des invertébrés et des vertébrés (Tableau II.1).

Ces outils peuvent être intégrés dans des démarches d'évaluation des effets toxiques, comme par exemple la toxicité des effluents (approche : Whole Effluent Toxicité, préconisée par la commission OSPAR [167, 188]. Les résultats issus de ces biotests permettent de classer les échantillons (substances, rejets, sédiment) selon leur activité toxique, voire selon leur mécanisme d'action toxique lorsqu'il s'agit de mesures spécifiques de ces mécanismes (perturbation endocrinienne, génotoxicité). Au même titre que des informations chimiques (identification et concentration de substances), ces résultats sont des éléments d'informations utiles dans une démarche d'évaluation du risque à priori, préliminaire à des actions de gestion. Néanmoins, la fiabilité de l'extrapolation des résultats issus de ces modèles, en termes d'effet sur le milieu reste toujours limitée, et doit être confortée dans le temps par des observations sur le terrain [109, 189, 190].

Tableau II.1 : Avantages des différents compartiments trophiques [191].

Avantages de l'utilisation des algues :

- Indicateurs d'effets à court terme du cycle de vie court ;
 - Producteurs primaires ;
 - Echantillonnage très facile et peu coûteux ;
 - Bien adaptés pour la mesure de paramètres fonctionnels (biomasse, dosage de chlorophylle, etc.) ;
 - Sensibles à certains polluants particuliers comme les herbicides.
-

Avantages de l'utilisation de macro-invertébrés :

- Bon indicateur de conditions locales car peu mobiles ;
 - Intègre les variations à court terme : les communautés réagissent à long terme mais certains stades sensibles répondent rapidement ;
 - Facilité de mise en œuvre, l'utilisation de niveaux taxonomiques peu poussés est possible et donne de bonnes indications ;
 - Echantillonnage facile ;
 - Abondants dans la plupart des écosystèmes ;
 - Source de nourriture de nombreux poissons.
-

Avantages de l'utilisation des poissons :

- Bons indicateurs d'effets à long terme à cause de leur durée de vie ;
 - Représentants de différents niveaux trophiques (omnivores, insectivores, herbivores, planctonivores et piscivores) ;
 - Situés au sommet de la chaîne trophique et consommés par l'Homme ;
 - Relativement faciles à échantillonner et très faciles à déterminer au niveau de l'espèce ;
 - Utilisation pour les usages de l'eau (catégories piscicoles) ;
 - De nombreux poissons sont considérés comme des espèces menacées.
-

II.4/- Réponses à un stress au sein d'un système biologique

Le contact d'un organisme vivant avec un agent étranger déclenche un ensemble de réactions entre l'agent lui-même ou ses métabolites réactifs et les constituants cellulaires ; ces réactions génèrent des lésions moléculaires initiales pouvant conduire à des lésions irréversibles responsables de modifications persistantes du fonctionnement cellulaire [192].

L'évaluation des conséquences toxicologiques de la présence d'un xénobiotique au sein d'un écosystème aquatique est complexe. Cette démarche suppose une approche intégrative de différents paramètres. En effet, la seule présence d'un xénobiotique dans un système écologique donné ne constitue pas, en soi-même, un élément suffisamment pertinent pour en déduire un risque pour les biocénoses. Des liens doivent être établis entre les niveaux externes d'exposition (mesures chimiques de la présence du contaminant dans l'écosystème), les niveaux internes de contamination tissulaire (sa bioaccumulation dans les organismes) et les effets biologiques induits. Ainsi, l'exposition, le devenir et les effets des polluants au sein des écosystèmes aquatiques nécessitent une étude écotoxicologique multiparamétrique [13, 192].

Le défi de l'écotoxicologie réside donc dans le fait qu'il s'agira de repérer des dommages préjudiciables aux populations bien en amont de leur apparition. Afin de comprendre la cascade d'évènements aboutissant à l'apparition de ces effets, l'ordre séquentiel des réponses à un stress est présenté en figure (II.1) [13].

Ainsi sans une compréhension approfondie des mécanismes toxiques à l'échelle moléculaire et de la cascade d'effets biologiques qui peut en découler, des processus de contrôle par des facteurs biotiques (tels que le stade de développement, le sexe, l'âge, la taille) et abiotiques (la température, le pH etc.), il demeure une importante incertitude sur toute extrapolation d'un mode d'action ou d'une concentration active, d'une espèce à l'autre et d'un milieu à un autre. C'est cette importante incertitude sur la validité des modèles d'évaluation du risque que l'écotoxicologie doit notamment s'efforcer de réduire, pour apporter des outils les plus fiables possibles en vue d'une gestion raisonnée des risques toxiques [192].

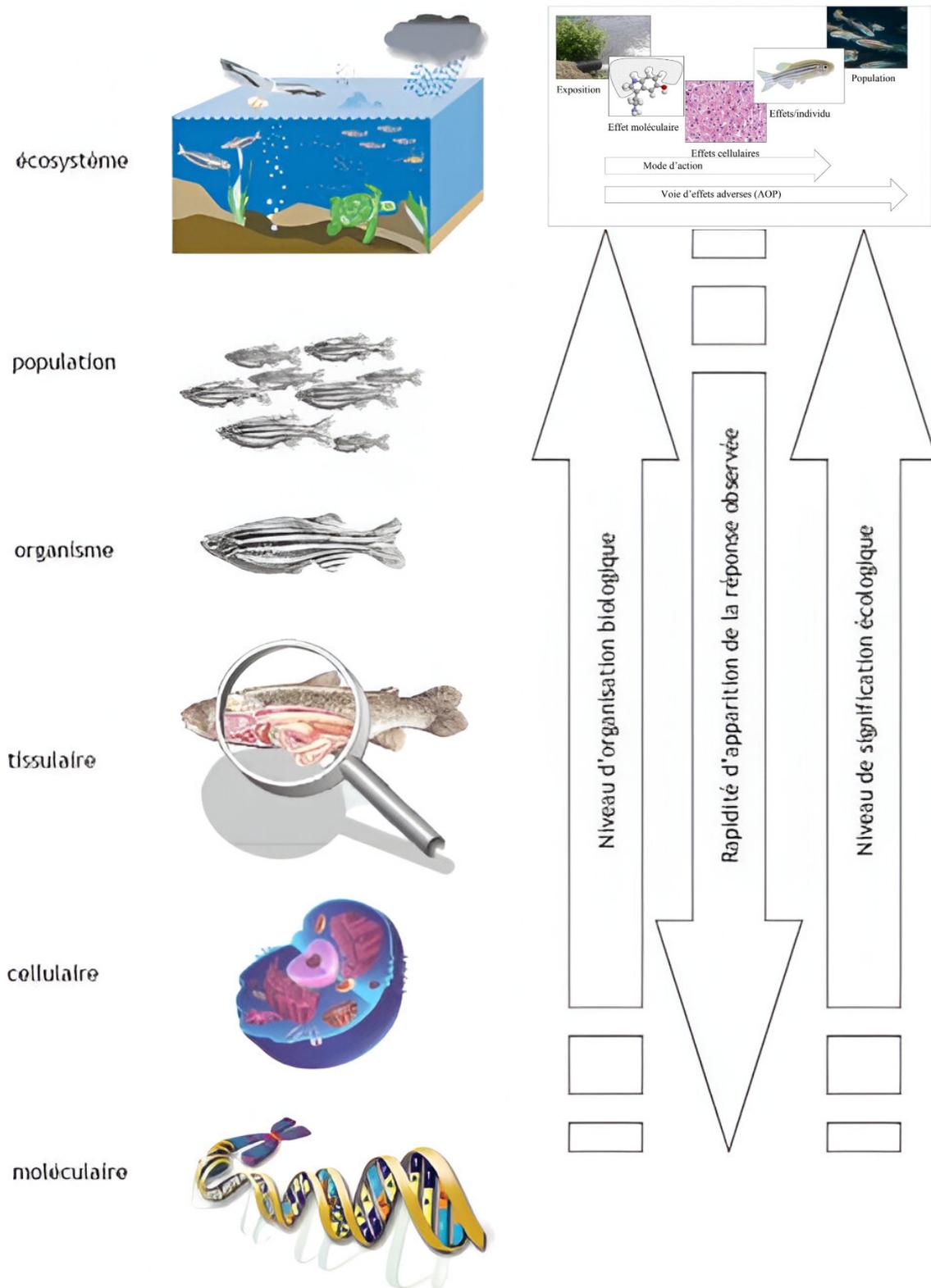


Figure II.1 : Représentation graphique de l'ordre séquentiel des réponses à un stress au sein d'un système biologique.

Ces enjeux impliquent donc, en théorie, la nécessité de développer des outils permettant une détection précoce de la toxicité exercée par un contaminant. Les effets à des niveaux hiérarchiques élevés sont, le plus souvent, précédés par des changements de processus biologiques à des niveaux inférieurs. C'est sur la base de ce postulat que le développement d'indicateurs biologiques prédictifs d'effets plus tardifs a été motivé [26]. Pour cela, des paramètres biologiques sont utilisés comme signaux d'alarme : les biomarqueurs.

En résumé, dans le contexte environnemental, les biomarqueurs offrent l'avantage d'être des indicateurs sensibles démontrant que le contaminant a été internalisé par l'organisme, a été distribué dans les différents tissus et a induit des effets toxiques au niveau de cibles spécifiques [13, 192].

II.4.1/- Les biomarqueurs : notions et concepts

II.4.1.1/- Définition et intérêts biologiques

Plusieurs définitions ont été données au terme « biomarqueur ». Ce terme est généralement utilisé dans un sens très large, incluant quasiment toutes les mesures reflétant une interaction entre un système biologique et un danger potentiel ; ce danger pouvant être chimique, physique, ou biologique.

La définition ayant été retenue par Lagadic *et al.*, [7] est la suivante : « un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant ». Ce changement peut alors être associé à l'exposition en elle-même, aux effets toxiques ou à la sensibilité vis-à-vis du contaminant environnemental.

Dans ce sens, il est important de replacer l'approche des biomarqueurs dans un contexte fonctionnel. En effet, qu'ils interviennent dans le maintien de l'homéostasie ou qu'ils traduisent des perturbations fonctionnelles, la possibilité d'utiliser les biomarqueurs mesurés au sein des individus comme marqueurs précoces de dysfonctionnement ultérieurs au niveau des populations apparaît effectivement comme une éventualité particulièrement attractive [7].

Des expériences en conditions contrôlées ont montré l'intérêt des biomarqueurs pour évaluer l'exposition des individus à des xénobiotiques [8, 193, 194] conduisant à proposer de les utiliser dans les programmes de surveillance de la qualité de l'environnement. L'avantage du biomarqueur dans le suivi de la qualité de l'environnement est qu'il reflète la biodisponibilité, à la fois des molécules-mères et des produits de dégradation [125]. Ce type d'information est particulièrement important lorsque, par exemple, les processus de dégradation rendent les métabolites plus biodisponible, donc potentiellement plus dangereux, que les molécules mères [8].

Par ailleurs, les biomarqueurs peuvent rendre compte de la distribution des contaminants dans le milieu. En fonction de leur habitat et de leur position dans les réseaux trophiques, les espèces sources de biomarqueurs peuvent en effet fournir des indications sur la façon dont les polluants se diluent dans le milieu ou, au contraire, se concentrent dans certains compartiments de l'écosystème [8, 13].

L'approche fondamentale de la notion de biomarqueur consiste essentiellement en une évaluation de ce type d'outil biologique dans la perspective de leur utilisation chez des organismes exposés à des substances chimiques susceptibles de contaminer leur environnement. De fait, la démarche expérimentale d'évaluation des biomarqueurs consiste non seulement en l'acquisition de connaissances fondamentales mais également en la définition des critères dits de validation, qui rendent compte des possibilités d'utilisation de ces outils biologiques dans les cas, avérés ou pressentis, de pollution de l'environnement [6, 7].

En dépit de ces avantages, le handicap principal à l'utilisation des biomarqueurs dans le milieu naturel demeure l'interférence avec d'autres facteurs de l'environnement. Dans le milieu naturel, différents facteurs peuvent donner lieu à des réponses des paramètres biochimiques/physiologiques utilisés en tant que biomarqueurs. Ainsi les conditions climatiques, les caractéristiques physicochimiques du milieu, les particularités génétiques des espèces, les relations inter-individuelles et/ou interspécifiques ou les interactions entre les polluants eux-mêmes qui, dans l'environnement, se trouvent en mélange, peuvent compliquer singulièrement l'interprétation des réponses des biomarqueurs.

En effet, la connaissance des facteurs de variation naturelle des biomarqueurs est fondamentale pour distinguer le signal d'une perturbation causée par des polluants du « bruit de fond » que constituent les fluctuations naturelles des biomarqueurs [6-8, 19].

II.4.1.2/- Classification des biomarqueurs

Il est classique, en écotoxicologie, de distinguer trois types de biomarqueurs : Les biomarqueurs d'exposition à un xénobiotique, les biomarqueurs d'effet de l'exposition et les biomarqueurs de sensibilité aux effets provoqués par l'exposition [7, 26].

Les biomarqueurs d'exposition indiquent que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme. Généralement, les biomarqueurs d'exposition sont le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans des tissus et/ou dans des liquides corporels (métabolites spécifiques de la conjugaison au glutathion, adduits à l'ADN, etc.) [7]. Dans ce cas, leur suivi consiste en la détection au sein d'un individu de métabolites issus de la métabolisation du xénobiotique ou de produits issus de son interaction avec certaines biomolécules ou cellules cibles [13].

L'utilisation des biomarqueurs d'effet permet de montrer que le xénobiotique est entré dans l'organisme et, qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, a exercé un effet toxique sur une cible critique [7]. Il s'agit donc d'altérations (biochimiques, physiologiques ou autres) mesurables au sein des tissus ou des fluides corporels d'un organisme et pouvant être reconnues comme étant associées de manière avérée statistiquement ou possible du point de vue mécanistique à une pathologie ou un état sanitaire altéré [26, 195].

Les biomarqueurs de sensibilité indiquent quant à eux la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre au stress induit par l'exposition à un xénobiotique. Cette catégorie de biomarqueurs peut donc notamment inclure des facteurs génétiques [7].

Cependant, et d'après Amiard *et al.*, [19] cette classification des biomarqueurs ne recouvre pas toujours précisément les mêmes définitions selon les auteurs, ce qui a amené certains écotoxicologues à préférer la division proposée par De Lafontaine *et al.*, contrastant les biomarqueurs de défense et les biomarqueurs de dommage.

Parmi les biomarqueurs de défense, on comprend entre autres la métallothionéine, les enzymes de biotransformation des HAP et des PCB et les défenses antioxydantes enzymatiques qui sont des systèmes de détoxification ou de dégradation et dont leur teneur augmente en présence de contaminants dans le milieu [125]. *A priori*, ces mécanismes de défense ont un impact tout à fait positif sur la santé des organismes puisqu'ils vont leur permettre de survivre dans un environnement détérioré. En effet, dans des zones fortement contaminées, de nombreuses espèces de plantes et d'animaux sont capables de faire face à la présence de substances chimiques potentiellement toxiques. Le concept de « coût de tolérance » pose l'hypothèse que la capacité à résister à un xénobiotique présente une dépense d'énergie pour l'organisme, ce qui implique une diminution de l'énergie disponible pour ses autres besoins, c'est-à-dire le métabolisme de base, la croissance et la reproduction [19].

Les biomarqueurs de dommage traduisent une atteinte biologique plus ou moins importante pouvant conduire à une incapacité à se reproduire, voire à survivre. L'importance des effets néfastes en fonction du degré de contamination du milieu est quantifiée par la relation dose/effet. Aux doses les plus faibles, aucun effet néfaste n'est observé mais lorsque la dose augmente, une réponse biologique va apparaître et s'amplifier [19].

II4.1.3/- Qualités requises

Un biomarqueur doit être un indicateur sensible de la biodisponibilité d'un polluant et de réponses biologiques précoces. De manière à évaluer objectivement les qualités des biomarqueurs, les critères ci-dessous sont généralement admis [26] :

- La technique analytique permettant de quantifier le biomarqueur doit être efficace (en termes de sensibilité, justesse et précision), d'un coût relativement peu élevé et facile à mettre en œuvre ;
- La réponse doit être sensible pour constituer un paramètre d'alarme précoce ;
- Le niveau basal de la variable biologique doit être clairement identifié de manière à distinguer le bruit de fond naturel (variabilité naturelle) du niveau induit par la contamination (signal) ;
- Les mécanismes impliqués dans la relation entre la réponse du biomarqueur et l'exposition au polluant doivent être connus ou, tout au moins, supposés ;
- La signification toxicologique du biomarqueur (c'est-à-dire la relation entre sa réponse et un impact possible sur l'organisme) doit être établie.

A cela il faut ajouter qu'un biomarqueur mesuré au niveau individuel ne trouve sa signification écotoxicologique que lorsqu'il permet de décrire, d'expliquer, voire même éventuellement de prédire les effets des polluants sur les populations et communautés évoluant dans leur environnement naturel [7]. Cette exigence n'est pourtant que rarement satisfaite, les biomarqueurs sont alors étudiés plus pour leur contribution à la compréhension mécanistique de l'action des polluants que pour leur pertinence écologique [6-8].

En plus de ces critères, il a été suggéré que les biomarqueurs doivent être préférentiellement des outils dont l'utilisation s'avère non-invasive ou destructive pour les organismes, de façon à permettre leur mesure sur des espèces protégées voire en voie de disparition [8, 19]. Les caractéristiques biologiques et physiologiques de l'organisme modèle doivent enfin être connues, de manière à ce que les sources de variations non contrôlables (croissance, développement, reproduction, etc.) soient minimisées [13, 19].

Toutefois, l'utilisation la plus courante des biomarqueurs, en particulier en milieu marin (dans le cadre de conventions internationales pour la Méditerranée), est la surveillance à long terme de l'exposition des organismes à des contaminations biodisponibles, sur organismes autochtones ou sur organismes implantés, voire la recherche de causes de pollution. Toujours en milieu marin, les biomarqueurs ont été envisagés comme une contribution efficace à la classification des écosystèmes pour justifier d'une situation impactée en partie par une pression toxique [196].

II.5/- Etude du stress oxydant : Le système antioxydant cellulaire

L'origine du stress oxydant chez les organismes aérobies provient de la consommation intracellulaire de la molécule d'oxygène qui est essentielle pour de nombreuses fonctions physiologiques mais qui génère dans le même temps la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou « *Reactive Oxygen Species* » (ROS) qui sont potentiellement toxiques pour la cellule [19, 197].

Le terme d'espèces réactives de l'oxygène (communément appelées ROS en anglais) inclut les différentes formes actives de l'oxygène (comme le radical hydroxyle (OH[•]) ou l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), ainsi que les espèces radicalaires qui peuvent en être les initiateurs [13].

La réactivité des ROS, peut être à l'origine d'effets biologiques néfastes. Toutefois, la formation d'espèces réactives ne s'accompagne pas systématiquement de phénomènes de toxicité. En particulier, certaines espèces réactives sont des intermédiaires de processus physiologiques normaux (respiration cellulaire ou les phénomènes inflammatoires) [13, 198].

Les principales sources de production des ROS proviennent de la phosphorylation oxydative de l'ADP, des chaînes de transport d'électron microsomales, de l'activité phagocytaire et de l'activité de certaines enzymes oxydantes comme la tryptophane dioxygénase, la xanthine oxydase et la cytochrome P450 réductase qui produisent des anions superoxydes et comme la guanyl cyclase et la glucose oxydase capables de générer du peroxyde d'hydrogène [19, 197]. Ainsi, les cellules des êtres aérobies, en état d'oxydoréduction normal, ont une concentration basale en radicaux libres de l'oxygène non nulle. Du fait de leur très grande réactivité, ces dérivés de l'oxygène peuvent réagir avec la plupart des composés cellulaires. Le contrôle rigoureux de leur formation et de leur élimination par le biais de différents systèmes antioxydants préserve donc les cellules de leurs effets délétères [13, 19].

Par ailleurs, les polluants chimiques sont d'importants producteurs de ROS. En effet, les xénobiotiques connus pour leurs propriétés redox comme les quinones, les métaux de transition (fig II.2), les HPA, les colorants diazoïques, les herbicides bipyridyles et les composés aromatiques nitrés induisent la formation de radicaux superoxydes [19, 192].

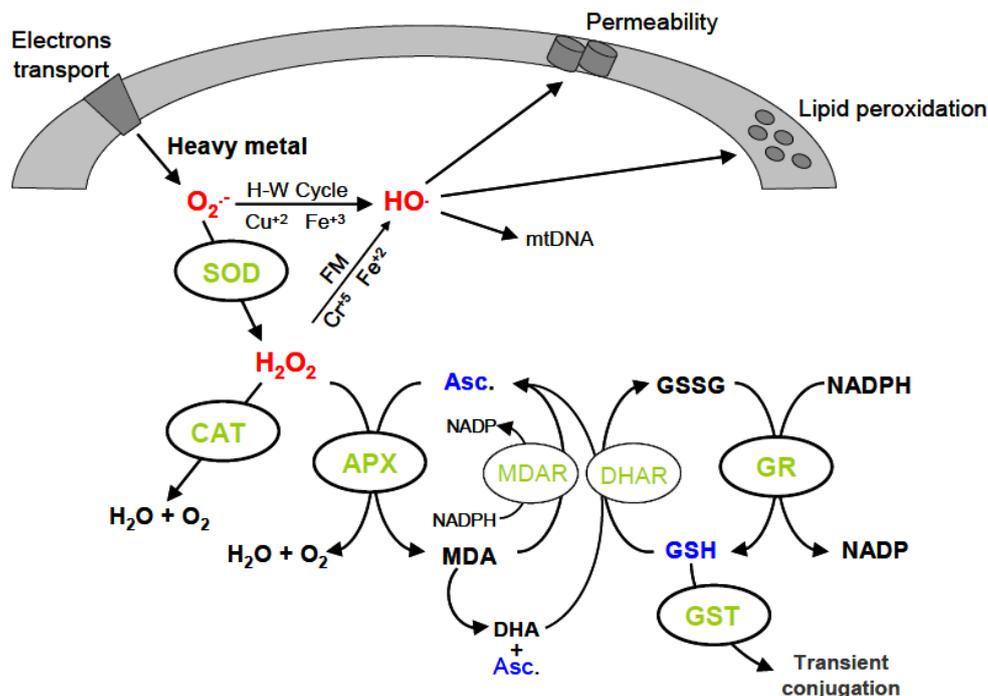
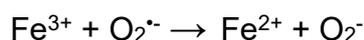


Figure II.2 : Effets des métaux sur la génération cellulaire de ROS dans les algues et les activités enzymatiques antioxydantes (AEA).

Les ROS sont en rouge, les AEA en vert et les molécules antioxydantes en bleu. Abréviations : radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), radical hydroxyle (HO^{\cdot}), cycle Haber-Weiss (cycle H-W), mécanisme de Fenton (FM), superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxydase (APX), monodéhydroascorbate (MDA), MDA réductase (MDAR), ascorbate (Asc.), glutathion réductase (GR), disulfure de glutathion (GSSG), glutathion (GSH), glutathion-S-transférase (GST), déhydroascorbate (DHA), DHA réductase (DHAR), glutathion-S-transférase (GST), nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) et nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH).

Par exemple, les métaux de transition (notamment Fe^{2+} et Cu^{2+}), seront susceptible d'induire une réduction du peroxyde d'hydrogène intracellulaire, induisant ainsi la formation d'un ion hydroxyle (OH^{\cdot}) mais également d'un radical hydroxyle [13, 199].

Cette réaction d'oxydoréduction est alors tout à fait similaire à la réaction de Fenton qui, dans le cas du fer, se décompose ainsi :



Pour pouvoir maîtriser la formation de ces espèces réactives, les cellules disposent d'un complexe antioxydant de défense (fig II.3) constitué d'enzymes spécifiques (Superoxyde dismutase, Catalase, Glutathion peroxydase) et de molécules qui piègent les espèces radicalaires au niveau des membranes (vitamine E, β -carotène) ou de la phase aqueuse (acide ascorbique, acide urique et glutathion) [19, 197].

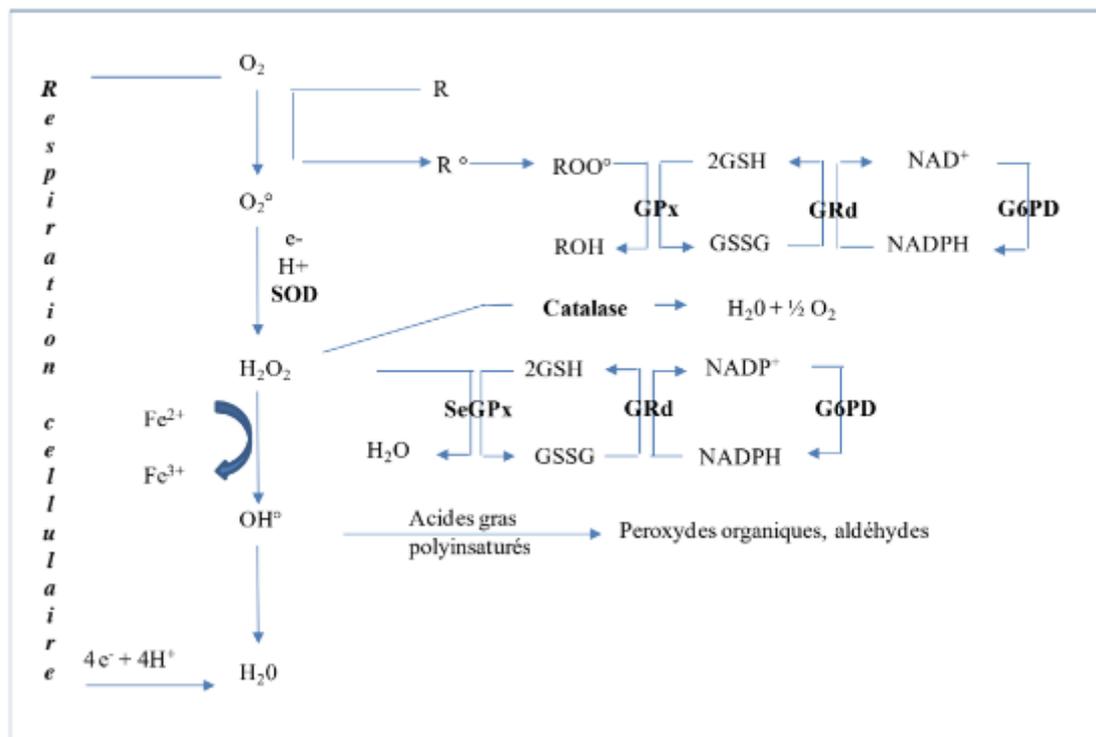


Figure II.3 : Place des systèmes antioxydants dans la neutralisation des ROS (endogènes et exogènes) dans les cellules animales [192].

On définit le stress oxydant lorsque la formation des ROS excède les capacités de défense du système antioxydant. Au niveau cellulaire, il se traduit par l'altération et plus particulièrement l'oxydation des composants tels que l'ADN, les protéines et les lipides et par une perturbation généralisée de la balance redox (ratios GSH/GSSG et NADH/NAD⁺). Ses effets cytotoxiques se traduisent par des perturbation structurales et fonctionnelles comme des inhibitions enzymatiques, des dégradations des protéines, de la peroxydation lipidique, des processus inflammatoires et des phénomènes de morts cellulaires (fig II.4) [19, 192, 197].

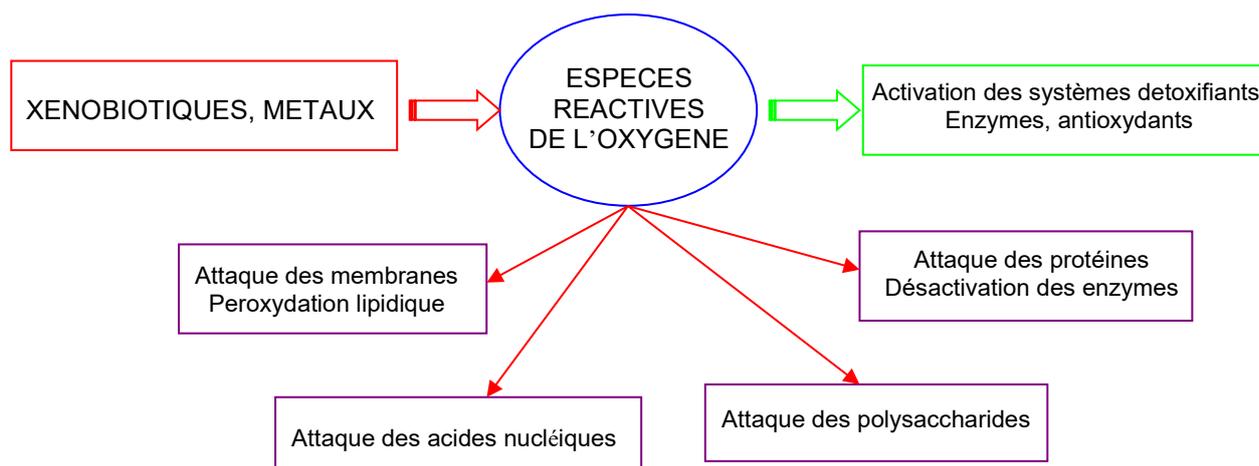


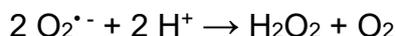
Figure II.4 : schéma général des dommages provoqués par les espèces réactives de l'oxygène sur les macromolécules [197].

Les marqueurs de stress sont des signaux cellulaires à l'échelle moléculaire, biochimique ou physiologique dont les caractéristiques structurales ou fonctionnelles peuvent être rapidement modifiées à la suite de contraintes environnementales ou de l'exposition à des polluants [200]. Comme dit précédemment, la formation d'oxydants et le déficit de l'action des antioxydants sont des signes potentiels de toxicité et ils constituent donc des indicateurs précoces d'une agression toxique. C'est pourquoi, la mesure de ces paramètres peut s'avérer pertinente pour évaluer le niveau de toxicité chez les organismes. En effet, parmi les différentes réponses biochimiques, l'induction des enzymes antioxydantes est l'une des méthodes les plus largement acceptées pour la détection d'une pollution en milieu aquatique [137].

De fait, la mesure des enzymes antioxydantes peut donner une indication du statut antioxydant de l'organisme et peut ainsi être utilisée en tant que biomarqueur du stress oxydant. L'intérêt majeur des paramètres antioxydants en tant que biomarqueurs réside dans le caractère aspécifique de leur réponse, ce qui constitue un avantage dans le contexte de la contamination multiple des écosystèmes [7, 180, 199, 201].

II.5.1/- Les superoxydes dismutases (SOD)

Ces enzymes antioxydantes conventionnellement appelées EC 1.15.1.1 regroupent des métalloenzymes capables de dismuter l'anion superoxyde selon la réaction suivante [13, 197, 202] :



Ces enzymes possèdent au niveau de leur site actif un métal de transition (qui peut être le cuivre, le manganèse, ou le fer) qui va capter un électron de l'anion superoxyde et le transférer au noyau imidazole de l'une des histidines du site actif. Chaque métal présent au site actif va conférer des propriétés particulières à la SOD, notamment en terme de localisation dans la cellule [197]. Trois sortes de SOD sont ainsi identifiées dans la cellule la SOD à cuivre et à zinc (Cu/ZnSOD) que l'on retrouve dans le cytosol, la Cu/ZnSOD qu'on retrouve au niveau des liquides extracellulaires et la SOD à fer et à manganèse (Fe/MnSOD) qui se trouve dans les mitochondries [202].

II.5.2/- La catalase (CAT)

Cette enzyme cytosolique appelée conventionnellement EC 1.11.1.6 est une hémoprotéine tétramérique (240000 daltons) dont chaque sous unité contient un groupement hémique avec Fe^{3+} lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH, H^+ qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène. La dissociation des sous unités résulte en une perte de l'activité catalase. C'est une enzyme importante dans le système de défense antioxydant protégeant les organismes contre un stress oxydatif. Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante [197, 198, 203] :



Elle limite ainsi la formation de radicaux OH^{\cdot} . La plupart des cellules aérobies contiennent cette enzyme dans le cytosol et dans les peroxysomes. Elle est présente à de fortes concentrations dans le foie et dans les globules rouges [202].

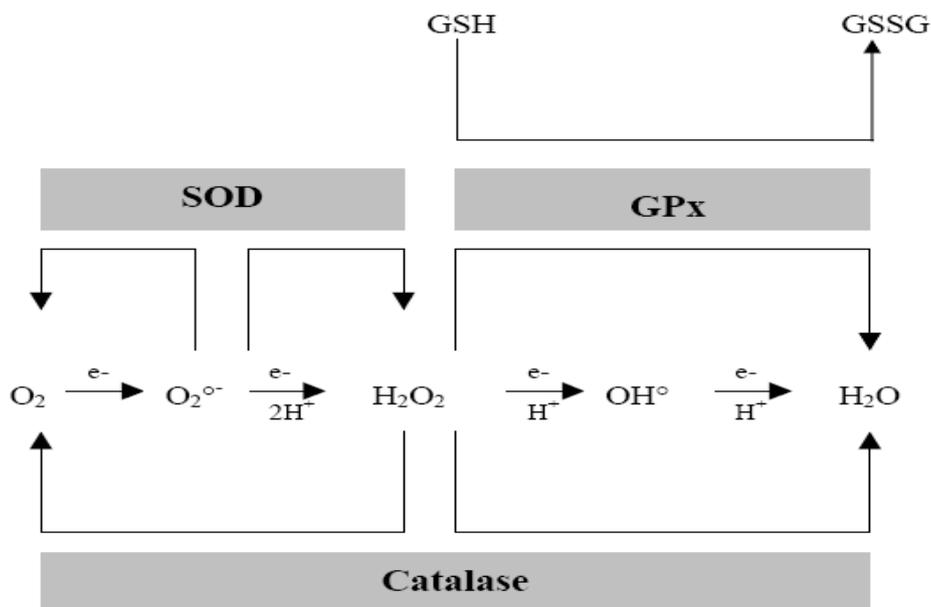
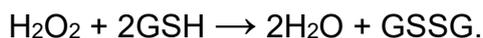


Figure II.5 : Schéma représentant les réactions catalysées par les 3 principales enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT) [202].

La catalase fonctionne en association avec la superoxyde dismutase (fig II.5), c'est pourquoi les réponses de leur activité enzymatique présentent souvent les mêmes tendances. Les augmentations de l'activité catalasique sont cependant plus nettes et plus précoces que celles de la superoxyde dismutase [137].

II.5.1.3/- Les glutathion peroxydases (GPx)

Enzyme à sélénium présente à la fois dans le cytosol et la mitochondrie, transforme le peroxyde d'hydrogène mais aussi les peroxydes lipidiques. Le peroxyde d'hydrogène et les lipoperoxydes sont réduits en présence de glutathion. Deux molécules de glutathion cèdent deux H au peroxyde d'hydrogène. Les deux glutathions forment une liaison disulfure alors que le peroxyde d'hydrogène donne deux molécules d'eau [202].



Ces peroxydases sont également capables de réduire les peroxydes membranaires issus de l'oxydation des acides gras et du cholestérol, selon le schéma réactionnel suivant [13] :



Parmi ces enzymes, on distingue : la glutathion peroxydase sélénium dépendante (SeGP_x) ou EC 1.11.1.9 est une métalloprotéine tétramérique dont chaque sous unité contient un atome de sélénium et qui joue un rôle majeur dans la lutte contre les processus de lipoperoxydation endogène et exogène; la phospholipide hydroxyperoxyde glutathion peroxydase (PLGP_x) ou EC 1.11.1.12, dont le rôle principal est de protéger les liposomes et les biomembranes contre les dommages peroxydatifs et la glutathion peroxydase sélénium indépendante, qui ne réagit que faiblement par rapport aux peroxydes organiques [197, 202].

II.6/- Perturbation du métabolisme énergétique

Chez tous les organismes vivants, l'ensemble des processus biochimique et physiologiques est étroitement dépendant de la quantité d'énergie disponible au niveau cellulaire [7]. Concernant les organismes hétérotrophes, l'obtention de l'énergie est conditionnée par la prise de nourriture et la dégradation de celle-ci afin de libérer l'énergie contenue (assimilation). Une fois la nourriture ingérée, les aliments sont soumis notamment à l'action d'enzymes, par le processus de digestion qui représente l'ensemble des processus par lesquels les aliment bruts (glucides, protéines, lipides) sont transformés en des molécules plus petites assimilables, les nutriments (oses, acides aminé, acides gras) [19].

Le foie et le pancréas des vertébrés ainsi que la glande digestive ou hépatopancréas des crustacés et des mollusques jouent des rôles importants dans la digestion des aliments, en synthétisant et en sécrétant les enzymes digestives. Cependant, ces organes sont aussi la cible des contaminants chimiques qui y sont transportés pour leur détoxification. De ce fait, ils constituent les principaux sites d'accumulation des contaminants, et en particulier des contaminants métalliques, chez les animaux aquatiques [19]. Etant donné que la glande digestive ou l'hépatopancréas ont un rôle majeur aussi bien au niveau de la digestion que dans le stockage et la détoxification des composés toxiques, il semble intéressant de mieux connaître l'effet éventuel des polluants sur l'activité des enzymes digestives sécrétées par ces organes.

Par ailleurs, dans le cadre d'une évaluation de la qualité des milieux, les variations d'activités enzymatiques sont souvent une des premières réponses au stress ; elles représentent donc des points utiles dans la confirmation des effets toxiques avant que ces derniers ne soit perceptibles à des niveaux d'organisation biologiques supérieurs (cellulaire, tissulaire, physiologique) [7, 26].

Le tractus digestif peut exercer un double rôle dans le processus d'écotoxicité puisqu'il constitue à la fois une voie d'absorption et un site d'action potentiel pour les toxiques. Par leur présence dans le tractus digestif, les activités enzymatiques sont susceptibles d'être influencées par les toxiques, et par conséquent d'entraîner des répercussions sur l'ensemble du processus digestif nécessaire à l'obtention d'énergie. En présence de métaux dans le milieu, des réponses différentes sont observées en fonction de l'espèce, de l'enzyme, de l'élément métallique ainsi que du temps et du mode d'exposition étudiés. Des exemples d'inhibition d'activité d'enzymes digestives ont également été mis en évidence lors d'exposition des organismes à des contaminants organiques [19].

Le suivi de l'impact potentiel des contaminants sur les activités des enzymes digestives est un paramètre intéressant présentant une pertinence écologique forte, car elles jouent un rôle crucial sur les processus d'assimilation de la nourriture. Une diminution de la digestion pourra résulter en une diminution de la croissance et de la reproduction avec un impact possible sur le maintien de la population. La mesure de ces variations d'activités enzymatiques a ainsi été proposée par plusieurs auteurs comme biomarqueurs d'exposition [19, 204].

II.7/- Avantages et limites de l'utilisation des biomarqueurs

Les biomarqueurs sont des outils mis en œuvre pour établir un diagnostic de risque environnemental. Ils constituent un signal précoce de l'effet de la contamination sur les organismes. Leurs usages et leur intérêt dans la détermination du risque environnemental sont devenus incontournables. Toutefois, le manque de connaissance sur les mécanismes physiologiques et fonctionnels et le comportement de certains organismes aquatiques sentinelles utilisés limitent fortement l'utilisation optimale de ces outils [34].

L'utilisation de biomarqueurs peut être très pertinente dans certaines situations mais moins fiable dans d'autres, ce qui peut conduire à des diagnostics incorrects. Un seul biomarqueur ne peut pas représenter tous les contaminants présents dans les écosystèmes, qui peuvent perturber la santé des organismes vivants. Afin de tenir compte de la diversité des contaminants et de leurs effets multiples, il est devenu nécessaire d'adopter une approche multi-biomarqueurs, utilisant la mesure de plusieurs biomarqueurs complémentaires [34, 205, 206].

Les biomarqueurs sont principalement utilisés pour évaluer les risques écotoxicologiques en identifiant la signature biologique de l'impact ou de la présence d'un contaminant dans un organisme vivant. Cependant, il n'existe pas de biomarqueur parfait et universel. Un biomarqueur peut être très pertinent dans certaines circonstances mais peu fiable dans d'autres, pouvant même conduire à un diagnostic incorrect. La pertinence d'un biomarqueur varie selon divers paramètres, rendant impossible toute généralisation de son efficacité dans toutes les situations clairement définies [207, 208].

Les mélanges de substances et les contaminations multiples impliquent de potentiels synergies et antagonismes, ce qui complexifie déjà grandement la compréhension des faits. Néanmoins, de nombreux autres facteurs sont susceptibles d'influencer la physiologie d'un organisme et donc la réponse d'un biomarqueur [207].

Parmi ces facteurs, il est notamment distingué des variables intrinsèques telles que l'âge, le sexe, le statut reproducteur et les caractéristiques génétiques de l'espèce sentinelle. De plus, d'autres facteurs externes influencent la réponse des biomarqueurs, incluant des interactions biotiques comme la compétition intra- ou interspécifique, la prédation et le parasitisme, ainsi que des facteurs abiotiques tels que la température et la salinité [209, 210].

Si l'influence de ces facteurs peut être partiellement réduite ou, à défaut, bien comprise dans des conditions contrôlées, interpréter la réponse des biomarqueurs en milieu naturel devient nettement plus complexe. Ainsi, malgré des efforts constants de standardisation, il reste généralement impossible de définir une gamme de réponses pouvant être considérée comme « normale » pour un organisme [34, 207, 211, 212].

Pour résumer, le tableau ci-dessous regroupe certain nombre d'avantages et de limitations liés à l'utilisation de biomarqueurs.

Tableau II.2 : Avantages et Inconvénients liés à l'utilisation de biomarqueurs.

<i>Avantages de l'utilisation des biomarqueurs</i>	<i>Inconvénients de l'utilisation des biomarqueurs</i>
Les composantes moléculaires, biochimiques ou cellulaires sont plus sensibles et moins variables ;	Les facteurs biotiques et abiotiques normaux peuvent également modifier l'expression des biomarqueurs ;
Les altérations moléculaires et biochimiques sont les premières réponses observables ;	Chevauchement entre un état toxique anticipé et certains aspects de la gamme de morphologie normale ;
Les biomarqueurs peuvent servir d'indicateurs d'effet dans les organismes.	Difficulté de relier les réponses biochimiques à la santé de l'organisme et à des effets adverses sur la population.

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODES : STRATEGIE EXPERIMENTALE, DISPOSITIFS ET METHODES ANALYTIQUES

III.1/- Introduction

Dans le but d'utiliser des outils biologiques pour la gestion, l'exploitation et la surveillance des écosystèmes aquatiques côtiers, deux espèces, la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* et la moule africaine *Perna perna*, ont été employées. Cela vise à mieux comprendre les thèmes de recherche de l'écotoxicologie moderne, tant en laboratoire qu'*in situ*. L'objectif principal est de contribuer à la recherche de biomarqueurs comme réponses précoces, fournissant des informations intégrées sur l'état des écosystèmes aquatiques ainsi que sur les phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification.

Dans la première partie de cette étude, nous avons réalisé plusieurs séries de tests d'écotoxicité en utilisant divers types de contaminants chimiques ainsi que des effluents réels provenant de différentes activités générant des rejets directs en mer. La démarche adoptée est la suivante :

- A/- Etude de l'effet des ETM (essentiels et non essentiels) sur les réponses biologiques des bivalves (*Mytilus galloprovincialis*, *Perna perna*) en tant qu'espèces sentinelles ;
 - A.1/- Effet des ETM (Cu^{2+} , Cd^{2+} et Pb^{2+}) : test contamination courte durée ;
 - A.2/- Effet de l'exposition chronique au cuivre : test de contamination/décontamination ;
- B/- Etude de l'effet des polluants organiques sur les réponses biologiques des espèces sentinelles : Cas du Phénol et des colorants chimiques (Vert de Malachite et Rouge Congo) ;
- C/- Etude de l'effet des effluents réels sur les réponses biologiques des espèces sentinelles : Cas d'un rejet industriel, d'effluent portuaire et d'un rejet d'une station de dessalement ;
- D/- Etude de l'effet combiné de contamination par un effluent industriel avec l'élévation de la température : Simulation du changement climatique.

L'étude *in situ* constituait l'objectif de la deuxième partie de ce travail, en adoptant une approche de biosurveillance passive. Nous avons ainsi procédé à :

- E/- L'utilisation de l'approche passive de biosurveillance des eaux côtières : cas de la baie d'Alger et de la baie de Zammouri.

Partie I

TESTS D'ECOTOXICITE

Les différentes expérimentations des tests d'écotoxicité ont été conduites et réalisées au centre pilote de conchyliculture de CNRDPA-Boulsmail (voir annexe). Les dosages chimiques et biochimiques de la protéase, de la catalase et des protéines ont été effectués au laboratoire siège d'analyse physicochimique du CNRDPA (voir annexe).

III.2/- Echantillonnage, transport et mise en adaptation des bivalves

L'échantillonnage des moules avait pour origines différents sites d'approvisionnement selon les cas de l'étude sus-cités. La carte ci-dessous illustre les différentes localités d'échantillonnage de la présente étude.

Le premier site (S1) est une ferme mytilicole située à Ain tagourait (wilaya de Tipasa), à environ 1km de la côte et à une profondeur de 7 m, où les pochons de moules sont installés. Le deuxième site (S2) est une moulière indigène, située sur un îlot près de la plage de la ville de Figuier, wilaya de Boumerdès, avec les coordonnées géographiques suivantes : latitude 36°46'05.38" Nord et longitude 3°28'37.92" Est. Ce gisement est abondant et éloigné des activités industrielles et urbaines. Enfin, sur les bouées de balisage en mer (S3) de la station de dessalement de Fouka Marine, une biomasse importante de moules s'est installée, et nous avons utilisé les individus capturés pour nos expériences.

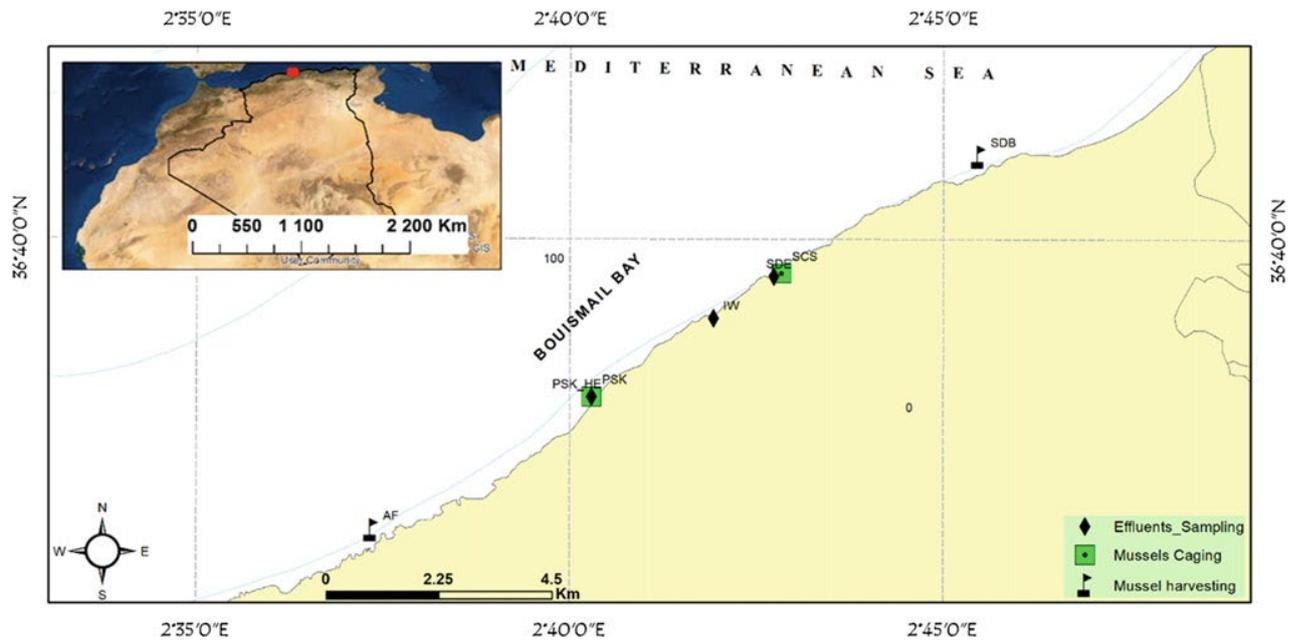


Figure III.1/- Les différentes localités d'échantillonnage de la présente étude.

La collecte des moules est procédée en prenant soin à ne pas altérer la vitalité des animaux. Une première appréciation de la taille permet de ne sélectionner garder que les moules de la même classe de taille. Les moules, ainsi récoltées, sont transportées dans une glacière étanche et hermétique remplie d'eau de mer du milieu où elles vivaient, et ce, dans les meilleurs délais. Une fois au laboratoire, les moules sont triées, nettoyées, débarrassées de leur épibiontes, et mesurées à l'aide d'un pied à coulisse avant d'être mises en période d'adaptation.

Après le tri, les spécimens sont transférés dans des bacs d'élevage (unités expérimentales de 70L) remplis avec de l'eau de mer aérée, pour réduire l'effet du stress dû au transport.

Une période de stabulation de 15 jours a été respectée avant tous test de contamination afin d'acclimater les moules aux nouvelles conditions au laboratoire. Pendant cette phase d'acclimatation, l'eau des bacs (eau d'élevage) est renouvelée chaque jour.

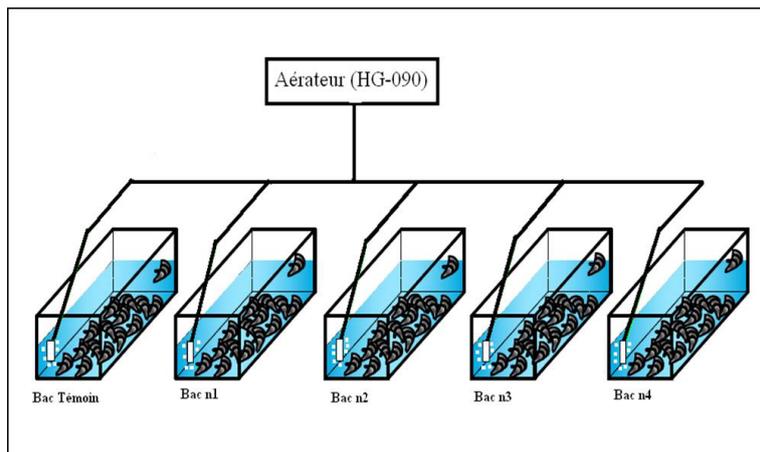


Figure III.2 : Schéma du dispositif expérimental.

Contre un Bac témoins, sont utilisés des Bacs de contamination selon le cas d'étude.

En effet, l'acclimatation est une étape cruciale dans la mise en place d'une expérimentation puisqu'elle doit couvrir une période suffisante pour que les organismes s'adaptent aux conditions de laboratoire. Il est généralement admis qu'un maintien au laboratoire durant une période minimale de deux semaines après réception des organismes est nécessaire à l'adaptation de ces derniers au nouvel environnement que constitue le dispositif expérimental [13]. Nous sommes donc partis de cette valeur.

De plus, pour garantir que les polluants chimiques testés sont le seul facteur stressant, nous avons veillé à minimiser autant que possible les autres facteurs exogènes susceptibles de perturber ou d'interférer avec les résultats. Sur cette base, nous avons donc :

- Sélectionné des moules de même classe de taille afin de réduire la variabilité des réponses liées aux différences individuelles ;
- Vérifié la qualité bactériologique des moules utilisées comme modèle biologique ainsi que celle de l'eau de mer utilisée dans l'élevage, afin d'exclure l'effet des pathogènes ;
- Contrôlé les teneurs en sels nutritifs de l'eau de mer prélevée pour pallier les sources de perturbations et/ou de fluctuation exogènes ;
- Mesuré les paramètres physicochimiques de l'eau d'élevage (température, salinité, oxygène dissous et pH) avant et après chaque changement d'eau à l'aide d'un multiparamètre, pour garantir des conditions d'incubation optimales pour les individus.

Par ailleurs, les aquariums utilisés ont des surfaces ouvertes en contact direct avec l'air ambiant, ce qui peut entraîner une contamination de l'eau par la sédimentation de fines particules de poussière présentes dans l'atmosphère. Les microorganismes peuvent facilement se fixer sur ces particules solides, l'air servant de vecteur pour leur transport. L'environnement des aquariums évolue rapidement, et les débris d'excréments des moules se déposent au fond, formant un tapis en décomposition propice au développement bactérien. De plus, l'augmentation des concentrations en éléments nutritifs minéraux dissous, tels que les composés azotés issus de l'excrétion des moules, peut entraîner des effets toxiques et provoquer la mort des spécimens.

Ainsi, le renouvellement quotidien de l'eau des aquariums visait non seulement à réduire les pertes de polluants et les effets toxiques des composés azotés, mais aussi à maintenir une bonne qualité microbiologique de l'environnement des moules. De plus, le renouvellement de l'eau d'élevage contribue à régénérer la valeur nutritionnelle de l'eau de mer, qui constitue la seule source de nourriture pour nos spécimens.

III.3/- Effet du Cuivre (Cu^{2+}), Cadmium (Cd^{2+}) et Plomb (Pb^{2+}) : test courte durée

❖ **Partie I : Première série d'expérience**

Dans cette section, la stratégie des tests d'écotoxicité aiguë consiste à exposer les deux espèces de moules, *Perna* et *Mytilus*, à quatre concentrations différentes de cuivre (Cu^{2+}) : C1 à $5\mu\text{g/L}$, C2 à $15\mu\text{g/L}$, C3 à $25\mu\text{g/L}$ et C4 à $35\mu\text{g/L}$. La durée d'exposition est de 4 jours, et l'expérience inclut des bacs témoins avec une concentration de $0\mu\text{g/L}$ pour autocontrôle.

Les moules *Mytilus*, mesurant entre 40 et 55mm, sont collectées à la ferme aquacole EAM à Aintagouraitte (voir figure ci-dessus), tandis que les moules *Perna*, mesurant entre 45 et 55mm, proviennent d'un gisement naturel situé sur un îlot près de la plage de Figuier, dans la wilaya de Boumerdès (voir figure III.1, S3).

Le schéma ci-dessous illustre la démarche adoptée, ainsi que les analyses et les suivis effectués.

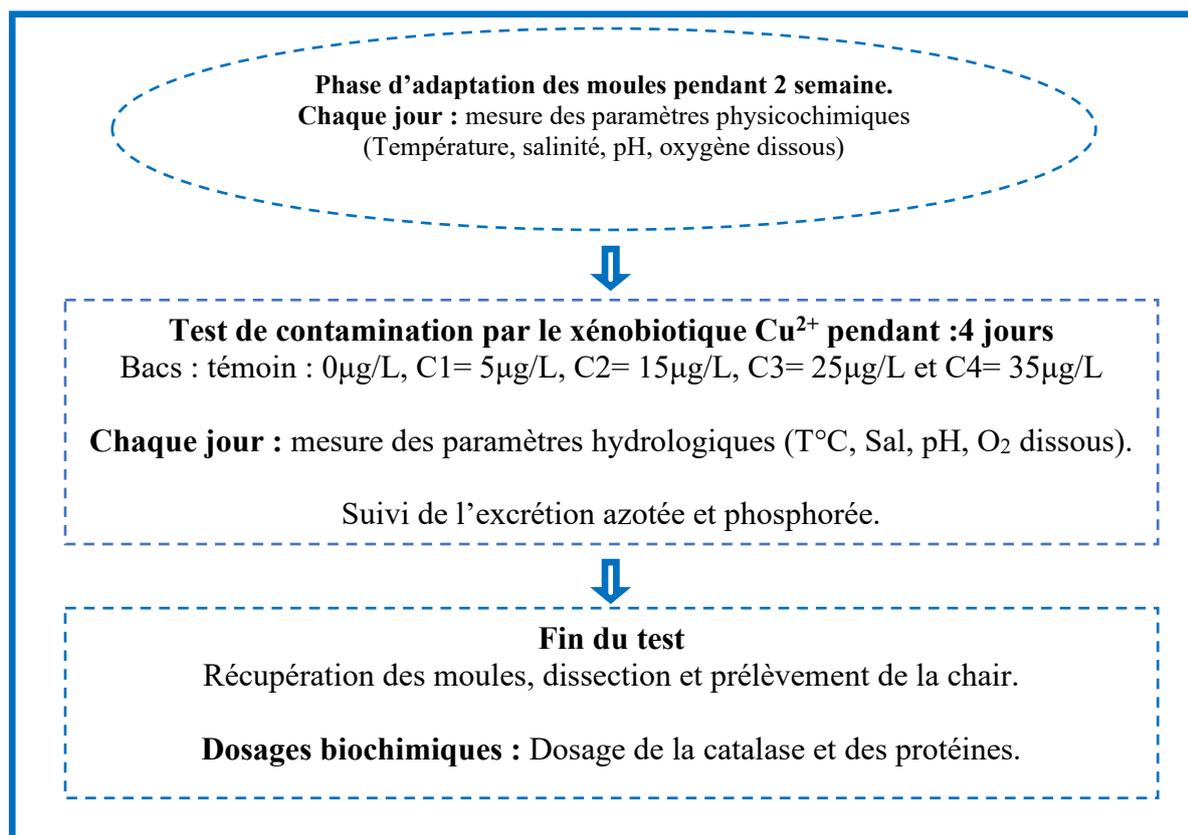


Figure III.3 : Planning expérimental des tests d'écotoxicité courte durée.

Pour évaluer l'effet des métaux non essentiels sur les réponses biologiques des bivalves, les moules *Perna* sont cette fois exposées à quatre concentrations différentes de Pb²⁺ et Cd²⁺ : C1 à 50µg/L, C2 à 100µg/L, C3 à 250µg/L et C4 à 500µg/L.

L'excrétion des moules est contrôlée chaque jour, alors que les dosage biochimique (protéines et catalase) sont effectuée à la fin de cycle d'exposition de 96h (fig III.3).

❖ **Partie II : Deuxième série d'expérience**

Dans la première partie des tests de courte durée (96 heures) sur l'effet des métaux traces (ETM), nous avons étudié les relations dose-réponse entre la pression chimique exercée, représentée par les différentes concentrations de xénobiotiques (Cu²⁺, Cd²⁺ et Pb²⁺), et les réponses biologiques observées chez les moules.

Dans cette deuxième partie, l'objectif était d'examiner l'efficacité d'un cycle de décontamination de 21 jours sur la réversibilité des mécanismes physiologiques chez la moule *Mytilus galloprovincialis* après une exposition aiguë à trois concentrations de cuivre (Cu^{2+}) (C1 à $30\mu\text{g/L}$, C2 à $60\mu\text{g/L}$, et C3 à $90\mu\text{g/L}$) pendant 14 jours. Les réponses enzymatiques de la catalase (CAT, enzyme antioxydante) et de la protéase (enzyme digestive) sont mesurées comme biomarqueurs de l'homéostasie, afin d'adopter une technique rapide fournissant des informations intégrées sur la santé des organismes aquatiques.

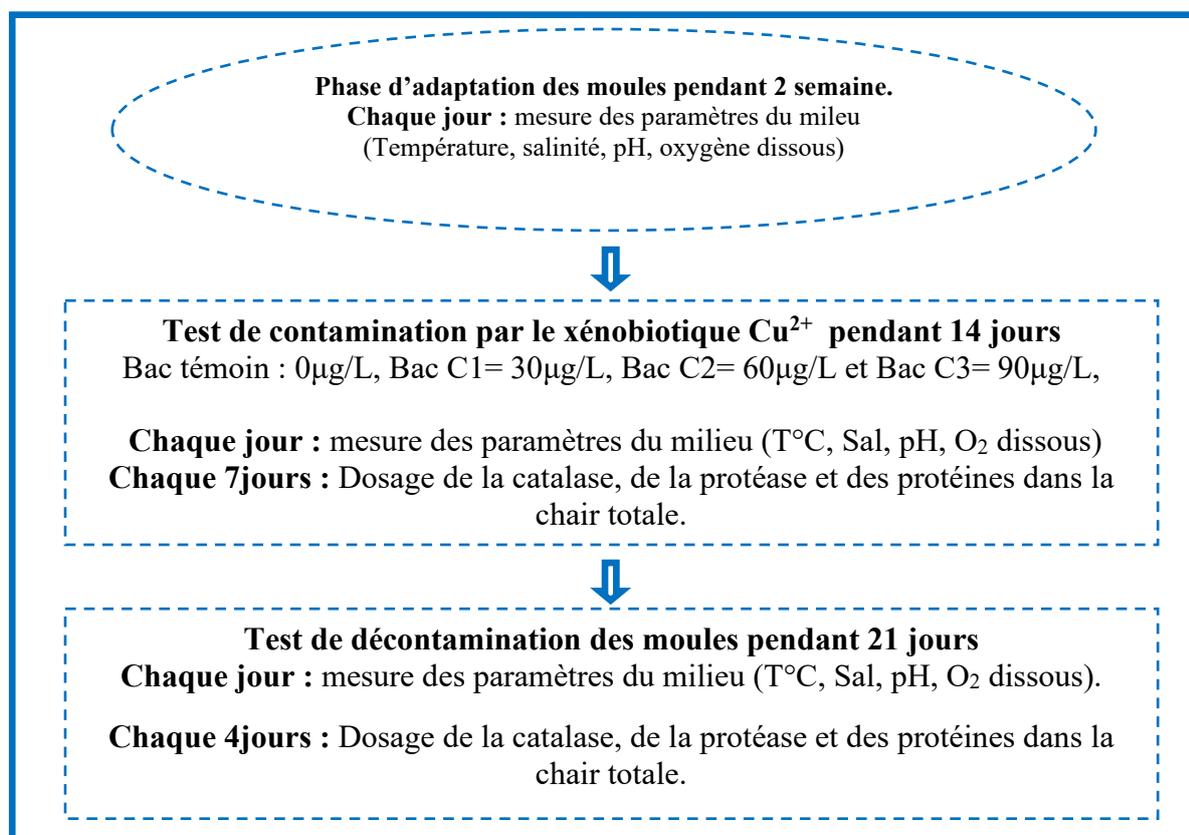


Figure III.4 : Planning expérimental du test chronique.

Pendant le cycle de contamination, les prélèvements de moules sont effectués tous les 7 jours d'exposition, tandis que pendant la période de décontamination, les échantillons sont prélevés tous les 4 jours. Quatre à cinq moules sont prélevées à chaque fois pour les dosages biochimiques des protéines, de la catalase (enzyme antioxydante) et de la protéase (enzyme digestive).

III.4/- Etude de l'effet des polluants organiques sur les réponses biologiques des espèces sentinelles : Cas du Phénol et des colorants chimiques (Vert de Malachite et Rouge Congo)

Dans la première série d'expériences, les moules des deux espèces, *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis*, sont réparties en quatre groupes de tests après la phase d'acclimatation. Toutes les moules sont maintenues dans des conditions environnementales identiques pendant 4 jours pour le cycle de contamination et 12 jours pour le cycle de décontamination (avec 0 mg/L de polluants) (voir fig. III). En comparaison avec un groupe témoin (0 mg/L de polluant), les moules sont exposées pendant 96 heures à quatre concentrations croissantes de phénol (C1 à 0,16mg/L, C2 à 0,32mg/L, C3 à 0,48mg/L et C4 à 0,64mg/L).

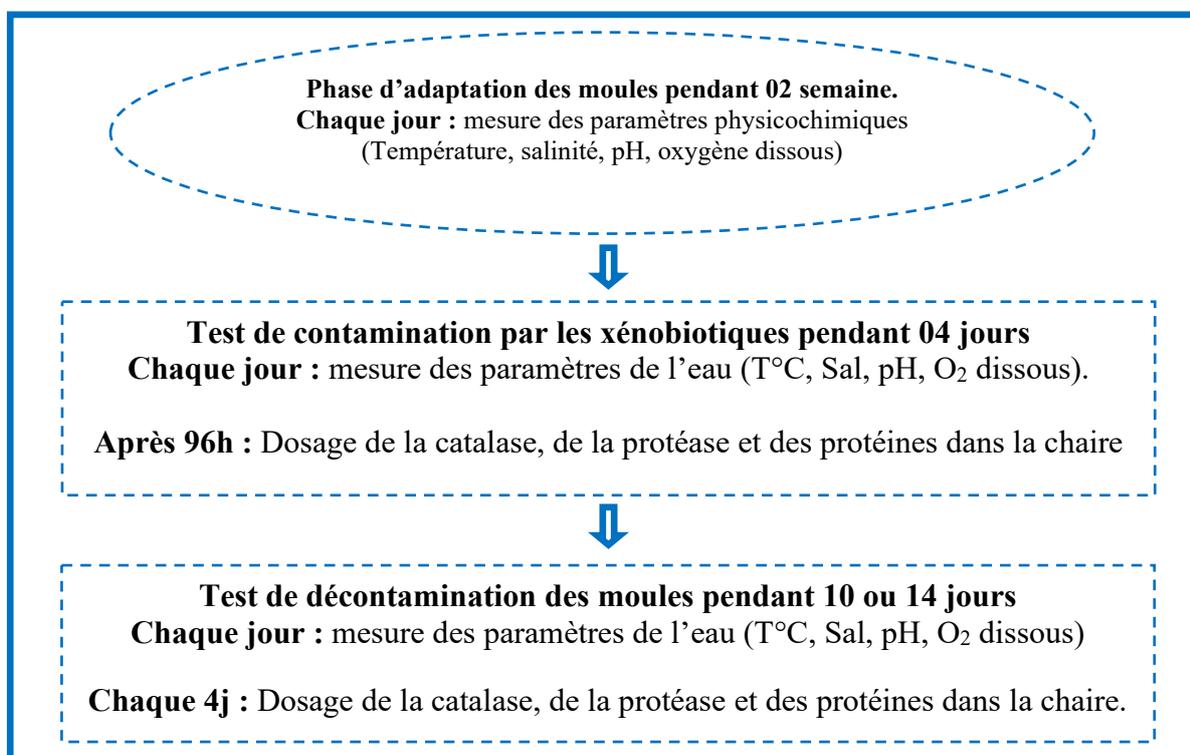


Figure III.5 : Planning expérimentale (Tests de polluants organiques).

Pendant le cycle de contamination, les prélèvements de moules sont effectués au 4^{ème} jour d'exposition. En période de décontamination, les prélèvements sont réalisés tous les quatre jours. Quatre à cinq individus de chaque espèce de moules sont prélevés pour les dosages biochimiques des protéines, de la catalase (enzyme antioxydante) et de la protéase (enzyme digestive).

Dans la deuxième série d'expériences, seules les moules de l'espèce *Perna perna* ont été exposées à deux concentrations des colorants chimiques : 0,1mg/L et 0,2mg/L. L'exposition au Vert de Malachite (VM) a duré 72 heures, tandis que celle au Rouge Congo (RC) a duré 96 heures. La même méthodologie que celle utilisée dans la première série d'expériences a été appliquée dans cette deuxième partie.

III.5/- Etude de l'effet des effluents réels sur les réponses biologiques des espèces sentinelles : Cas d'un rejet industriel (RI), d'effluent portuaire (HE) et d'un rejet de station de dessalement (DSE)

❖ **Première série de tests d'écotoxicité**

Les moules sauvages utilisées comme modèle biologique sont collectées à partir des bouées de balisage en mer de la station de dessalement d'eau de mer de Fouka Marine (voir fig. III.1). Les deux espèces de moules, *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna*, cohabitent, et l'échantillonnage cible trois classes de taille : [2,2 ; 2,8], [4,3 ; 5,2] et [7,1 ; 8,6]. Après la collecte, les moules sont triées, nettoyées, débarrassées de leurs épibiontes et mesurées à l'aide d'un pied à coulisse avant leur période d'adaptation.

La stratégie des tests d'écotoxicité consiste à exposer les deux espèces de moules, *Perna* et *Mytilus*, appartenant à différentes classes de taille (grandes, moyennes, petites), aux eaux d'un rejet industriel (RI) qui se déverse en mer. Les moules sont contaminées à différentes concentrations par dilution dans des bacs d'élevage.

Après l'étape d'acclimatation, les moules sont réparties en cinq groupes de tests dans des bacs rectangulaires de 70 litres d'eau, chaque bac contenant les deux espèces de moules avec les différentes classes de taille étudiées. Toutes les moules sont incubées dans des conditions environnementales identiques pendant 4 jours pour le cycle de contamination et 10 jours pour le cycle de décontamination (0% de polluants). Ainsi, les moules sont exposées pendant 96 heures à quatre concentrations croissantes de polluants provenant de l'eau de rejet industriel (C1 à 0,01%, C2 à 0,15%, C3 à 0,3% et C4 à 0,5% (v/v)). Un aquarium témoin (0 mg/L de polluant) est utilisé pour comparaison.

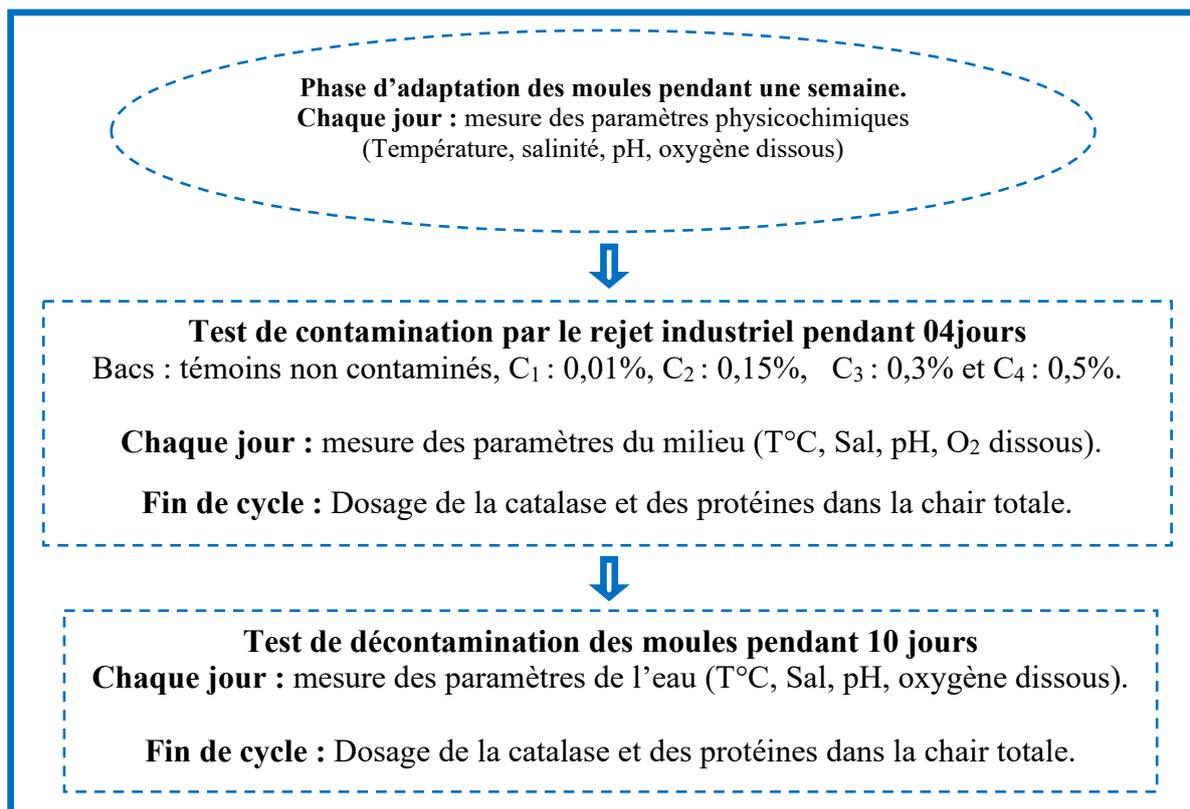


Figure III.6 : Planning expérimentale (Test de RI).

À la fin de chaque cycle, la chair des deux espèces de moules est prélevée pour faire objet des dosages biochimiques des protéines et de l'enzyme antioxydante la catalase (CAT).

❖ *Deuxième série d'expérience*

Dans la deuxième série d'expériences, nous avons choisi de travailler avec la classe de taille moyenne (moules juvéniles), jugée la plus résistante. Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour la première série de tests. Cette fois-ci, les spécimens de moules sont exposés à deux types de polluants : les rejets d'eau de la station de dessalement (DSE) de Boulsmail et l'eau provenant du site portuaire de Khemisti (HE) (voir fig. III.1). Les concentrations choisies sont de 0,15 %, 0,3 % et 0,5 %, avec une durée d'exposition de 96 heures.

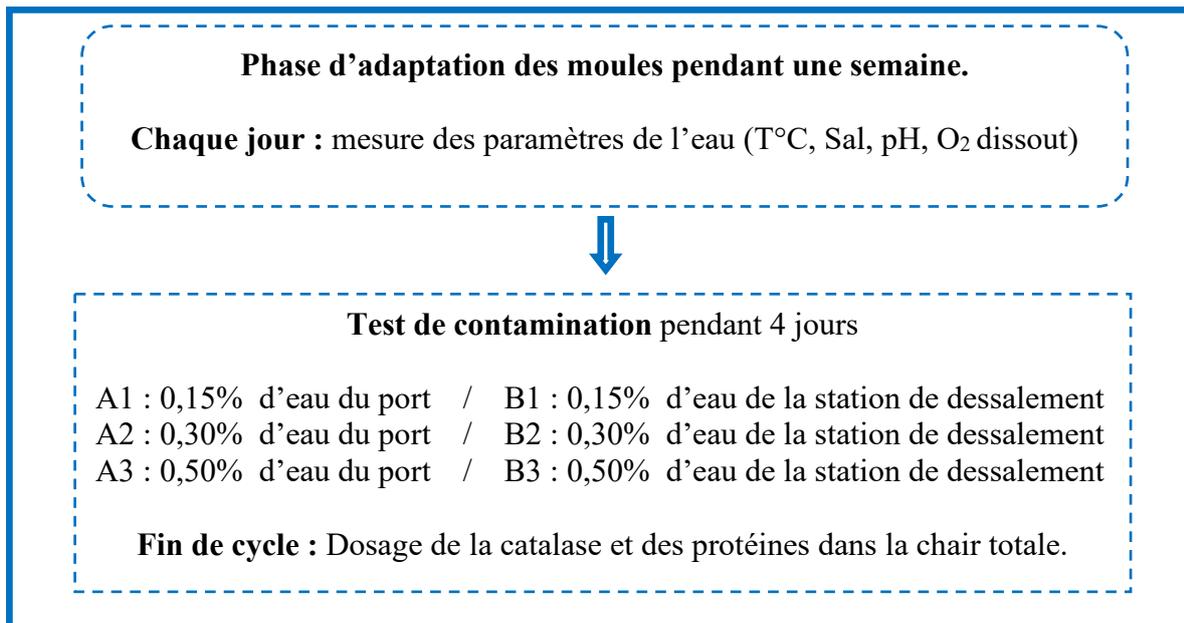


Figure III.7 : Planning expérimental (Test HE et DES).

III.6/- Etude de l'effet combiné de la contamination par un effluent industriel et de l'élévation de la température : simulation des changement globaux,

Il est connu que les différentes activités biologiques (croissance, reproduction, bioaccumulation et détoxification des polluants chimiques, réponses enzymatiques des biomarqueurs etc.), mesurées chez les bivalves, sont étroitement influencées par les facteurs abiotiques du milieu environnant [199, 201, 213-218]. Les variations de la température sont les plus remarquables surtout dans les études de simulation du changement climatique.

C'est dans cet objectif que nous avons évalué, dans cette partie des études expérimentales, l'effet de l'élévation de la température combiné avec l'exposition à un rejet industriel sur les réponses enzymatiques de la moule *Mytilus*. L'idée était de se rapprocher au maximum des conditions réelles en milieu naturel.

Les moules, *Mytilus galloprovincialis*, de classe de taille juvéniles [3,5 à 4,5 cm], utilisées pour cette expérience, proviennent de la moulière indigène du site (S1) de Figuier. Après une période d'acclimatation, les moules sont réparties en huit groupes de tests dans des bacs thermostatés.

Dans des conditions environnementales identiques, les moules sont exposées pendant 4 jours à une concentration constante d'effluent industriel (0,6% v/v) sous un gradient croissant de quatre températures différentes (18°C, 21°C, 24°C et 27°C). Des thermostats sont utilisés pour maintenir les températures voulues. La manipulation est comparée à quatre aquariums témoins (0mg/L de polluant).

A la fin du cycle expérimental, les moules sont prélevées pour les dosages biochimiques des protéines et des enzymes antioxydantes, la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD). Les moules sont ensuite disséquées, et leur chair est rapidement conservée à -80°C jusqu'au moment des analyses biochimiques.

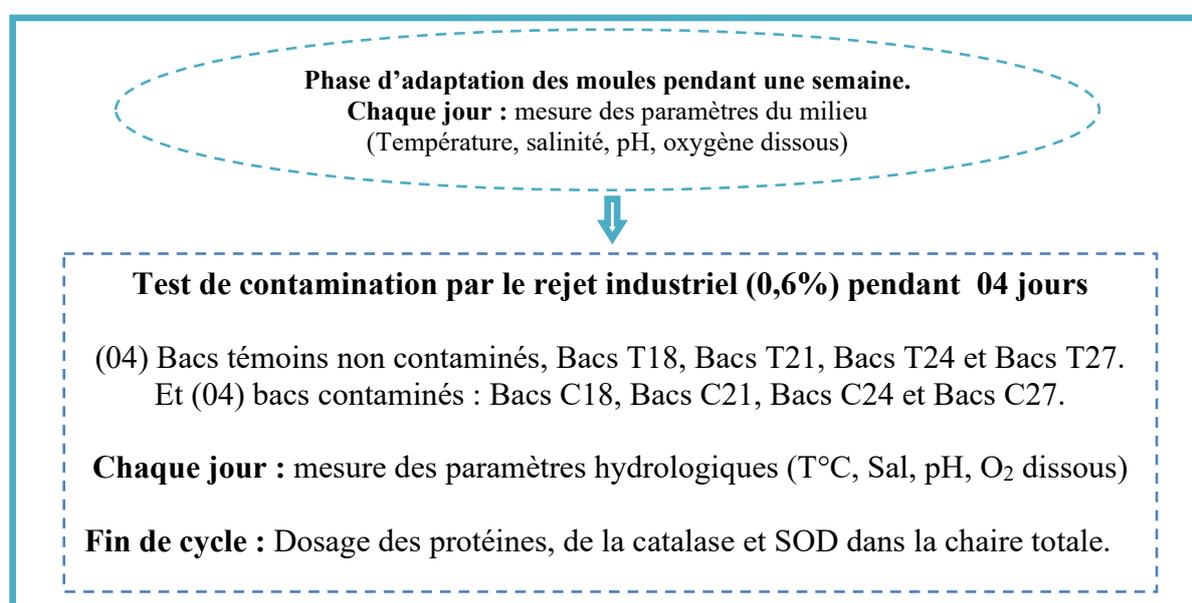


Figure III.8 : Planning expérimental des tests d'écotoxicité effet combiné (RI et T°C).

III.7/- Utilisation de la biosurveillance passive des eaux côtières : cas de la baie d'Alger et de la baie de Zammouri

Les scientifiques et les organisations internationales de surveillance de la pollution marine revendiquent l'utilisation des réponses biologiques ou des biomarqueurs comme complément aux analyses chimiques. Actuellement, une variété assez importante de biomarqueurs est recensée. Au départ un biomarqueur était qualifié comme moins coûteux, facilement mesurable, et offrant une réponse rapide, simple et efficace pour prédire les effets des micropolluants.

Nonobstant, de nos jours, certains biomarqueurs présentent une complexité bien au-delà de ces critères, ce qui rend leur intégration dans un réseau de surveillance de la qualité des eaux marines plus complexe.

Le présent travail se veut de montrer l'intérêt d'utiliser la moule *Perna perna* comme espèce biointégratrice des HAP et de germes pathogènes, tout en proposant la catalase (enzyme de défense) et la protéase (enzyme digestive) comme deux simples biomarqueurs, facilement mesurables avec des qualifications pertinentes et efficace pour les intégrer utilement dans un réseau pérenne de biosurveillance.

En adoptant un programme de biosurveillance passive, nous nous sommes intéressés à étudier la variation des réponses biochimiques et physiologiques chez la moule *Perna perna*, provenant de deux sites différents (fig III.9), pendant une période assez suffisante pour couvrir les variations saisonnières. Cette évaluation se base sur un suivi mensuel des facteurs physicochimiques du milieu, des concentrations en HAP et en germes pathogènes (bioaccumulés par la moule *Perna*) ainsi que des paramètres de croissance et de reproduction qui interagissent directement sur les biomarqueurs.

III.7.1/- Présentation de la zone de l'étude

Le littoral algérien se caractérise par la diversité de son milieu physique et naturel, ainsi que par la variété de ses ressources. Il s'étend sur 1622,48Km, d'Oued Kiss de la commune Marsa Ben M'hidi (wilaya de Tlemcen – frontière Algéro-Marocaine) à Oued Souani Es Sebaa de la commune Souarekh (wilaya d'El Tarf- frontière Algéro-Tunisienne) avec une superficie terrestre de 3929,41 Km² et une partie marine de 27 998Km² d'où un total de 31 927,41 Km². Le linéaire terrestre est de 2 198,44 Km (Ministère de l'aménagement du Territoire, 2008).

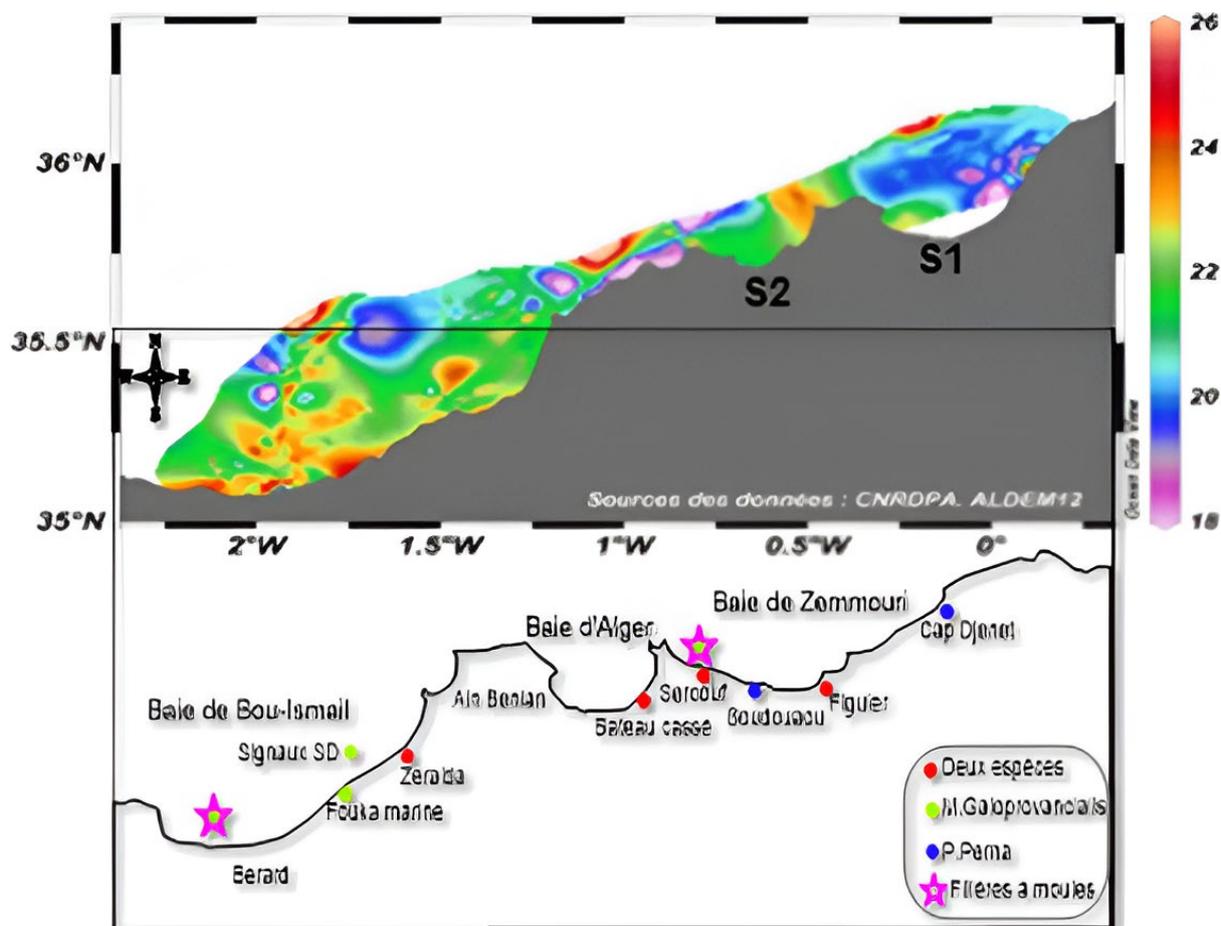


Figure III. 9 : illustration des moulières naturelles utilisées pour le programme de biosurveillance passive. S1 : site de Bateau cassé ; S2 : site de figuier.

Les deux sites choisis sont localisés dans deux baies adjacentes mais avec des caractéristiques différentes. Le premier site (S1 : , fig III.9) se trouve dans le gisement de Bateau cassé, ville de Bordj El Kiffan située à environ 15 km à l'Est d'Alger, sur la rive orientale de la baie d'Alger. Le deuxième site S2, sur l'ouest de la baie de zemmouri, est un petit îlot près de la plage de Figuier dans la wilaya de Boumerdes. Le territoire de la commune de Bordj El-Kiffan est traversé par trois Oueds dont le principal est Oued El Hamiz, avec un débit assez important, ses affluents : Oued Bouréah et Oued Bakora. Ces Oueds sont utilisés comme récepteur (exutoire naturel) des eaux usées à travers un réseau communal sans traitement préalable. Malgré que la commune se caractérise par une double vocation agricole et touristique, elle n'empêche pas l'implantation de certaines entreprises industrielles induisant ainsi le développement d'autres effets négatifs. Le secteur privé n'est pas négligeable, deux zones d'activités y sont présentes, alors que d'autres industries sont localisées dans les tissus urbains.

III.9.2/- Prélèvement

Afin de réaliser notre programme de biosurveillance passive, nos campagnes d'échantillonnage a ciblé, en premier lieu, le prélèvement de l'eau de mer, puis la collecte de moules *Perna perna* au niveau des deux sites sélectionnés (S1 et S2).

Le suivi de la température, conductivité, salinité, oxygène dissout et le pH s'effectuait *in situ* pour chaque campagne au moyen d'un Multiparametre model TWT.

Le prélèvement représente une phase primordiale du travail expérimental et dans l'interprétation des résultats [219]. Six prélèvements ont été effectués du mois de février au mois de juillet 2017.

III.9.2.1/-Prélèvement de l'eau de mer

Les prélèvements de l'eau de mer ont été effectués au niveau des deux sites à raison d'un prélèvement chaque mois sur une profondeur de 0,5 m. Les échantillons sont recueillis dans des flacons en polyéthylène de 1L de volume pour assurer les analyses physicochimiques (sels nutritifs, MES), et en flacons ambrés de 1L pour l'analyse de la chlorophylle *a*. Les flacons de prélèvement sont rincés deux à trois fois avec de l'eau de mer à analyser (environ un dixième du volume à chaque fois). Le flacon est ensuite rempli au maximum. Les échantillons seront placés au froid et à l'abri de la lumière dans une glacière pour être acheminés aux laboratoires et ceci dans les meilleurs délais. Pour assurer les analyses bactériologiques nous avons utilisé des flacons en verre stérilisés au préalable. Ces derniers sont ouverts remplis et fermés sous l'eau.

III.9.2.2/- Prélèvement de moules

Les moules, provenant des moulières indigènes en milieu ouvert, ont été prélevées mensuellement (entre 80 et 100 individus) tout au long de l'année 2017 sur les deux sites d'étude. Environ trente moules ont été réservées pour l'analyse biométrique, tandis qu'un groupe d'environ 20 individus a été utilisé pour les analyses biochimiques. Le reste des moules a servi aux analyses chimiques. Par ailleurs, un lot séparé de moules *Perna* a été prélevé pour les analyses bactériologiques.

Les moules récoltées sont transportées dans une glacière étanche et hermétique, remplie d'eau de mer de leur habitat d'origine, afin d'être acheminées aux laboratoires dans les meilleurs délais.

Une fois arrivées au laboratoire, les moules sont lavées et brossées. Le taux de mortalité est évalué, et les moules vivantes sont séparées des mortes, ces dernières étant écartées. Les moules vivantes sont ensuite utilisées pour les mesures biométriques (longueur, largeur, hauteur, indice de condition), ainsi que pour les dosages biochimiques (protéines, protéase, catalase) et chimiques (HAP).

III.9.3/- Analyse physicochimique de l'eau de mer

Les analyses effectuées sur les deux sites étudiés incluent :

- ✓ La Température, la salinité, le pH et l'oxygène dissous, mesuré sur place ;
- ✓ Les sels nutritifs (nitrites, azote ammoniacal, phosphore), les matière en suspension, la chlorophylle *a* et le dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques, effectué en laboratoire,

III.10/- Méthodes analytiques

III.10.1/- Dosage des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

La détermination de la concentration des HAP s'effectue principalement en trois étapes. La première étape consiste à extraire les HAP à l'aide de dichlorométhane ou d'hexane après l'ajout d'étalons de recouvrement (« surrogates »).

Dans la seconde étape, il y a transfert de solvant du dichlorométhane à l'hexane si les HAP sont purifiés sur colonne de gel de silice. Finalement, dans la troisième étape, l'extrait est concentré puis analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) fonctionnant dans le mode d'acquisition d'ions sélectifs (« SIM »).

La concentration des HAP est déterminée par comparaison des surfaces chromatographiques obtenues à un temps de rétention donné entre l'échantillon et celles de chacun des étalons de HAP.

Dans cette étude, l'extraction et la purification des HAP ont été réalisées conformément au protocole d'analyse du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (2016). Alors, la détermination des HAP a été assurée par le Centre de Recherche en Analyse Physico-Chimiques (CRAPC-Boulsmail) moyennant un Chromatographe (GC) (Hewlett Packard Agilent 6890 plus) couplé à un spectromètre de masse (SM) (Hewlett Packard Agilent 5973).

Les conditions opératoires pour la GC sont les suivantes : En mode splitless, le volume injecté est 1µl à une température d'injecteur de 250°C. La colonne utilisée est de type HP-5MS (Dimensions : long 30m * D int 0,25mm * épaisseur film 0,25µm, Phase stationnaire : 5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane). Au début, la température du four est fixée à 70°C pendant 2 minutes, puis elle augmente de 10°C/min jusqu'à 200°C. Cette température est maintenue pendant 3 minutes comme premier isotherme. Pour arriver à un deuxième isotherme à 280°C pendant 3 minutes la température est élevée avec un pas de 3°C/min. La durée d'analyse est estimée à 50 minutes. Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium pure avec un débit de 0,5ml/min.

L'analyseur de mass SM est de type Quadripôles avec Impact Electronique (IE :70 ev) comme type d'ionisation. La température de la source est 230°C alors que celle de de l'interface est de 300°C. pour déterminer les HAP, le mode d'analyse préconisé est le SIM.

III.10.2/- Dosages biochimiques des biomarqueurs

Les dosages biochimiques des biomarqueurs, tels que la catalase, la SOD (enzyme de défense antioxydante) et la protéase (enzyme digestive), ainsi que le dosage des protéines, nécessitent au préalable l'homogénéisation et le fractionnement subcellulaire des tissus biologiques. Ces procédures se déroulent dans des tampons adaptés. Le tampon utilisé pour l'homogénéisation doit avoir des propriétés physico-chimiques spécifiques pour maintenir la stabilité des molécules ou des organites à étudier. Il est essentiel de prêter une attention particulière à sa composition et à son pH.

❖ Homogénéisation

Les tissus sont homogénéisés à raison de (1/10 ; P/V) in ice-colde dans le tampon tris (tris(hydroxylméthyl)aminométhane) (20mM ; pH7,8) en utilisant un mixeur déchiqueteur.

La centrifugation de l'homogénat est faite à 10 000g pendant 30min entre 4 et 5°C. Le surnageant ainsi obtenu (Fraction S9) est utilisé pour doser, les protéines, la SOD, la CAT et la protéase.

III.10.2.1/- Dosages des protéines par la méthode de Lowry

❖ Principe

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. Ce sont généralement des techniques spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines.

La méthode développée par Lowry *et al.*, [220] combine une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret. Cette méthode a été tellement utilisée que l'article original de Lowry est un des articles scientifiques les plus cités au monde.

❖ Mode opératoire

Dans des tubes à essais, les prises d'échantillons de la fraction **S9** (surnageant) sont diluées au 1/5-1/8-1/10 et complétées à 1mL. Le tube de blanc contient 01mL d'eau distillée.

05mL de réactif Lowry « voir annexe » sont ajoutés à chaque tube ; on homogénéise et on attend 10min.

Par la suite, 0,5mL de réactif *Folin-Ciocalteu* dilué extemporanément au 1/2 est additionné au mélange (il est important d'agiter juste après l'addition de ce dernier). L'ensemble est mis au repos à l'obscurité au moins 30min. Ainsi la lecture de l'absorbance est faite à 660nm.

La gamme d'étalonnage est réalisée à partir de la solution de sérum albumine bovine (SAB) étalon mère. Les étalons filles sont ainsi obtenus par dilution de la solution mère.

III.10.2.2/- Dosages de la Catalase par mode Cinétique

❖ Principe

L'activité enzymatique est une mesure de la quantité d'enzyme active dans une préparation. L'unité d'activité enzymatique (U) est définie en termes de quantité de substrat disparaissant par unité de temps ou de quantité de produit apparaissant par unité de temps.

L'approche cinétique consiste à suivre en continu la quantité du composé voulu. La méthode typique consiste donc à mélanger les réactifs et la préparation enzymatique dans une cuvette de spectrophotomètre puis à suivre la variation temporelle du paramètre mesuré (Absorbance).

Dans notre pratique l'activité catalase est déterminée selon la méthode de Lartillot décrite par Gülüzar *et al.*, [203].

❖ Mode opératoire

Dans notre pratique, 2.5mL du substrat (100µL solution de H₂O₂ à 30% ; 2,4mL tampon phosphate 75mM à pH7) sont placés dans une cuvette du spectrophotomètre déjà réglée sur le mode cinétique.

50µL de la fraction **S9** (source d'enzyme) sont ajoutés au mélange, ainsi on déclenche le mode cinétique du spectrophotomètre et on suit la décomposition de peroxyde d'hydrogène dans un intervalle de temps de 60s.

III.10.2.3/- Dosages de la SOD (Méthode au pyrogallol)

❖ Principe

La superoxyde dismutase SOD est l'enzyme antioxydante chargée d'éliminer les ions superoxydes. Les molécules les plus souvent utilisées comme cibles des ions superoxydes sont le NBT et le Pyrogallol. Nous avons utilisé la technique au pyrogallol.

Elle repose sur la compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol (10mM) par les radicaux superoxydes et la dismutation de ces radicaux par la SOD, quantifié par spectrophotométrie à 420nm [].

❖ Mode opératoire

Le protocole débute par la préparation du tampon, constitué de Tris à pH 8,2 (50 mM) et d'EDTA (1mM). Ensuite, il faut dissoudre le pyrogallol dans de l'HCl (0,1N) pour obtenir une solution à 10mM.

Le tampon Tris-EDTA est utilisé pour établir l'auto-zéro du spectrophotomètre. Les tube de réaction de l'auto-oxydation du pyrogallol (tubes contrôles) contient 1mL du tampon Tris-EDTA avec 1mL de la solution pyrogallol. Les tube de réaction de la dismutation par la SOD (tubes tests) contient en plus 50µL de la fraction S9 source d'enzyme du SOD. Les réactions d'oxydation sont suivies par mode cinétique, alors que la lecture est faite après 45seconde du lancement des réactions.

Une unité d'activité enzymatique étant définie comme la quantité capable d'inhiber 50% de l'oxydation du pyrogallol.

III.10.2.4/- Dosage de la protéase

❖ Principe

L'approche du dosage de la protéase souvent utilisée est celle à temps fixe. Elle consiste essentiellement à mélanger les composants de la réaction et à incuber durant un certain temps. A la fin de l'incubation (généralement de 30min à 02h), on prélève des échantillons. On y mesurera alors la quantité des sous-produits issus de la dégradation du substrats (dans le cas de protéases la tyrosine est le sous-produit issu de la dégradation de la caséine).

❖ Mode opératoire

02mL de la solution de caséine (01% P/V dans le Tris-HCl à pH7.2) utilisée comme substrat est incubée avec 02mL de surnageant (source d'enzyme **S9**), préalablement dilué à différentes rations, à une température de 50°C pendant 01heure.

La réaction est stoppée en ajoutant 01mL du TCA à 10% (Acide trichloroacétique). On laisse reposer pendant 15 min et on effectuera une centrifugation à 6000g pendant 15min. La lecture de l'absorbance est faite à 280nm.

Dans le blanc l'eau physiologique remplace les 02mL du **S9**.

❖ Statistiques

Les relations entre les différentes variables ont été analysées par des test statistiques comme l'analyse de variance ANOVA et l'analyse en composante principale ACP.

Le degré de significativité est fixé à $p < 0,05$.

III.10.3/- Procédures des analyses des sels nutritifs (traitement au laboratoire)

Les méthodes analytiques pour le dosage des sels nutritifs (azote ammoniacal, nitreux, nitrique, phosphore), de la chlorophylle *a*, ainsi que le calcul de MES, sont détaillées en annexe C. Les analyses s'appuient sur les protocoles de Koroleff (1969) [219].

CHAPITRE IV

RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1/- Résultats préliminaires des analyses physico-chimiques et bactériologiques des moules et de leur eau d'élevage

La moule est très sensible aux variations des divers paramètres environnementaux tels que la température, la salinité et l'abondance de nourriture [221]. Ainsi, dans le but de minimiser au maximum les facteurs stressants, l'assurance des conditions environnementales optimales pour l'élevage des individus était l'étape primaire avant de commencer les tests d'écotoxicité, et ce, pour l'ensemble des séries d'expériences.

En effet, et dans le même contexte un contrôle de qualité physicochimique et bactériologique de l'eau d'élevage et des moules était une étape cruciale.

Ainsi, l'eau utilisée pour l'élevage des moules a montré une excellente qualité bactériologique, avec des résultats indiquant l'absence de contamination fécale susceptible d'affecter les moules ou de modifier leur activité physiologique, notamment la réponse des biomarqueurs. En effet, Dellali *et al.*, [222, 223] ont noté une augmentation de l'activité catalase durant les mois d'été, cette augmentation était attribuée au stress microbien, particulièrement l'élévation considérable de la flore fécale. Le contrôle bactériologique de l'eau d'élevage dans cette étude visait à garantir l'absence de stress pathogénique pouvant entraîner des maladies ou détériorer l'état de santé des moules, utilisées comme espèces indicatrices.

Les moules « *Mytilus* et *Perna* » sont des bivalves reconnus par leur résistance aux pathogènes [224, 225]. Cependant, cela ne signifie pas l'absence de stress, dont la résistance est le résultat direct de l'effet opposé à un effet gênant. Se défendre contre un pathogène pourrait probablement conduire à un changement des habitudes de s'alimenter et/ou de respirer, l'environnement devient stressant.

Les eaux marines possèdent un ensemble de caractères physicochimiques relativement stables dont les principaux sont la température, la salinité, l'oxygène dissous et le pH. Ces facteurs deviennent des marqueurs importants de l'influence anthropique dans le cas des mélanges des eaux de mer avec les eaux des rejets urbains. Nos résultats montraient des valeurs très stables et dans l'intervalle des valeurs normales des eaux marines et ce pour chaque approvisionnement en eau pour l'ensembles des séries de tests expérimentales. Aussi, les analyses des teneurs de l'eau de mer en sels nutritifs ont révélé de très faibles teneurs d'ammonium, de phosphore, de nitrates et de nitrite. Ainsi, l'apport exogène des sels nutritifs pouvant provenir d'une source de contamination anthropique (rejet anthropogénique) reste peu probable.

Par ailleurs, l'analyse bactériologique des moules a révélé l'absence totale des germes témoins d'une contamination fécale. On en conclue donc la bonne qualité bactériologique pour traduire un bon état de santé de nos spécimens.

En résumé des explications ci-dessus, nous concluons à la bonne qualité bactériologique des moules utilisées comme espèce sentinelle. Ainsi, le stress que peut exercer un pathogène n'est pas probable à exister. Aussi, les résultats physico-chimiques et bactériologiques de l'eau de mer traduisent la bonne qualité de cette dernière prise comme source d'approvisionnement dans le cas de nos tests d'écotoxicité. Comme conclusion, les moules seront soumises à l'unique stress exercé par l'exposition aux xénobiotiques (ETM, Phénol, Colorants, Rejets réels) testés dans la première partie de la présente étude.

IV.2/- Résultats du test d'écotoxicité, courte durée, par le cuivre

IV.2.1/- Paramètres d'élevage

Cette étude avait pour objectif d'examiner l'effet du cuivre sur les activités métaboliques traduisant l'état de santé des bivalves marins « *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna* » démontrés par les résultats expérimentaux.

L'analyse descriptives des données physicochimiques (température : T°C ; salinité : Sal et pH) est présentée dans le tableau (IV.1) ci-dessous. Les présentations graphiques des données sont illustrées par les boxplots (boîtes à mostavhes) dans la figure (IV.1).

Tableau IV.1 : L'analyse descriptives des données physicochimiques

Statistic	T°C	Sal	pH
Minimum	19,200	36,200	7,470
Maximum	21,080	37,730	8,130
1st Quartile	19,500	36,300	7,770
Median	20,400	36,350	7,860
3rd Quartile	20,650	37,270	7,980
Mean	20,146	36,745	7,854
Variance (n-1)	0,412	0,370	0,031
Standard deviation (n-1)	0,642	0,608	0,175

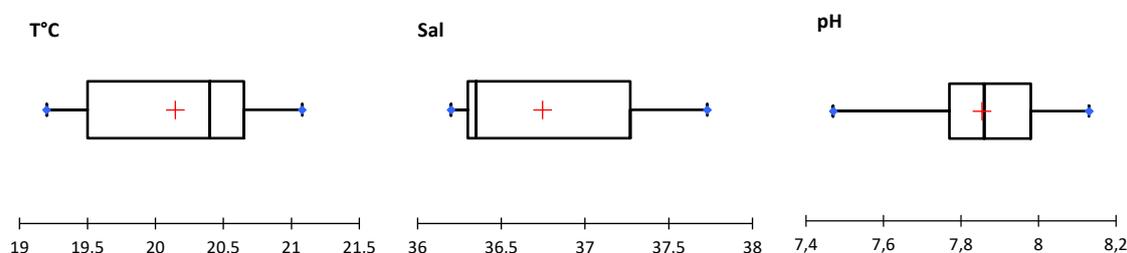


Figure IV.1 : Variation des paramètres physicochimique de l'eau d'élevage

D'après les résultats illustrés par le tableau (IV.1) et les boxplot de la température, de la salinité et du pH, on remarque une distribution homogène (tous groupes confondus, témoins et de contamination) des valeurs avec des écarts interquartiles de (1,15) pour la température, (0,97) pour la salinité et (0,21) pour le pH. Aussi, aucune valeur aberrante n'a été relevée durant toute la période expérimentale.

La température oscillait entre 19,2°C (min) et 21,08°C (max) avec une moyenne de 20,14°C. De même, la salinité montrait des valeurs très stables entre 36.2 et 37.73, avec une moyenne de 36,74. Le pH s'est trouvé encore plus stable avec des écarts très faibles (7.854 ± 0.175). Regardant les valeurs de la médiane, la température montre une distribution asymétrique étalée vers les faibles valeurs. Par contre, la distribution asymétrique de la salinité est étalée vers les grandes valeurs. Le pH a tendance à une distribution symétrique.

Ainsi, il est facile de conclure la stabilité des conditions expérimentales des tests d'écotoxicité traduite par la stabilité des paramètres physicochimiques de l'eau d'élevage. Les conditions d'élevage au laboratoire ne semblent pas avoir un effet stressant sur les individus de moules de la présente étude.

IV.2.2/- Résultats du dosage de la catalase

La figure (IV.2), représente les variations de l'activité catalase (CAT) en fonction des concentrations testées en éléments métallique Cu (C0 : 0µg/L ; C1 : 5µg/L, C2 : 15µg/L, C3 : 25µg/L et C4 : 35µg/L).

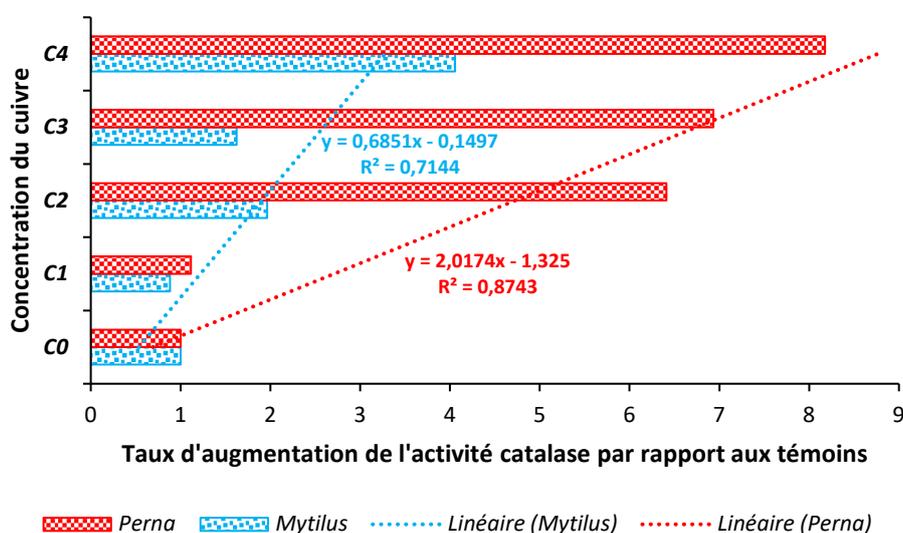


Figure IV.2 : Les variations CAT en fonction des concentrations en cuivre.

C0 : 0µg/L ; C1 : 5µg/L, C2 : 15µg/L, C3 : 25µg/L et C4 : 35µg/L

D'après la figure (IV.2), il se dégage des relations proportionnelles (*Mytilus* : $R^2=0.71$ et *Perna* : $R^2=0.87$) entre les réponses de l'enzyme de défense Catalase (CAT) et les concentrations testées du xénobiotique Cu. Chez les deux espèces de moule, les activités CAT maximales sont relevées sous l'effet des fortes concentrations C₄, avec des taux d'augmentation de l'ordre de 4.05 (4 fois) et 8.17 (8 fois) respectivement chez les moules *Mytilus* et *Perna*.

Comparativement aux témoins, la concentration C1 s'est avérée une concentration sans effet sur l'induction de l'enzyme antioxydante CAT, et ce, chez les deux espèce bioindicatrice *Mytilus* ($p=0,96$) et *Perna* ($p=0.99$).

Les concentrations C2, C3 et C4 conduisaient à des augmentations très significatives ($p < 0.0001$) quelle que soit l'espèce considérée. Aussi, les différences d'activité CAT sont très significatives ($p < 0.0001$), chez les deux espèces, entre les concentrations C1-C2, C1-C3 et C1-C4. Par ailleurs, la différence elle est non significative ($p > 0.05$) entre l'effet des concentrations C2 et C3 chez les moules *Perna*, alors qu'elle est négativement significative ($p < 0.05$) chez les moules *Mytilus*. La différence relevée entre les effets d'induction de la CAT pour les concentrations C2-C4 est encore très significative (*Mytilus* : $p < 0.0001$ et *Perna* $p < 0.001$). De même, la différence est très significative entre les deux concentrations C3 et C4 chez les deux espèces de moule (*Mytilus* : $p < 0.0001$ et *Perna* $p < 0.001$).

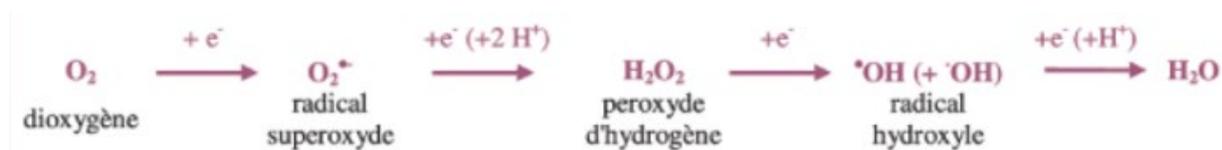
❖ Discussion

Le cuivre est un oligoélément essentiel qui est nécessaire en petites quantités. Il est un cofacteur pour plusieurs enzymes et métalloprotéines (ex : la métallothionéine) dans de nombreux systèmes biologiques. Au moins 21 enzymes contenant du cuivre sont connues, qui fonctionnent comme des catalyseurs d'oxydo-réduction (ex : la superoxyde dismutase (SOD), la cytochrome C oxydase, la monoamine oxydase) ou des transporteurs de dioxygène (ex : l'hémocyanine). Il est nécessaire pour la formation de l'hémoglobine et de l'hémocyanine, les pigments transportant l'oxygène dans le sang des vertébrés, des mollusques et des crustacés. Cependant, les concentrations du cuivre qui dépassent les concentrations essentielles peuvent être toxiques. Plusieurs travaux de recherche relatent la toxicité du cuivre, passé un certain seuil de concentration, sur plusieurs espèces aquatiques d'eau douce et/ou marine [226-230].

Il est généralement admis que la toxicité du cuivre est liée à deux principaux mécanismes de toxicité ; qui sont l'inhibition des enzymes et la génération d'un stress oxydant, suite à la formation des espèces activées de l'oxygène (EAO) couramment appelées **ROS** (pour : Reactifs oxygen species) [192, 228].

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est une conséquence inévitable de la respiration aérobie. En effet, 1 à 2 % de l'oxygène consommé est réduit de façon incomplète et conduit à la formation de ROS.

Cela se produit au niveau des sites redox de la chaîne respiratoire mitochondriale, lorsqu'un électron est occasionnellement transféré à l'oxygène et non à l'accepteur suivant de la chaîne, générant alors un anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), précurseur d'autres ROS tels que le peroxyde d'hydrogène ou le radical hydroxyle [231, 232] (selon la réaction ci-dessous).



Cela constitue la source majeure de ROS dans la plupart des tissus. En temps « normal », cette production est maîtrisée grâce aux enzymes antioxydantes (superoxyde-dismutase, **catalase**, etc.). Cependant, l'équilibre entre défenses antioxydantes et production de ROS peut être déplacé en raison d'une inhibition de la chaîne de transport des électrons, ou encore d'une exposition à des xénobiotiques. Le stress oxydatif est le résultat d'un déséquilibre de la balance redox (pro-oxydants/antioxydants) en faveur des ROS. De plus les polluants chimiques sont d'importants producteurs de ROS [203, 233-235]. En effet les xénobiotiques connus pour leurs propriétés redox, comme les métaux de transition, induisent la formation de peroxyde d'hydrogène, des radicaux superoxydes, générant le stress oxydant [203, 247, 248]. Notons que, ce déséquilibre apparaît comme le dénominateur commun de nombreuses situations de stress dans lesquelles le stress oxydant cause des dommages, et parfois la mort cellulaire [231].

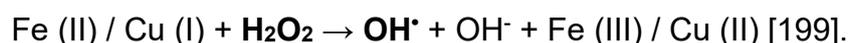
Les réponses adaptatives des organismes au stress, affectent tous les niveaux biologiques. Elles apparaissent en premier lieu au niveau cellulaire et individuel, mais sont ensuite intégrées et traduites à des niveaux supérieurs.

En effet, les animaux mettent en place une réponse au stress, et déplacent l'énergie, normalement allouée à la croissance et à la reproduction, pour la synthèse des enzymes impliquées dans les défenses antioxydantes [231] telle que la **catalase (CAT)**. Dans notre étude les niveaux d'induction CAT étaient proportionnelles avec le gradient concentration en xénobiotique Cu. Ainsi, les activités relevées peuvent être attribuées à une mesure adaptative des moules *Mytilus* et *Perna* pour contrer le stress oxydant causé par le cuivre.

La catalase CAT (enzyme antioxydante) est une hémoprotéine présente au niveau des peroxysomes qui participent à la défense contre les dérivés de l'oxygène. La CAT catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et en eau selon ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) [19, 202, 203]. Donc l'induction de l'activité CAT sous l'effets des différentes concentrations de cuivre est le signe de lutte contre le surplus de H_2O_2 généré au niveau cellulaire.

L'entrée du cuivre dans la cellule se fait essentiellement par des mécanismes qui dépendent des canaux membranaires. La réduction de Cu^{2+} en Cu^+ par des réductases membranaires favorise cette entrée. Une fois dans la cellule, le Cu^+ est distribué par les différentes protéines chaperonnes à Cu vers les différents compartiments cellulaires [237]. Le cuivre peut donc s'accumuler et devenir toxique pour la cellule. Les mécanismes de toxicité sont à la fois liés au stress oxydant et aux interactions directes avec les composants cellulaires [192, 238].

Les différentes formes de cuivre peuvent alors réagir avec les composés cytosoliques ainsi qu'avec les organites cellulaires et les endommager et/ou mener à une induction de ROS [239]. Le cuivre génère également des ROS *via* la réaction de Fenton qui conduit à la formation de radicaux hydroxyles ($\text{HO}\cdot$) [230]. Le radical $\text{OH}\cdot$ étant le plus réactif et le plus toxique des espèces ROS pour la cellule [201].



Les ROS sont des molécules contenant de l'oxygène mais dont la réactivité est bien supérieure à celle de la molécule d' O_2 . L'anion superoxyde et le radical hydroxyle sont très instables par comparaison au H_2O_2 qui diffuse librement et possède une durée de vie plus longue [240-242].

L'importance majeure de la CAT réside dans son rôle d'élimination du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 [3, 201, 243, 244]. L'excès de ce dernier se diffuse dans la cellule et peut modifier la physiologie cellulaire suite à la formation du radical $\text{OH}\cdot$. Le radical $\text{OH}\cdot$ a une vitesse de réaction très grande avec la majorité des molécules, si bien qu'il réagit à l'endroit même où le métal catalyse sa formation par la réaction Fenton [199, 201, 230].

Au niveau cellulaire, le dommage se traduit par l'altération et plus particulièrement l'oxydation des composants tels que l'ADN, les protéines et les lipides et par une perturbation généralisée de la balance redox (ratios GSH/GSSG et NADH/NAD⁺) [13, 199, 201, 231, 244, 245].

Par ailleurs, les ions cuivre présentent une grande affinité pour les groupements thiol et amine présents dans plusieurs protéines, dont certains sont spécialisés dans le transport et le métabolisme du cuivre, évitant ainsi sa toxicité potentielle [246]. Ce mécanisme peut toutefois être perturbé dans certaines conditions de surcharge en cuivre, ce qui entraîne sa liaison à des enzymes non impliqués dans le métabolisme du cuivre et connu pour être sensibles à une modification ou oxydation de leurs groupement thiol ; tel est le cas du cytochrome P450 et de la GSH-transférase [247]. Aussi, l'action de l'ion Cu²⁺ inhibe l'enzyme Na⁺/K⁺ ATPase. Le cuivre aurait affecté la perméabilité de la membrane en augmentant le potentiel de la membrane et en bloquant les canaux ioniques [248].

Du point de vue de la sensibilité de la réponse de CAT, et comparativement à la moule *Mytilus*, la moule *Perna* dévoile une hyperactivité enzymatique sous l'effet des différentes concentrations testées en xénobiotique Cu²⁺. L'un des résultats importants de la première série d'expérience est la sensibilité accrue de l'espèce *Perna* comparativement à l'espèce *Mytilus*. Toutefois, certains auteurs relatent des réponses variées de différents biomarqueurs chez la même espèce. Alors, les réponses biologiques aux contaminants demeurent aussi très diverses.

Pour le Cu, Fabbri *et al.*, [249] ont indiqué une valeur de CE₅₀ de 8,7 µg/L, tandis que Prato & Biandolino [250] ont obtenu une valeur plus élevée à 40 µg/L pour la même espèce. Aussi, Steven J. Brooks *et al.*, [16], rapportent des différences dans la bioaccumulation et les réponses biologiques des trois espèces de *Mytilus* (*M. galloprovincialis*, *M. edulis* et *M. trossulus*) suite à une exposition au cuivre (0, 10, 100 et 500 µg/L) pendant 4 et 21 jours.

IV.2.3/- Etude de l'effet du Cu sur le métabolisme d'excrétion azotée et phosphorée

Les tableaux (IV.2 et IV.3) ci-dessous, regroupe les valeurs de la matrice de corrélation de *Pearson* entre les effets d'interaction concentrations/réponses biologiques des bivalves *Mytilus* et *Perna*.

Tableau IV.2 : matrice de corrélation (Le r de *Pearson*)

	[C]	CAT	NO ₂ ⁻	NH ₄ ⁺	PO ₄ ³⁻
[C]	1	<i>Myt</i> : 0,872 <i>Per</i> : 0,937^a	<i>Myt</i> : 0,872 <i>Per</i> : 0,826	<i>Myt</i> : 0,898^a <i>Per</i> : 0,918^a	<i>Myt</i> : 0,666 <i>Per</i> : 0,898^a
CAT		1	<i>Myt</i> : 0,832 <i>Per</i> : 0,615	<i>Myt</i> : 0,978^b <i>Per</i> : 0,896^a	<i>Myt</i> : 0,896^a <i>Per</i> : 0,779
NO ₂ ⁻			1	<i>Myt</i> : 0,814 <i>Per</i> : 0,836	<i>Myt</i> : 0,949^a <i>Per</i> : 0,912^a
NH ₄ ⁺				1	<i>Myt</i> : 0,921^a <i>Per</i> : 0,894^a
PO ₄ ³⁻					1

D'après le tableau (tab IV.2), les constatations qui peuvent être représentatives au seuil de signification $\alpha=0,05$ sont les suivantes :

Comparativement à la moule *Mytilus*, La moule ***Perna*** démontre une sensibilité plus accrue, à la contamination par le cuivre ; traduite par les réponses biologiques de la CAT ($r=0,937$) et celles du métabolisme d'excrétion des composés azotés ($r=0,918$) et phosphorés ($r=0,898$).

Chez la moule *Mytilus*, l'**état de stress**, traduit par l'enzyme de défense **CAT**, s'est trouvé bien corrélé avec les taux d'excrétion des composés phosphorés ($r=0,896$; $p<0,05$) mais surtout avec les taux d'excrétion azotées ($r=0,978$; $p<0,005$). Chez la moule *Perna*, seule l'excrétion azotée qui dévoile une corrélation positive ($0,896$) et significative au seuil α avec les taux d'induction CAT.

Par ailleurs, il se dégage, des corrélations étudiées, que les facteurs influençant l'excrétion azotée sont ceux qui affectent l'excrétion phosphorée, et ce, chez les deux espèces de moule *Mytilus* ($\text{NO}_2^-/\text{PO}_4^{3-}$: $r=0,949$; $\text{NH}_4^+/\text{PO}_4^{3-}$: $r=0,921$) et *Perna* ($\text{NO}_2^-/\text{PO}_4^{3-}$: $r=0,912$; $\text{NH}_4^+/\text{PO}_4^{3-}$: $r=0,894$).

Tableau IV.3 : matrice de corrélation (*p-values*)

Variables	[C]	(N/P) _{Mytilus}	(NO ₂ ⁻ /NH ₄ ⁺) _{Mytilus}	(N/P) _{Perna}	(NO ₂ ⁻ /NH ₄ ⁺) _{Perna}
[C]	0	0,736	0,012	0,268	0,127
(N/P) _{Mytilus}	0,736	0	0,403	0,272	0,370
(NO ₂ ⁻ /NH ₄ ⁺) _{Mytilus}	0,012	0,403	0	0,558	0,087
(N/P) _{Perna}	0,268	0,272	0,558	0	0,612
(NO ₂ ⁻ /NH ₄ ⁺) _{Perna}	0,127	0,370	0,087	0,612	0

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

En revanche, d'après le tableau (IV.3), aucune corrélation n'a été établie entre le rapport (N/P : Σ Excrétion azotée/Excrétion phosphorée) et les concentrations testées du xénobiotique Cu, et ce, chez les deux espèces de moule *Mytilus* et *Perna*. Nonobstant, contrairement à la moule *Perna*, les individus de l'espèce *Mytilus* dévoilent une excrétion azotée plus importante que l'excrétion phosphorée. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration en Cu, conduisit à une diminution des teneurs en nitrites et un accroissement des teneurs en ammonium chez la moule *Mytilus*. Ainsi, une corrélation fortement négative ($r=-0.954$; $p=0.012$) a été relevée entre le rapport (Nitrite/Ammonium) et la concentration en xénobiotique Cu.

❖ Discussion :

La recherche sur les effets physiologiques des substances toxiques sur les espèces animales revêt une grande importance en écotoxicologie. La réponse au stress comprend un groupe de réactions physiologiques qui permettent à un organisme de maintenir l'homéostasie. Entre autres, l'excrétion (phosphorée mais surtout azotée) comme processus énergétique chez les animaux marins est considérée comme un facteur important dans l'évaluation de l'état physiologique.

D'une manière générale, on considère que l'essentiel de l'excrétion azotée, chez les bivalves, se fait sous forme d'azote ammoniacale (N-NH₄) [251-254].

Chez les deux espèces de moules, de la présente étude, l'excrétion ammoniacale s'est trouvée positivement corrélée avec le gradient concentration testé en xénobiotique Cu. La relation doses/effets semble être justifiable et significative ($p < 0.05$) (*Myt* : $r = 0.898$; *Per* : $r = 0.918$). Cela pourrait être une réponse adaptative au stress causé par le cuivre mais qui dépend certainement de la relation doses/durée qui détermine la capacité (et/ou la tolérance) des spécimens à contrer les agressions externes. Ainsi, et avant que des changements de viabilité ne se produisent, il est probable que des changements dans le statut énergétique de l'organisme apparaissent [251].

Les composés azotés sont l'un des principaux sous-produits métaboliques des mytilidés. Ces sous-produits formés à l'intérieur des cellules doivent être éliminés car leur accumulation est toxique pour l'organisme lui-même [255]. L'excrétion d'azote ammoniacal peut être considérée comme le taux de catabolisme (dégradation) des protéines et des acides aminés, capturés de la nourriture disponible dans le milieu, et ce par l'activité de filtration chez les bivalves. La filtration est la principale activité physiologique chez les bivalves. Elle détermine la nutrition de l'animal, sa respiration et son excrétion qui constituent les principaux composants du bilan énergétique. Ainsi, toute perturbation de la filtration conduira à des effets directs (soit stimulation soit inhibition) sur l'ensemble des processus d'échange énergétiques entre l'individu et son milieu.

Le mécanisme de filtration fait intervenir les mouvements valvaires, l'ouverture des siphons inhalants et exhalants, et le tissu branchial (espaces interfilamentaires) avec son système ciliaire [256, 257]. Face à des conditions défavorables (comme l'exposition aux toxiques), les bivalves peuvent réduire le contact avec le milieu extérieur en réduisant la filtration ou en l'arrêtant complètement par la fermeture de la coquille [258-261].

Le résultat logique d'une telle situation (telle réaction, telle comportement) est la diminution de l'alimentation, de la respiration et de l'excrétion qui y en dépendent. En raison de ce comportement de fermeture, les activités physiologiques sont réduites, entraînant ainsi des perturbations des taux d'excrétion chez les bivalves [262, 263]. Cependant, différentes altérations du métabolisme d'excrétion sont observées, en réponse à l'exposition aux toxiques (métaux, pesticides, détergents, hydrocarbures) comme aux conditions abiotiques du milieu.

Ainsi, des études à moyen et à long terme montraient que les taux d'excrétion d'azote ammoniacal des moules augmentent avec l'exposition au cuivre. Chez des moules *Perna perna*, Vosloo *et al.*, [264], ont observé une relation positive entre l'excrétion de l'ammonium et les concentrations en cuivre testé (allant de 12 à 50 µg/L). En revanche, Les résultats de Mouabed [265], ont montré que le taux d'excrétion des dreissens (*Dreissena* moule d'eau douce) diminue lors de l'exposition au Cu, sans qu'une relation claire entre concentration et effet puisse être établie.

Par ailleurs, La consommation d'oxygène des animaux est appropriée pour décrire la capacité respiratoire et estimer le taux métabolique. Combiné au taux d'excrétion d'azote, ammoniacale surtout, le paramètre consommation d'oxygène/excrétion d'azote (O/N) pourrait révéler les relations entre : dépendance respiratoire et ressources énergétiques (glucides et lipides) avec la désamination des acides aminés [251]. Une valeur (O/N) élevée représente une prédominance du catabolisme des lipides et/ou des glucides par rapport à la dégradation des protéines. Pour *Mytilus edulis*, un rapport (O/N) de 50 indique un bon état physiologique, des valeurs inférieures à 30 indiquent une forte dépendance aux protéines comme source d'énergie et une valeur de 7 représente une dépendance totale aux protéines.

Sous l'effet du cuivre, l'excrétion ammoniacale des moule *Mytilus* et *Perna*, de la présente étude, était en hausse indiquant ainsi une mobilisation énergétique en faveur d'une déplétion des réserves protéiniques. Selon Pillai [266], le paramètre (O/N) est un bon indicateur des changements métaboliques et de la quantité d'énergie disponible, ce qui nous aide à comprendre les diverses demandes d'un organisme dans différentes conditions environnementales y compris le cas de la contamination chimique.

Nos résultats du dosage des protéines totales dans la chair des moules *Mytilus galloprovincialis*, a mis en évidence une déplétion [min : 11,44% (C3 : 25 µg/l) ; max : 48,12% (C2 : 15 µg/l) ; moy : 35,52%] des teneurs protéiques sans pouvoir établir une nette relation dose/effet. Chez l'espèce *Perna perna*, et sous l'effet des concentrations 5, 15 et 25 µg/L, les déplétions protéiques n'étaient pas significatives [min : 1,31% (5 µg/l) ; max : 24,64% (15 µg/l) ; moy : 13,47%] mais faiblement corrélées à la concentration ($R^2=0,5276$). Notant cependant un effet stimulant (19,69%) sous la concentration maximale de 35 µg/l de Cu^{2+} .

Selon Mosleh *et al.*, [267] la déplétion des protéines est une réponse de défense précoce face à un stress chimique. Ainsi, la déplétion des teneurs en protéines peut être attribuée au catabolisme des protéines comme réponse à la demande énergétique.

Par ailleurs, et comme sus-cité, nous avons relevé des corrélations significatives entre les taux d'excrétion azotée et l'enzyme de défense antioxydante CAT et ce chez les deux espèces de moule *Mytilus* ($r=0,978$, $p<0,005$) et *Perna* ($r=0,896$, $p<0,05$). Pour surmonter la situation de stress les organismes ont besoin d'une grande énergie et cette demande peut induire le catabolisme protéique. De plus la diminution des teneurs protéiques peut être due à la formation de lipoprotéines qui seront utilisées pour la réparation des dommages oxydatifs au niveau des cellules, des tissus et des organes.

Toutefois, il est à signaler que l'excrétion ammoniacale chez les bivalves (tout comme les autres espèces animales) dépend fortement des facteurs intrinsèques (la taille et le poids corporel de l'individu, son état reproductif) et extrinsèques (environnementaux : tel que la température, la salinité, le pH, la nourriture etc.).

Concernant l'excrétion phosphorée, il y a un manque de recherche et de connaissance sur cette dernière sous l'effet des polluants chimiques surtout chez les mollusques bivalves. Néanmoins, il est fort probable que les facteurs affectant cette excrétion soient les mêmes que ceux influençant l'excrétion azotée. Comme mentionné précédemment, de fortes corrélations sont notées entre les taux d'excrétion phosphorée et azotée.

Dans la littérature, les scientifiques rapportent de forte dépendance de l'excrétion phosphorée avec la taille des individus en relation surtout avec l'augmentation de la température et la diminution de la salinité chez les organismes euryhalins.

Nos résultats dévoilent, Chez les moules *Mytilus*, une corrélation fortement négative ($r=-0.954$; $p=0.012$) entre le rapport (Nitrite/Ammonium) et la concentration en xénobiotique Cu. Ceci est probablement attribué à la physiologie de l'espèce *Mytilus* alors qu'aucune tendance n'est relevée chez l'espèce *Perna*.

La diffusion est le principal mode d'excrétion de l'ammoniac chez les invertébrés marins puisque sa concentration dans les fluides corporels est considérée comme supérieure à celle de l'environnement extérieur [255]. Certaines études ont indiqué que l'excrétion de nitrite et de nitrate par les animaux peuvent être un mécanisme intrinsèque pour la détoxification de l'ammoniac dans le sang, ainsi que pour maintenir l'électro neutralité à l'intérieur de l'animal. L'excrétion d'ammoniac et de nitrite peut être considérée en fonction du taux de catabolisme des protéines et des acides aminés. Le niveau supérieur d'excrétion chez les individus exposés peut être attribué à la forte dégradation des protéines et des acides aminés (forte activité métabolique).

IV.3/- Résultats du test d'écotoxicité, courte durée, par le plomb et le cadmium

IV.3.1/- Résultats du dosage de la catalase

Les résultats du dosage de l'activité antioxydante catalase (CAT), chez la moule *Perna*, sous l'effet des éléments métalliques cadmium (Cd) et plomb (Pb), sont graphiquement indiqués dans la figure (IV.3) ci-dessous.

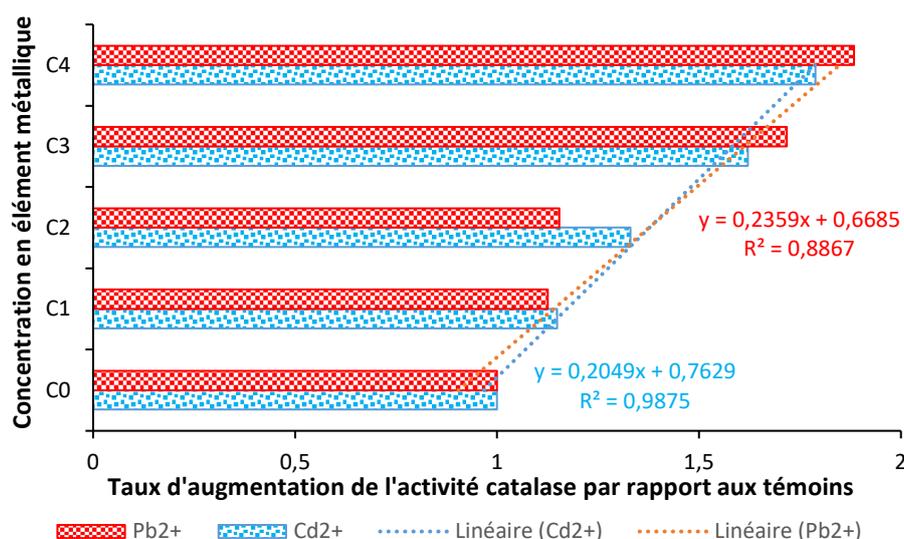


Figure IV.3 : Les variations CAT en fonction des concentrations en Pb et Cd.

(C0 : 0µg/L, C1 : 50µg/L, C2 : 100µg/L, C3 : 250µg/L et C4 : 500µg/L)

Des corrélations positives sont notées entre l'induction de l'activité antioxydante CAT et le gradient des concentrations choisies en xénobiotiques Cd²⁺ ($R^2=0.9875$) et Pb²⁺ ($R^2=0.8867$). La force chimique de l'élément métallique, traduite par les taux d'induction de l'enzyme antioxydante CAT, s'est trouvée croissante avec les concentrations testées. Ainsi, aucune déplétion de l'activité CAT n'est marquée sous l'effet des deux xénobiotiques cadmium et plomb. Par rapport aux témoins, les inductions CAT sont doublées sous l'effet des fortes concentrations C4 (CAT_{Cd} : +1,788 ; CAT_{Pb} : +1.883).

Toutefois, le traitement statistique des résultats a mis en évidence des effets qui varient entre non significatifs, significatif et très significatif.

Ainsi, la différence d'activité CAT est non significative, et voire même identique ($p=0.83$), entre les témoins des deux groupes de tests cadmium et plomb. Cela, ne peut que témoigner la stabilité des conditions expérimentales de la présente étude.

Comparativement aux témoins, et quel que soit le xénobiotique testé, (les effets indépendants) la différence statistique est non significative sous l'effet des concentrations C1(50 μ g/L) et C2 (100 μ g/L). La concentration C1 en cadmium s'est révélée sans effet ($p=0.96$), tandis que les deux concentrations C1 ($p=0.99$) et C2 ($p=0.98$) en plomb montrent un effet nul sur l'induction de l'activité de défense antistress oxydatif CAT.

Le gradient de concentration choisi ne manifeste ses effets délétères qu'à partir de la concentration C3 (250 μ g/L) qui montre un effet très significatif ($p<0,01$) pour les deux xénobiotiques testés. De plus, la concentration C4 (500 μ g/L) démontre un effet stressant ($p<0,001$) le plus important de tous.

La propriété chimique de l'élément métallique ne dévoile aucune différence significative ($p>0,05$) entre les effets du cadmium et ceux du plomb. Les taux d'augmentation de l'activité CAT dépendent de la concentration et ne semble pas être influencés par le type d'élément trace métallique (CAT : $C0_{Cd}\approx C0_{Pb}$, $C1_{Cd}\approx C1_{Pb}$, $C2_{Cd}\approx C2_{Pb}$, $C3_{Cd}\approx C3_{Pb}$, $C4_{Cd}\approx C4_{Pb}$).

Pour les deux éléments métallique (Cd et Pb), Les effets de passage d'une concentration à une autre ne sont pas significatifs entre C1/C2 ($p=1$), C2/C3 ($p>0,05$) et C3/C4 ($p>0,05$). Nonobstant, la différence devient de plus en plus significative entre C1/C3, C1/C4 et C2/C4.

❖ **Discussion**

Parmi les nombreuses substances à l'origine de la production excessive des espèces oxydantes (ROS), figurent les métaux. Parmi ces métaux se trouvent ceux qui possèdent des capacités d'interaction directe avec l'oxygène (cuivre) ; et ceux qui ont une action indirecte (cadmium et zinc) [230, 268].

Contrairement au cuivre, le cadmium et le plomb ne sont pas des éléments essentiels pour les organismes, et ils n'ont aucun rôle biologique quant à la physiologie et/ou la survie de la cellule [268, 269]. L'accumulation de ces métaux à l'intérieur d'un organisme est susceptible de déclencher une réaction de défense, pour contrer l'excès de ROS générés au niveau de la cellule [240]. Dans notre étude, le résultat est traduit par les taux d'inductions proportionnelles de la catalase CAT en fonction de la pression chimique exercée par les concentrations testées des deux xénobiotiques, Cd et Pb.

En effet, les systèmes antioxydants protègent les constituants cellulaires des agressions radicalaires en interagissant directement avec ces radicaux (comme l'enzyme antioxydante la **catalase** en dismutant le précurseur des ROS le H_2O_2) ou indirectement en produisant des peptides (chélateurs) comme les métallothionéines MT (surtout en cas d'exposition au cadmium : Cd-MT) ou le glutathion. Par la suite, les systèmes de réparation permettent d'éliminer les dommages produits [270, 271].

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est un ROS majeur dans les organismes vivants, et son homéostasie peut avoir diverses conséquences physiologiques et pathologiques [272]. De plus, l'élimination de H_2O_2 est une stratégie importante chez les organismes marins contre le stress oxydatif. Tant, la catalase (CAT) est un piègeur primaire de H_2O_2 dans la cellule [273-275]. Chez la moule *Perna perna* de la présente étude, l'augmentation de l'activité CAT est le signe d'un surplus cellulaire en H_2O_2 pour exercer un stress oxydatif. Nos résultats sont comparables de point de vue réponse enzymatique CAT chez plusieurs espèces : (i) chez *Perna viridis* sous l'effet du Pb [273] ; (ii) chez *Perna canaliculus* sous l'effet du Cd [276] ; (iii) chez *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis* exposées au Pb [277].

Le **Cd** est un membre du groupe (II) des éléments du tableau périodique. Il ne participe à aucun processus vital et est toxique à de très faibles concentrations [240]. Le cadmium n'étant pas un métal de Fenton, il induit de façon indirecte la production de ROS et la peroxydation lipidique par interférence avec les systèmes antioxydants [278]. En effet le cadmium peut entraîner une diminution de la quantité d'antioxydants (glutathion) ou de l'activité d'enzymes permettant de lutter contre le stress oxydant (superoxyde-dismutase, glutathion-peroxydase, catalase) [279, 280].

Certains auteurs ont démontré que le Cd peut interférer avec la chaîne respiratoire de la mitochondrie et induire les ROS. En effet, il s'intercale entre la semi-ubiquinone et le cytochrome b du complexe III de la chaîne respiratoire. La semi-ubiquinone devient instable et transfère un électron à la molécule d'oxygène pour former l'anion superoxyde [281]. Ce dernier est un précurseur d'autres ROS tels que le peroxyde d'hydrogène ou le radical hydroxyle.

Un autre mécanisme possible est l'augmentation de la concentration en fer ou en cuivre à la suite de leur déplacement par le cadmium de métalloprotéines (Fe/Cu-MT en Cd-MT) [282]. Le Cd pourrait également participer au déplacement des ions métalliques, tels que Fe^{2+} et Cu^+ , des protéines cytoplasmiques et membranaires [282, 283]. A l'inverse du cadmium, le fer et le cuivre peuvent causer un stress oxydant direct par réaction de Fenton (comme sus-cité).

Aussi, Les mécanismes de toxicité du Cd par interférence avec l'homéostasie des métaux essentiels interviennent à plusieurs niveaux. Ce processus de toxicité est complexe du fait que le Cd utilise les voies physiologiques dédiées à plusieurs autres métaux indispensables à la cellule. Comme le Cd ne possède aucune voie d'influx qui lui soit propre, il peut utiliser celle du zinc. Le Cd peut agir par son interférence avec les facteurs de réparation de l'ADN. Les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN sont de la famille des protéines à doigts de zinc et l'effet inhibiteur du Cd est lié au remplacement de ce zinc [284, 285]. De plus le Cd a une longue demi-vie lui permet d'interférer avec de nombreuses protéines dépendantes de métaux essentiels.

L'autre possibilité expliquant l'augmentation des ROS en présence de cadmium correspond au déplacement des métaux constituant la structure des superoxyde-dismutases SODs (Cu/Zn-SOD et Mn-SOD) [284, 286]. Ces altérations des molécules antioxydantes et de l'homéostasie des métaux physiologiques comme le calcium, le fer, le cuivre et le zinc peuvent se traduire par une démétallation des protéines, une altération des fonctions cellulaires faisant intervenir des thiols réactifs (antioxydants, oxydoréductases, protéines fer-soufre, signalisation redox basée sur des thiols réactifs), une interférence dans la signalisation dépendante du calcium. L'impact du Cd sur toutes ces cibles peut entraîner l'augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) tels que les radicaux hydroxyle, superoxyde, ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [240].

L'importance de la catalase réside dans son rôle de neutralisation le H_2O_2 . Ce dernier a une durée de vie plus longue que les autres ROS et peut diffuser dans la cellule et provoquer de graves dommages [274, 287, 288]. En présence de peroxyde d'hydrogène, le cuivre et le fer (déplacés par le Cd) peuvent libérer le radical OH^\bullet qui est le principal initiateur de l'oxydation de la chaîne polypeptidique.

Les ROS vont engendrer une situation de stress oxydant dans la cellule et donc des dommages oxydatifs au niveau des macromolécules biologiques (peroxydation lipidique, lésions de l'ADN, modifications oxydatives des protéines) [231, 242, 245]. Dans la présente étude, les taux d'inductions CAT n'étaient pas très importants (doublement de l'activité sous la forte concentration C4). Ainsi, les concentrations testées ne semblent pas provoquer des dommages avancés au niveau cellulaire, vu le rôle protecteur de la catalase, dont on relevait des inductions continues sans aucune déplétion. Une augmentation continue traduit une adaptation au stress. Aussi, les effets de passage d'une concentration à l'autre n'étaient pas significatifs traduisant le bon choix du gradient des concentrations testées.

Le **Pb** n'a aucun rôle biologique bénéfique détectable. Au contraire, ses effets préjudiciables sur les dysfonctionnements neurophysiologiques, cognitifs et biochimiques (cellulaire) ont été documentés chez les animaux et les humains par plusieurs chercheurs [289].

Chez les mollusques bivalves, la prise de métal dissous se produit généralement au niveau des branchies et du manteau, largement en contact avec le milieu extérieur, ainsi qu'au niveau du tractus digestif. La bioaccumulation du Pb se fait sous différentes formes, bien qu'essentiellement sous sa forme ionique. Le Pb pénètre les organismes aquatiques au niveau de leurs branchies par endocytose. Une fois dans l'organisme, il entre en compétition avec les métaux essentiels [290].

Selon Freitas [291] et Brahma [292], les impacts induits par le Pb chez les bivalves concernent la capacité de ce métal à perturber l'état oxydatif de l'organisme en produisant les ROS, ce qui entraîne un stress oxydatif. Par exemple, Zhang *et al.*, [251] ont démontré que chez le bivalve *Chlamys farreri* exposé au Pb, la capacité antioxydante était compromise, entraînant une augmentation des niveaux de peroxydation lipidique.

En revanche, Freitas *et al.*, [293] ont observé que les palourdes *Ruditapes decussatus*, exposées à des concentrations croissantes de Pb, activaient leurs mécanismes de défense, tels que les enzymes antioxydantes et la métallothionéine, empêchant ainsi les dommages cellulaires.

Chez le bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea*, l'exposition au Pb a entraîné une augmentation de l'activité de la catalase (CAT) sans affecter significativement les niveaux de MDA (un marqueur de la lipoperoxydation), ce qui suggère que la CAT joue un rôle protecteur contre les ROS. Des taux élevés d'activité catalase indiquent une surproduction de ROS, qui seront neutralisés par les mécanismes antioxydants pour protéger les cellules des dommages oxydatifs.

Toutefois, il faut signaler que les impacts du Pb peuvent varier selon les espèces mais aussi selon la concentration et la durée d'exposition. D'après Neethu *et al.*, [294], leurs résultats fournissent la preuve que le biomarqueur enzymatique antioxydant peut être un indicateur sensible de la pollution aquatique causée par le plomb métallique.

Dans notre étude de l'effet du Pb sur l'activité catalasique, les résultats dévoilent des inductions significatives et continues avec un doublement de l'activité de la CAT sous l'effet de la concentration maximale (C4 : 500µg/L). Les réponses ainsi relevées chez la moule *Perna* ne peuvent être interprétées que comme une stratégie et/ou une mesure de défense antioxydante face à l'excès de ROS.

Chez la moule *Perna perna*, Boudjemaa *et al.*, [295] rapportent des corrélations positives entre les taux d'inductions de la catalase et les concentrations testées en xénobiotique Pb²⁺ (de 0,05 à 8mg/L pendant 72h). De même, les travaux de Kourdali *et al.*, [277], examinant l'effet du Pb (entre 0,05 et 8mg/L) sur les réponses de la CAT mesurées chez les deux espèces de moule *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna*, ont mis en évidence des relations doses/effets positives et significatives.

Almeida *et al.*, [296], ont trouvé que les moules *Perna perna* présentaient une augmentation significative de l'activité CAT après 120h d'exposition à 200mg Pb/L. Toutefois, il est à noter que la solubilité du Pb (sous forme de sel minéral) dans l'eau de mer est d'environ 4mg/L. Ainsi, la précipitation du plomb dans les milieux d'élevage est certaine pour les grandes concentrations. A des concentrations supérieures à 4,5mg/L le nitrate de plomb est insoluble dans l'eau de mer.

Par ailleurs, Amiard-Triquet *et al.*, [297] soulignent qu'en 24h, la diminution de la concentration en plomb dans le milieu d'incubation avoisine 50% quand la concentration en plomb ajoutée est supérieure à 1mg/L ; c'est pourquoi ces auteurs ont effectué leurs études avec renouvellement du milieu expérimental toutes les 24 h.

La réponse biologique des organismes marins aux stress est souvent dépendante de la forme biodisponible (généralement la forme dissoute et libre) des xénobiotiques comme le Pb. Du fait, la validité des résultats est dans de nombreux cas douteuse au-delà de la solubilité du Pb inorganique. Nonobstant, bien qu'à ces doses la présence de précipité de plomb puisse aussi intervenir sur la toxicité, par exemple en gênant les échanges gazeux au niveau des branchies [298].

Toutefois, les tests de toxicité chronique ou sublétales devraient constituer une approche plus réaliste car ils exposent les organismes à des concentrations de substances toxiques relativement faibles et représentatives de l'environnement [292].

Comme sus-expliqué, les métallothionéines (ligands chélateurs) ou d'autres composés de nature protéiques peuvent complexer des métaux des groupes IB (Cu) et IIB (Cd), et les rendre sous une forme inactive. Au contraire, le plomb n'est jamais lié par des thionéines cytoplasmiques. Une fois dans le compartiment cellulaire, les différentes formes du Pb sont directement prises en charge et immobilisées par le système lysosomal (par déposition dans les lysosomes et les sphérolithes). Le plomb, peut se lier avec des anions et précipiter sous une forme minérale [297]. La détoxification du plomb semble se faire principalement par la formation de granules intracellulaires ou de vésicules membranaires. Il n'y a pas d'exemple de détoxification du plomb par induction de métalloprotéines du type des métallothionéines [298].

IV.3.2/- Etude de l'effet du Pb et Cd sur le métabolisme d'excrétion azotée et phosphorée

Le tableau (IV.4) ci-dessous, regroupe les valeurs de la matrice de corrélation de *Pearson* entre les effets d'interaction concentrations (en Pb et Cd) et réponses biologiques de la moule *Perna perna*. Les constatations qui peuvent être représentatives au seuil de signification $\alpha=0,05$ sont les suivantes (sous-discutées) :

Tableau IV.4 : matrice de corrélation (*p-values*) ; test Pb et Cd

	[C]	CAT	NO ₂ ⁻	NH ₄ ⁺	PO ₄ ³⁻
[C]	0	Pb ²⁺ : 0,013 Cd ²⁺ : 0,014	Pb ²⁺ : 0,072 Cd ²⁺ : 0,054	Pb ²⁺ : 0,551 Cd ²⁺ : 0,183	Pb ²⁺ : 0,510 Cd ²⁺ : 0,019
CAT		0	Pb ²⁺ : 0,007 Cd ²⁺ : 0,049	Pb ²⁺ : 0,578 Cd ²⁺ : 0,091	Pb ²⁺ : 0,433 Cd ²⁺ : 0,004
NO ₂ ⁻			0	Pb ²⁺ : 0,617 Cd ²⁺ : 0,275	Pb ²⁺ : 0,444 Cd ²⁺ : 0,070
NH ₄ ⁺				0	Pb ²⁺ : 0,304 Cd ²⁺ : 0,191
PO ₄ ³⁻					0

Les effets délétères de la contamination par les éléments traces métallique Pb²⁺ et Cd²⁺, sont perçus principalement sur les réponses de l'enzyme de défense antistress oxydatif CAT avec des corrélation positives et significatives (Pb²⁺ : $p=0,013$; Cd²⁺ : $p=0,014$).

Bien qu'une corrélation positive ait été observée entre l'état de stress oxydatif (CAT) et les teneurs excrétées en nitrites [(NO₂⁻/CAT) Pb²⁺ : $p=0,007$; (NO₂⁻/CAT) Cd²⁺ : $p=0,049$], ces dernières sont situées au seuil d'un risque de significativité de 5,4% et 7,2% respectivement, sous l'effet de l'augmentation de la concentration en éléments métalliques cadmium et plomb. Aussi, l'excrétion d'ammonium (N-NH_{3,4}) ne révèle aucune corrélation significative ($p>0,05$) avec l'augmentation de la concentration, ni avec les taux d'induction de la CAT, ni même avec les teneurs excrétées en nitrites (N-NO₂), sous l'effet des deux xénobiotiques Pb²⁺ et Cd²⁺.

A la différence du cuivre, le plomb ne présente aucune corrélation significative avec le métabolisme d'excrétion du phosphore ni avec celui des composés azotés (N-NO₂, N-NH_{3,4}). En revanche, le cadmium montre un effet significatif sur l'excrétion phosphorée ($p = 0,019$), cette dernière étant fortement corrélée avec l'état de stress CAT ($p=0,004$).

Tableau IV.5 : Matrice de corrélation (r de Pearson) test Pb et Cd

Variables	[C]	(N/P) _{Pb}	(NO ₂ ⁻ /NH ₄ ⁺) _{Pb}	(N/P) _{Cd}	(NO ₂ ⁻ /NH ₄ ⁺) _{Cd}
[C]	0	0,098	0,284	0,972	0,146

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification alpha=0,05

D'après le tableau ci-dessus, l'effet de la concentration des éléments métalliques Pb et Cd ne montre aucune corrélation significative avec les rapports (N/P) et (NO₂⁻/NH₄⁺). Comme observé dans le test de cuivre, la moule *Perna perna* présente cette fois aussi une excrétion phosphorée supérieure à l'excrétion ammoniacale.

❖ Discussion

Bien qu'ils soient résistants aux métaux du point de vue de l'action létale, les mollusques bivalves répondent très bien au niveau physiologique et au niveau comportemental à des concentrations sublétales [251].

Les données expérimentales publiées indiquent que les métaux, à des concentrations bien inférieures aux seuils létaux, provoquent chez les bivalves une réduction du volume d'eau pompée [299, 300], et par conséquent, une diminution de la quantité de **nourriture ingérée** par unité de temps []. En effet, les effets sur l'excrétion en tant que processus énergétique sont certains. Cependant, en ce qui concerne l'excrétion, il existe moins d'informations sur l'excrétion azotée que sur la respiration et la filtration.

Avec l'augmentation de la concentration en Pb (de 0,1495mg/L à 7,223mg/L ; pd 48h), Chini *et al.*, [301] ont relevé une tendance à la baisse des taux d'excrétion ammoniacale. Or, ces mêmes auteurs relèvent encore des réductions significatives des rapports O/N à différentes concentrations de Pb. La tendance d'excrétion est donc vers la mobilisation des protéines (comme discuté dans le cas du Cu). Un tel résultat indique une baisse de la respiration plus marquée que celle de l'excrétion. Ainsi, les effets se manifestent principalement sur le mécanisme de captage de l'oxygène, élément clé des processus énergétiques, notamment modulé par le mouvement mécanique des valves des moules en réponse au stress.

La particularité de la respiration des bivalves est due essentiellement à la nature diffusible de la prise d'O₂ (absence de pigment respiratoire) et à l'existence d'une

activité valvaire qui fait que la consommation d'O₂ peut être continue ou s'arrêter selon les conditions environnementales.

La diminution de l'excrétion ammoniacale en présence de substances toxiques peut être attribuée à la réduction du taux métabolique ou à l'interaction du plomb avec les voies de production des composés azotés [251]. Chez les post-larves de *Penaeus indicus* exposées à des concentrations sublétales de plomb l'excrétion d'ammonium s'est trouvée inhibée [301].

Dans notre étude, la relation dose/effet (excrétion azotée et phosphorée) en réponse à l'exposition des moules *Perna* au Pb (à des concentrations allant de 0,05 à 0,5 mg/L) n'était pas significative. Les concentrations testées, notamment la durée du test de 96 heures, semblent ne pas être suffisantes pour observer des effets significatifs sur l'excrétion des individus *Perna*. Ainsi, après exposition à une concentration sublétale (1,44mg/L) de plomb pendant 30 jours, il était évident que le plomb inhibe la consommation d'oxygène chez *Penaeus indicus* [251], et donc perturber le métabolisme énergétique global.

De plus, Boudjemaa *et al.*, [295] ont rapporté des corrélations positives dans la relation dose/effet pour l'excrétion azotée et phosphorée chez *Perna perna* exposée au Pb (de 0,05 à 8mg/L) pendant 72 heures. Selon Kourdali *et al.*, [277], une augmentation de l'excrétion ammoniacale et phosphorée chez la moule *Perna perna* est observée sous l'effet de concentrations de Pb supérieures à 3mg/L (pendant 72 heures). En revanche, les concentrations de Pb inférieures à 3mg/L n'ont montré aucun effet significatif ($p>0,05$) sur ces deux types d'excrétion.

Le plomb (Pb) est considéré comme le métal le moins toxique pour les bivalves. Benyahia *et al.*, [302] n'ont pas observé d'effets histopathologiques notables chez *Dreissena* (moule d'eau douce), suggérant une grande efficacité des mécanismes de détoxification contre ce métal. Cette efficacité résulte probablement de la rapidité de la détoxification, car chez les bivalves, le plomb, contrairement aux autres métaux, semble être pris en charge directement par les structures lysosomales sans transiter par des métallothionéines.

Sous l'effet du **Cd**, la relation dose/effet est positivement significative ($p<0,05$) en observant l'excrétion phosphorée. Cette dernière s'est trouvée encore positivement

corrélée avec l'état de stress exprimé par la CAT. Nos résultats sont comparables à ceux rapportés par Boudjemaa *et al.*, [295] chez l'espèce *Perna perna* pour des concentrations allant de 0,05 à 8mg/L de Cd. Considérant l'excrétion ammoniacale, le Cd ne semble pas perturber la physiologie des individus *Perna* de la présente étude, contrairement aux résultats de Boudjemaa *et al.*, (2014), qui ont observé des augmentations significatives de l'excrétion ammoniacale ; bien que l'effet des fortes concentrations soit détectable, les concentrations examinées dépasse de loin celles retrouvées dans le milieu marin même pour les eaux côtières.

Pour que des effets soit perçus, les chercheurs augmentent généralement les concentrations d'exposition dans un but de minimiser la durée d'étude. La toxicité létale du Cd est très variable selon les espèces étudiées et indépendamment des conditions d'essai. Il est rapporté par exemple, dans les mêmes conditions expérimentales, une CL₅₀, 96 h de 0,8mg/L pour *Crassostrea gigas*, alors qu'elle est supérieure à 10mg/L pour *Perna perna*.

Les concentrations testées dans la présente étude varient de 0,05 à 0,5 mg/l de Cd. Pour ces concentrations réalistes, la physiologie des moules *Perna* semble être stable en termes d'excrétion, qui reste dépendante des mécanismes énergétiques de la respiration et de la filtration, tous deux conditionnés par la réponse d'ouverture/fermeture des valves des moules.

Il est peu probable que le Cd exerce un effet inhibiteur sur l'activité ciliaire aux concentrations testées dans cette étude. La tolérance des bivalves en général envers le Cd est démontrée par le seuil élevé de fermeture des valves face à ce métal. Toutefois, il faut une concentration de 3mg/L Cd pour provoquer ce mécanisme chez la moule *Mytilus*. Or, chez l'espèce *Perna viridis* Cheung *et al.*, [303], relevèrent une augmentation de l'excrétion ammoniacale sous l'effet de concentrations en Cd allant de 0,15 à 1,5mg/L. Ces mêmes auteurs rapportent des valeurs de O/N<30, concluant que les individus *Perna* ont recours au catabolisme des protéines comme réponse au stress enduré.

❖ Synthèse

Dans cette partie de l'étude sur les effets du Pb et du Cd, l'état de stress (CAT) s'est trouvé corrélé avec les taux NO_2^- mais pas avec les taux d'ammonium NH_4^+ , sans pouvoir établir des relations nettes entre $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ ($p=0,146$) ; nous suggérons ainsi que les effets seront certainement perçus et mesurables pour des durées d'exposition plus longues. Si le plomb n'a révélé aucune corrélation significative avec les taux de phosphates, le cadmium a montré une corrélation avec la concentration et l'état de stress (CAT). En se référant au test du cuivre (de la présente étude) et aux travaux de Kourdali *et al.*, [277] ainsi que Boudjemaa *et al.*, [295], la physiologie de *Perna* démontre une sensibilité à l'excrétion des phosphates plus marquée comparativement à l'excrétion d'ammonium, et ce, contrairement à la moule *Mytilus*.

Dans notre étude de l'effet des ETM (essentiels Cu, et non essentiels Cd et Pb), le cuivre s'est avéré très toxique pour les deux espèces de moules *Mytilus* et *Perna*. Ses effets délétères se manifestent par un déséquilibre de la balance rédox et la génération de ROS (stress oxydatif) au niveau cellulaire, ainsi que par des impacts sur la physiologie et l'excrétion des composés azotés et phosphorés. Bien qu'élément essentiel biologiquement régulé, une grande attention doit être portée à cet élément dont il est considéré pour certains scientifiques comme moins toxique que les éléments non essentiels. Au contraire, les éléments essentiels ont des rôles bien précis au niveau cellulaire et peuvent traverser la membrane cellulaire d'une façon régulée ; mais en dépassant la concentration recommandée au processus biologiques les effets répercutés sur les mécanismes cellulaires seront compromis et sujettes à des effets délétères.

D'un point de vue écotoxicologique, les concentrations utilisées dans cette étude en Pb et Cd, étaient réalistes vis-à-vis des concentrations retrouvées en milieu marin, cependant la durée d'exposition était insuffisante pour démontrer des effets observables aux mêmes grandeurs que le cas du cuivre. De même, les deux espèces de moules ne dévoilent pas une même physiologie de point de vue réponses au stress métallique. Aussi, l'espèce *Perna* démontre une sensibilité plus accrue que l'espèce *Mytilus*. Ainsi, la moule *Mytilus* serait une candidate plus appropriée pour être utilisée dans les programmes de biomonitoring, répondant ainsi aux critères de choix d'un bioindicateur plus efficace.

Par ailleurs, la mesure des biomarqueurs de stress oxydatif révèle une pertinence incontournable pour prédire les effets précoces des ETM sur les réponses des

organismes (surtout biochimiques) marins avant que ses effets soient répercutés aux niveaux biologiques supérieurs (viabilité individus, population écosystème entier). Toutefois, la validation de l'approche biomarqueurs est parfois redoutable.

L'activité d'excrétion a été étudiée pour comprendre l'effet des éléments traces métalliques (ETM) sur la physiologie des bivalves, plutôt que comme un biomarqueur strict pour le biomonitoring des écosystèmes. Cependant, comprendre les mécanismes d'excrétion est crucial en aquaculture. Les effets des facteurs environnementaux tels que la température, la salinité et le pH sont bien documentés. Par exemple, une moule adulte excrète en moyenne 2,5mg/jour/individu de $N-NH_4^+$ et 0,6mg/jour/individu de $P-PO_4^{3-}$. Les nutriments libérés par les moules sont considérés comme un facteur important pour évaluer l'état physiologique et la qualité d'un environnement marin.

Les réponses physiologiques présentent trois aspects importants qui peuvent être utilisés comme indices pour surveiller la qualité de l'environnement, comme suit :

- (1) Ils représentent l'intégration de plusieurs processus cellulaires biochimiques qui peuvent être modifiés en fonction des variations environnementales ;
- (2) Ils représentent les réponses non spécifiques des organismes face à plusieurs circonstances extérieures ; et
- (3) Ils sont encore capables de refléter la détérioration de l'environnement avant qu'elle n'atteigne la population ou la communauté.

Comme nous l'avons vu dans cette partie du présent travail, les polluants métalliques peuvent stimuler l'excrétion des moules et parfois, pour des taux libérés très significatifs peut conduire à des effets néfastes pour les activités d'élevage des moules (mytiliculture) en premier lieu et voir même sur l'environnement adjacent. La mytiliculture peut entraîner certains effets négatifs sur les milieux marins, tels que le blocage du courant d'eau, l'augmentation du taux de sédimentation et la circulation des nutriments polluants dans l'eau de mer [304].

IV.5/- Conclusion sur la première série d'expériences des tests courte durée de l'effet des ETM (Cu, Pb et Cd).

Pour résumer et présenter les résultats de notre première série d'expériences sur les effets à court terme des métaux traces (Cuivre, Plomb et Cadmium), nous avons choisi de représenter les données sous forme d'un graphique radar, après avoir normalisé les données pour une comparaison équitable (fig IV.4 ; A et B).

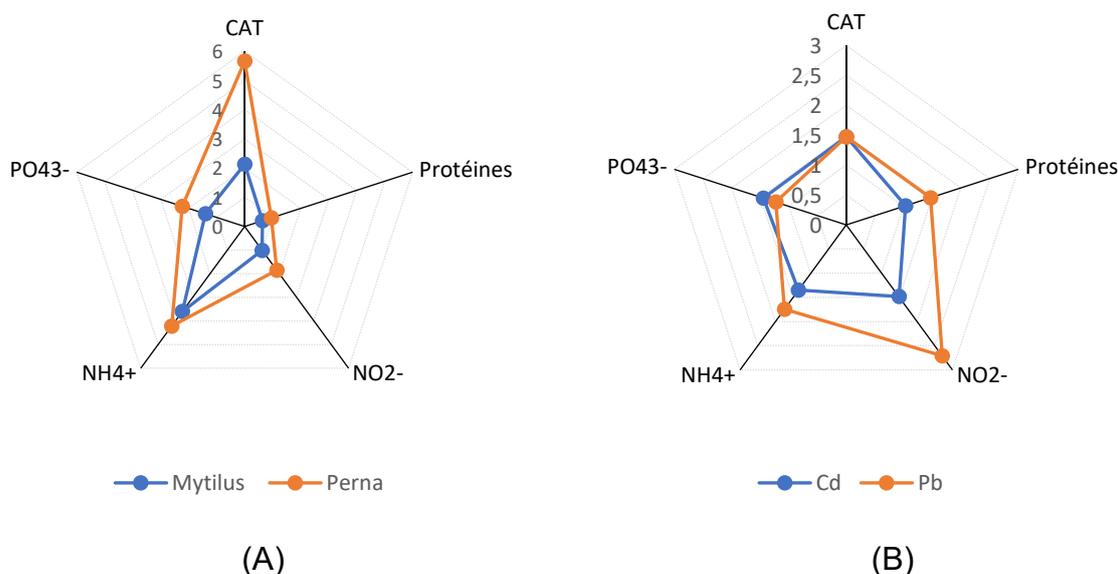


Figure IV.4 : Représentation graphique radar des résultats tests courte durée.

Perna perna se distingue par une sensibilité accrue aux stress, comme en témoignent ses réponses élevées à tous les paramètres étudiés : stress oxydatif, mobilisation des réserves protéiques révélant un déficit du métabolisme énergétique, encore confirmé par les taux d'excrétion des composées azotées. De plus, l'excrétion phosphorée chez *Perna* est notablement plus élevée par rapport à *Mytilus*.

Les résultats interprétés suggèrent d'une part que *Perna perna* est sensible au stress induit par le cuivre, tandis que d'autre part, les différences observées pourraient également être attribuées à des différences biologiques entre les espèces. Cependant, notre attention se porte principalement sur la première hypothèse.

Chez *Perna perna*, les différences dans les effets de la contamination par le Pb et le Cd sont clairement observables sur l'activité d'excrétion, bien que les réponses du stress oxydatif (CAT) ne soient pas nettement distinctes.

Le Pb semble stimuler davantage la mobilisation des protéines avec des taux élevés de teneurs en nitrites et ammonium, tandis que le cadmium augmente les taux d'excrétion phosphorée. Il semble que la cible biologique varie selon le métal. Cependant, l'effet notable de la contamination est une perturbation généralisée du métabolisme énergétique, nécessaire soit pour la défense soit pour l'activité d'excrétion de base.

IV.6/- Etude de la spéciation des métaux testés

Dans le contexte de l'évaluation du risque environnemental et de la caractérisation de l'exposition, les concepts de biodisponibilité et de spéciation chimique sont de première importance pour comprendre la toxicité des métaux traces [305].

La spéciation joue un rôle fondamental dans les interactions entre les ions métalliques et les organismes vivants. Différentes recherches expérimentales ont montré que les organismes aquatiques sont essentiellement influencés par les concentrations des ions métalliques libres en solution [109, 112, 113, 306]. Cependant, la présence de complexants, qu'il s'agisse de ligands minéraux (HCO_3^- , CO_3^{2-} , OH^- etc.) ou organiques, réduit significativement la concentration de ces ions métalliques libres [111, 127, 307, 308].

Pour estimer les différentes formes en ETM dans le milieu d'élevage des bivalves de la présente étude, nous avons utilisé le logiciel de spéciation Phreeqc.

Les programmes d'équilibre chimique sont utilisés pour visionner la distribution des espèces dans un échantillon contenant des concentrations totales définies de métal et de ligands, à condition que les constantes de stabilité appropriées soient disponibles.

Les tableaux ci-dessous regroupent les pourcentages des différentes entités d'éléments chimiques (cuivre, plomb et cadmium) susceptibles d'être présentes dans le milieu de test en interaction avec les individus de moules *Mytilus* et *Perna*. L'application du modèle Phreeqc affiche les concentrations et l'activité de chaque forme chimique avec les valeurs des log décimaux.

Tableau IV.6 : Etude de la spéciation du cuivre

	Myt 35	Per 35	Myt 25	Per 25	Myt 15	Per 15	Myt 5	Per 5
CuCl⁺	53.826357	53.8248238	54.3083475	53.8299746	54.2994858	53.8235233	54.3045538	53.8271117
CuCl₃⁻	24.6875558	24.6868526	23.9428628	24.6834029	23.9464399	24.6882828	23.9420077	24.6832612
CuCl₄²⁻	10.3281465	10.3278523	9.78989945	10.3260769	9.7932406	10.3273427	9.79082103	10.3293647
Cu²⁺	5.95404076	5.95387117	6.11468802	5.95489095	6.11527543	5.95505649	6.11651291	5.95478675
CuCl₂	4.37696279	4.37969506	4.93894029	4.37918441	4.93995322	4.37895332	4.94041429	4.3785785
CuOH⁺	0.49226546	0.49225144	0.51388974	0.49190839	0.51419513	0.49223222	0.51424312	0.49226504
Cu(OH)₂	0.31770122	0.31769217	0.38415757	0.31758085	0.38419636	0.31762079	0.38423222	0.31764197
CuCO₃	0.01139096	0.01138206	0	0.01140188	0	0.01140741	0	0.01140951
CuSO₄	0.00545978	0.00545962	0.00721445	0.00545898	0.00721327	0.00546102	0.0072146	0.00546072
CuHCO₃⁺	0.00011957	0.00011948	0	0.0001197	0	0.00011974	0	0.00011978
Cu(OH)₃⁻	2.0911E-07	2.0913E-07	2.7378E-07	2.0912E-07	2.7386E-07	2.0915E-07	2.7382E-07	2.0923E-07
Cu₂(OH)₂²⁺	1.1488E-11	1.1491E-11	1.9492E-11	2.0912E-07	1.17E-11	4.9263E-12	3.9003E-12	1.6422E-12
Cu(CO₃)₂²⁻	2.3088E-13	2.3061E-13	0	2.3148E-13	0	2.3162E-13	0	2.3163E-13
Cu(OH)₄²⁻	4.4055E-19	4.4083E-19	1.0466E-18	4.4072E-19	1.0467E-18	4.4083E-19	1.0469E-18	4.4086E-19

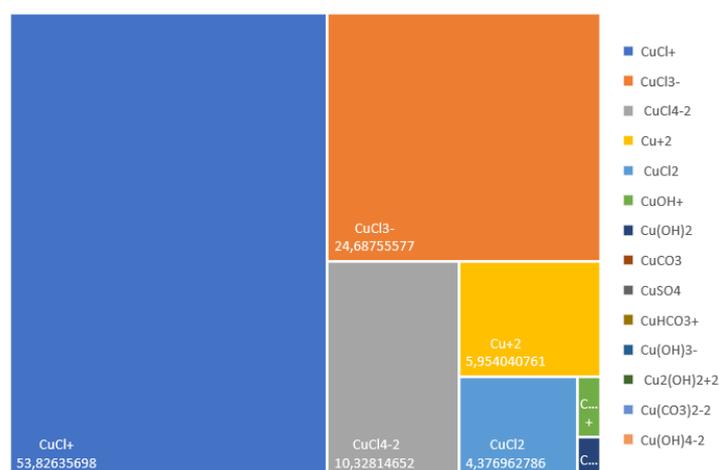


Figure IV.5 : graphique de spéciation de cuivre (test corte durée).

Myt 35 : *Mytilus* à 35µg/L ; Per 35 : *Perna* à 35µg/L ;

Myt 25 : *Mytilus* à 25µg/L ; Per 25 : *Perna* à 25µg/L ;

Myt 15 : *Mytilus* à 15µg/L ; Per 15 : *Perna* à 15µg/L ;

Myt 5 : *Mytilus* à 5µg/L ; Per 5 : *Perna* à 5µg/L

Tableau IV.7 : Etude de la spéciation du plomb et du cadmium

	500	250	100	50		500	250	100	50
PbCl ₃ ⁻	81,1982603	81,1999154	81,1998851	81,1982624	CdCl ₃ ⁻	76,4557173	76,4510231	76,453349	76,4557341
PbCl ₂	18,5816019	18,5799806	18,5799737	18,5816024	CdCl ₂	23,4186882	23,4233773	23,4210259	23,4186933
PbCl ⁺	0,21359542	0,21355978	0,2135997	0,21359543	CdCl ⁺	0,11897334	0,11897715	0,11900521	0,11895336
PbCO ₃	0,0046619	0,004664	0,00466099	0,0046599	CdOHCl	0,00650364	0,00650494	0,00650228	0,00650164
PbSO ₄	0,00118097	0,0011808	0,001181	0,00118057	CdSO ₄	0,00011719	0,00011722	0,00011721	0,00011717
PbOH ⁺	0,00044819	0,000448	0,0004481	0,00044799	CdOH ⁺	2,0019E-07	2,0015E-07	2,0011E-07	1,9999E-07
PbCl ₄ ⁻²	0,0002072	0,00020724	0,0002072	0,0002072	CdHCO ₃ ⁺	1,0955E-07	1,0954E-07	1,095E-07	1,0951E-07
Pb(OH) ₂	3,0839E-05	3,0844E-05	3,084E-05	3,0839E-05	CdCO ₃	3,7858E-08	3,7861E-08	3,7852E-08	3,7858E-08
PbHCO ₃ ⁺	1,3314E-05	1,3312E-05	1,331E-05	1,3304E-05	Cd(OH) ₂	2,7738E-09	2,7748E-09	2,7741E-09	2,7738E-09
Pb(OH) ₃ ⁻	7,3898E-09	7,388E-09	7,388E-09	7,3878E-09	Cd ²⁺	2,5879E-11	2,5868E-11	2,5861E-11	2,5859E-11
Pb ²⁺	1,2724E-10	1,272E-10	1,272E-10	1,2714E-10	Cd(SO ₄) ₂ ⁻²	2,9898E-13	2,9896E-13	2,9881E-13	2,9878E-13
Pb(SO ₄) ₂ ⁻²	1,3642E-12	1,3636E-12	1,363E-12	1,363E-12	Cd(OH) ₃ ⁻	5,6737E-15	5,6728E-15	5,6732E-15	5,6717E-15
Pb(CO ₃) ₂ ⁻²	3,2939E-13	3,2924E-13	3,29E-13	3,2879E-13	Cd(CO ₃) ₂ ⁻²	2,9998E-18	2,9988E-18	2,9981E-18	2,9978E-18
Pb ₃ (OH) ₄ ⁺²	6,3299E-17	1,5816E-17	2,53E-18	6,3239E-19	Cd(OH) ₄ ⁻²	9,0595E-28	9,0573E-28	9,0544E-28	9,0515E-28
Pb(OH) ₄ ⁻²	3,4579E-19	3,4572E-19	3,456E-19	3,4559E-19	Cd ₂ OH ⁺³	3,2638E-31	1,631E-31	6,5203E-32	3,2598E-32
Pb ₂ OH ⁺³	1,4928E-26	7,456E-27	2,981E-27	1,4904E-27					

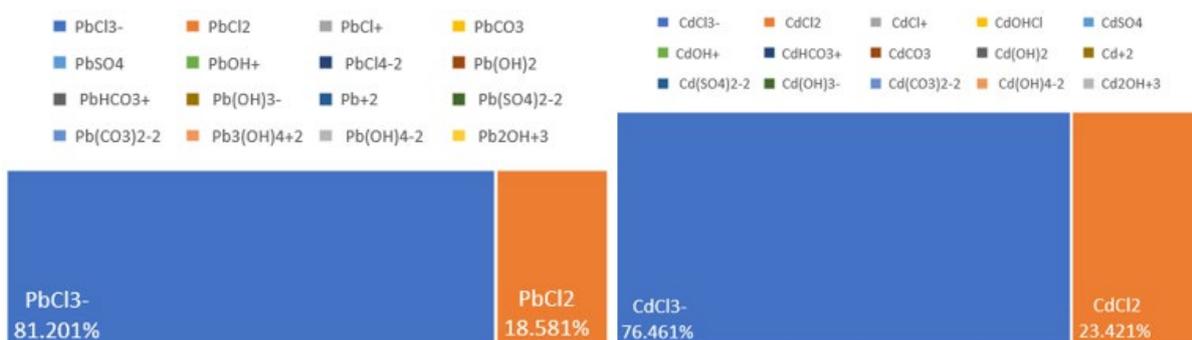


Figure IV.6 : graphique de spéciation du plomb et du cadmium

D'après les tableaux (IV.6 et IV.7), la spéciation des éléments métalliques cuivre, plomb et cadmium s'est trouvée concentrations indépendante (au moins pour les concentrations testées), mais métal dépendante. Aussi, la complexation avec les ligands chlorures est prédominante. Ainsi, plus de 81% du plomb se trouve, dans le milieu d'élevage, sous la forme PbCl₃⁻ et environ 18% sous la forme PbCl₂. Pour le cadmium aussi, les deux entités qui domine sont CdCl₃⁻ (76%) et CdCl₂ (23%). Par ailleurs, le résultat remarquable est l'absence des ions libres Pb²⁺ et Cd²⁺.

Bien que le cuivre ait été testé à de très faibles concentrations comparativement au plomb et au cadmium, sa distribution dans le milieu s'est trouvée assez large selon l'ordre décroissant suivant : CuCl^+ (53,82%), CuCl_3^- (24,68%), CuCl_4^{2-} (10,33%), l'ion libre Cu^{2+} (5,95%) et CuCl_2 (4,38%).

❖ Discussion :

Les courants dans les mers et océans font que l'eau est régulièrement mélangée, ce qui conduit à des concentrations en ions majeurs (Cl^- , Na^+ , SO_4^{2-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} et K^+) relativement stables [305]. La composition du milieu détermine la quantité de ligands disponible aussi appelée capacité complexante. Ainsi, étant donné la composition de l'eau de mer riche en ions chlorure et la simplicité de notre dispositif expérimental, la complexation des ions métalliques avec les ligands chlorures semble être la voie prédominante. Les chlorures en eau de mer deviennent compétiteurs par rapport aux hydroxydes et carbonates qui prédominent en eaux douces [309]. Toutefois, Les complexes avec OH^- et CO_3^{2-} sont forts alors que ceux avec Cl^- et SO_4^{2-} sont plus faibles [310].

D'après l'étude de Stefka Tepavitcharova [309], de la spéciation du Fe, Mn, Cu, Zn, Cd et Pb, les formes prédominantes en eau douce sont : CuCO_3 (81,8%), PbCO_3 (77,2%) et Cd^{2+} (78,3%). Alors, en eau de mer les ligands chlorure prédominent dans la complexation des métaux MeCl_n^{2-n} ($n=1-4$, Me= Mn, Zn, Cu, Pb et Cd).

Aussi, Les complexes formés entre les ligands inorganiques et les métaux traces ont souvent des constantes de stabilité relativement faibles et les métaux ainsi complexés sont appelés métaux sous formes mobiles ou labiles [311]. En effet, l'estimation de la fraction labile est très importante, parce qu'elle est très active et est principalement responsable de la biodisponibilité des métaux dans leur environnement [312]. Il est considéré comme toxique la fraction labile composée de la forme libre du métal, des complexes inorganiques et des hydroxydes. Ainsi, les formes complexées des métaux de la présente étude (Cu, Pb et Cd) ne réduisent pas leur toxicité.

La spéciation semble dépendre de la nature spécifique du métal considéré (Cuivre, Plomb et Cadmium). Les propriétés d'un métal sont principalement influencées par des facteurs tels que sa charge ionique, son électronégativité (qui affecte son aptitude à s'associer avec d'autres éléments), son rayon atomique (qui détermine l'encombrement stérique, entre autres). Ces variations dans ces caractéristiques physiques et chimiques influencent également les propriétés biologiques, la forme chimique et les fonctions potentielles des éléments [313].

Selon le concept de Lewis (pour les acides et bases), le Cd se comporte comme un acide faible. Or, en eau de mer, les ions SO_4^{2-} et Cl^- (à fortes concentrations) ont un caractère basique « plus doux » que les ions H_2O , OH^- et PO_4^{3-} . Par conséquent, les ions SO_4^{2-} et Cl^- entreront en compétition pour la coordination autour de Cd. Étant donné que les ions Cl^- sont encore beaucoup plus « mous » que SO_4^{2-} , il faut s'attendre à ce que les complexes chlorure de Cd dominent principalement [309]. D'après Rasmussen [314], dans l'eau douce, plus de 70% du Cd total est sous forme de Cd^{2+} . La quantité de cette forme ionique diminue rapidement avec l'augmentation de la salinité en raison de la formation de complexes Cd-chloro. De même, dans les eaux de mer, les chlorocomplexes sont dominants pour Mn, Zn, Pb et Cd [309, 314-316]. Ainsi, la spéciation observée dans la présente étude est similaire à ce qui est rapporté dans la littérature scientifique.

De plus, les faibles niveaux d'activité de la catalase (CAT) en réponse à l'exposition au plomb et au cadmium (50 à 500 $\mu\text{g/L}$) dans la présente étude peuvent être encore expliqués par l'étude de la spéciation de ces métaux. L'absence des ions libres Pb^{2+} et Cd^{2+} dans le milieu réduit certainement la toxicité de ces métaux. Généralement, la forme ionique libre des métaux est considérée comme la plus assimilable mais aussi la plus toxique pour les organismes. En revanche, les fortes inductions de la catalase en réponse à l'exposition des moules au cuivre (5 à 35 $\mu\text{g/L}$) sont dues, d'une part, à l'activité de la fraction la plus biodisponible du cuivre (où Cu^{2+} représente 5,95% de la concentration totale du métal en solution) et, d'autre part, aux effets des autres formes complexées dites labiles.

La spéciation chimique détermine donc l'entrée du métal dans la cellule. Toutefois, la compréhension des effets toxiques des métaux en biologie suppose de contrôler leur spéciation dans deux « compartiments » : à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule [317]. Par analogie, on appelle également complexation avec le ligand biotique la fixation du métal par les organismes [318].

La toxicité des éléments traces métalliques (ETM) pour les organismes repose sur leurs interactions avec divers composants cellulaires tels que les protéines, enzymes, acides nucléiques et métabolites, ainsi que sur les structures de la paroi cellulaire, de la membrane et du cytoplasme [89]. Le passage des métaux toxiques ou biodisponibles de la solution vers le cytoplasme à travers la membrane dépend de leur affinité pour les ligands de la solution et les récepteurs membranaires, ainsi que de la répartition entre la solution et la membrane pour les complexes lipophiles [319].

La quantité de métal présente dans la cellule est principalement influencée par son affinité pour les ligands intracellulaires comme les groupes thiol des protéines, plutôt que par sa capacité à traverser la membrane [89]. Le cuivre, en tant qu'oligoélément, a tendance à pénétrer dans la cellule et à se lier à divers constituants, tandis que le cadmium est capté par les métallothionéines comme chélateur. Le plomb, quant à lui, est biominéralisé sous forme de granules dans le système lysosomal. Selon la spéciation, le cuivre semble être le plus toxique.

La spéciation des métaux dans les milieux aquatiques est gouvernée par la complexation, la précipitation et l'adsorption, des processus qui peuvent augmenter ou diminuer la toxicité des substances chimiques présentes.

Selon Laura *et al.*, [109], la complexation des ions métalliques avec les composés issus de l'activité métabolique des organismes aquatiques (excrétion dissoute : azote ammoniacal, nitrite) joue également un rôle important dans la spéciation des espèces chimiques. Les ions Cu^{2+} forment des complexes forts avec les groupes donneurs d'électrons tels que l'oxygène, l'azote et le soufre, bien que les constantes de stabilité de ces complexes soient encore mal connues.

L'adsorption reste une voie significative pour réduire la biodisponibilité des éléments traces métalliques (ETM). Dans notre étude, l'adsorption des ETM (Cu, Cd et Pb) sur les parois des bacs d'élevage contribue à diminuer leur concentration totale en solution, réduisant ainsi la fraction labile de ces métaux.

La biodisponibilité d'un contaminant dépend également de son temps de séjour dans le milieu étudié. Pour ces raisons, nous avons adopté une fréquence quotidienne de régénération de la concentration totale des ETM afin de minimiser les pertes de polluants.

Chez les bivalves filtrants tels que les moules, la biodisponibilité des ETM dépend de l'absorption par ingestion des particules en suspension [310]. Pour que les métaux soient assimilés, ils doivent être désorbés des particules ingérées dans le tractus digestif, processus influencé notamment par le pH du système digestif et le temps de transit digestif.

Les principales interfaces entre l'organisme et son environnement, telles que l'épithélium branchial, la paroi du tube digestif et le tégument pour les organismes à corps mou, jouent un rôle crucial dans la régulation des échanges respiratoires et nutritionnels. La sécrétion de mucus, riche en molécules chélatantes comme l'acide sialique, peut limiter l'accessibilité des polluants, réduisant ainsi leur biodisponibilité [310, 320].

Pendant l'exposition des moules, de notre étude, aux ETM (Cd, Pb et surtout Cu), nous avons observé une production accrue de mucus dans les bacs d'essai, signe visible de la toxicité des métaux. Alors, les coquilles des moules semblent relativement imperméables aux métaux, agissant principalement comme site d'adsorption ou de

L'étude de la spéciation est donc cruciale pour déterminer le degré de contamination des écosystèmes aquatiques et identifier les concentrations biodisponibles affectant les organismes. Cette analyse est particulièrement importante lorsque les systèmes sont étudiés de manière intégrée, en tenant compte des interactions entre les différents compartiments et matrices de l'écosystème aquatique, tels que l'eau, les sédiments et le biote. Malgré les avancées technologiques et les logiciels spécialisés disponibles, l'étude de la spéciation reste complexe et nécessite des moyens analytiques très sophistiqués.

IV.7/- Résultats du test d'exposition chronique des moules *Mytilus* au cuivre

IV.7.1/- Mesure des paramètres physico-chimiques

Les différents résultats des mesures de la température (T°C), Salinité (Sal), Oxygène dissous (DO₂ mg/l) et le pH sont regroupés dans le tableau (IV.8) ci-dessous.

Tableau IV.8 : Paramètres physicochimiques de l'eau d'élevage

	T (°C)	Sal	pH	σ (ms.cm ⁻¹)	DO ₂ (mg/l)
Bac Témoin (0µg/l)	15,61 ± 1,3	36,60 ± 0,35	8,36 ± 0,17	55,94 ± 0,45	7,10 ± 0,72
Bac C1 (30µg/l)	16,03 ± 2,03	36,77 ± 0,22	8,39 ± 0,34	56,17 ± 0,23	7,37 ± 0,33
Bac C2 (60µg/l)	16,08 ± 1,04	36,79 ± 0,23	8,38 ± 0,11	56,21 ± 0,25	7,78 ± 0,73
Bac C3 (90µg/l)	15,52 ± 2,55	36,71 ± 0,12	8,35 ± 0,07	55,96 ± 1,51	7,41 ± 0,85

D'après le tableau (IV.8), nous constatons que la variation des paramètres physicochimiques de l'eau d'élevage est presque identique dans tous les bacs expérimentaux et reste dans l'intervalle de tolérance des spécimens *Mytilus* tout au long de la période d'étude.

Plus particulièrement, les valeurs journalières de l'oxygène dissous mesurées pendant le cycle expérimental (moyenne de 7mg/L) répondaient aux besoins des spécimens. La respiration fournit l'énergie nécessaire au métabolisme des organismes vivants, avec une distinction entre l'énergie allouée à la croissance somatique et au métabolisme général, et celle dédiée à la croissance gonadique et à la reproduction. Dans des conditions environnementales stressantes, l'approvisionnement énergétique optimal pour tous les organes peut être compromis, entraînant une mauvaise croissance et un mauvais état de santé [7, 19].

En conclusion, les paramètres physico-chimiques n'ont probablement pas d'effet stressant significatif. Le seul facteur de stress pouvant altérer les moules est l'agent métallique Cu²⁺, agissant comme un xénobiotique.

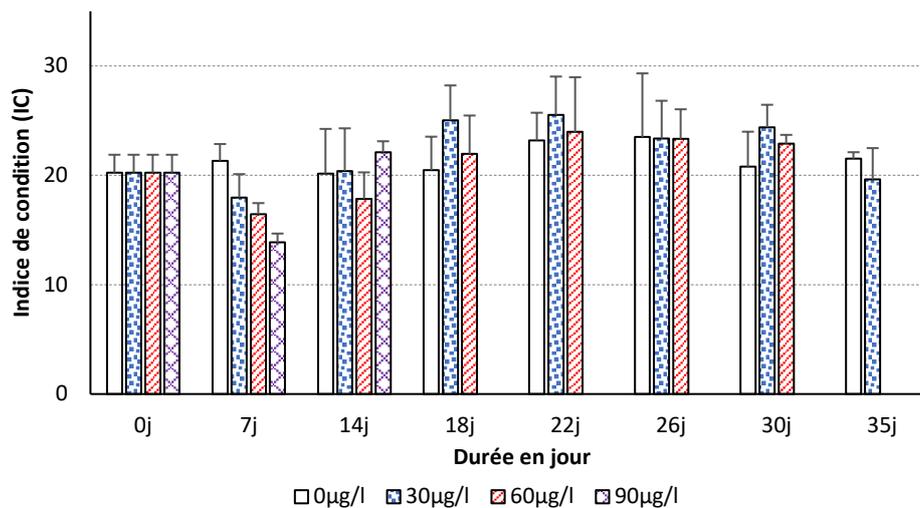
IV.7.2/- Résultats des mesures biométriques

Les mesures biométriques, telles que les indices de condition et les indices somatiques, sont essentielles pour évaluer l'état de santé et les effets des polluants sur divers organismes, notamment les bivalves. Bien que ces indices aient été initialement développés pour la conchyliculture, leur utilisation en biosurveillance et en écotoxicologie est de plus en plus courante. Ils permettent de mesurer la masse des tissus mous par rapport à la masse totale ou aux dimensions de la coquille, fournissant ainsi des indications sur le statut nutritionnel et le stress des organismes. Des conditions de stress, comme l'exposition aux contaminants, entraînent une réduction des réserves énergétiques et de la croissance, ce qui se traduit par des indices plus faibles dans les groupes les plus contaminés [207, 321, 322].

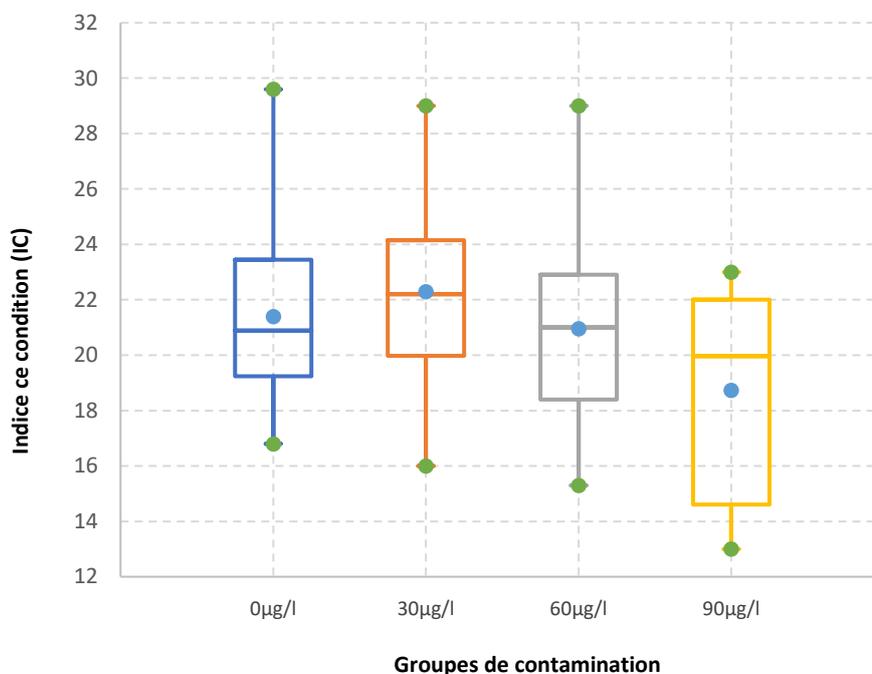
Les illustrations graphiques de la figure IV.6 (A et B), représente les variations de l'indice de condition des moules *Mytilus* exposé au cuivre.

Pour les concentrations 0µg/L, 30µg/L et 60µg/L ; le traitement statistique (anova2, fig A) n'a mis en évidence aucune différence significative ($p>0,05$) entre les valeurs de l'indice de condition (IC). Les effets indépendants de la concentration et/ou de la durée d'exposition n'ont montré ainsi aucun effet significatif. Aussi, aucune interaction n'est relevée entres les concentrations et/ou entre concentrations/durée d'exposition.

Ces mêmes groupes (0µg/L, 30µg/L et 60µg/L) s'observent avec des différences interquartiles (Q3-Q1, fig B) identiques (4,2 ; 4,1 et 4,5 respectivement). La bonne sélection des individus au début de l'expériences a permis d'obtenir des distributions de l'indice de condition (IC) relativement homogènes (toutefois, les individus témoins aient montré des gains étalés vers les grandes valeurs). Ainsi, les concentrations 30µg/L et 60µg/L n'ont pas montré d'effet observable sur la biométrie des individus *Mytilus*, du moins pour la durée testée dans la présente étude.



(A)



(B)

Figure IV.6 : Evolution de l'indice de condition IC1 au cours de la période d'étude.

Durant le cycle de contamination, et comparativement aux témoins (IC=21,33), l'effet de la concentration 90µg/L se manifeste significatif ($p < 0,05$) au 7^{ème} jour d'exposition, avec une diminution maximale de la condition des individus *Mytilus* (IC=13,86). Toutefois, la différence étant non significative ($p > 0,05$) comparativement aux valeurs de l'IC relevées sous l'effet des concentrations 30µg/L et 60µg/L pour la même durée.

Alors, au 14^{ème} jour d'exposition, les individus du groupe de contamination 90µg/L montrent une amélioration de leur indice de condition (IC=22,1), par rapport aux valeurs relevées au 7^{ème} jour d'exposition ($p < 0,01$). Ce groupe présente une distribution asymétrique de l'IC inclinant vers les valeurs inférieures (fig B). Cependant, les résultats ne peuvent pas être comparés à ceux des témoins ni à ceux des groupes de contamination 30µg/L et 60µg/L en raison de la mortalité élevée des moules exposées à 90 µg/L, qui a conduit à un nombre d'observations réduit.

Au début du cycle de détoxification, les individus du groupe précédemment exposés à 90µg/L continuent de présenter une mortalité élevée, atteignant plus de 50% au vingt-deuxième jour (huit jours de détoxification), rendant ainsi le test d'écotoxicité invalide pour cette concentration.

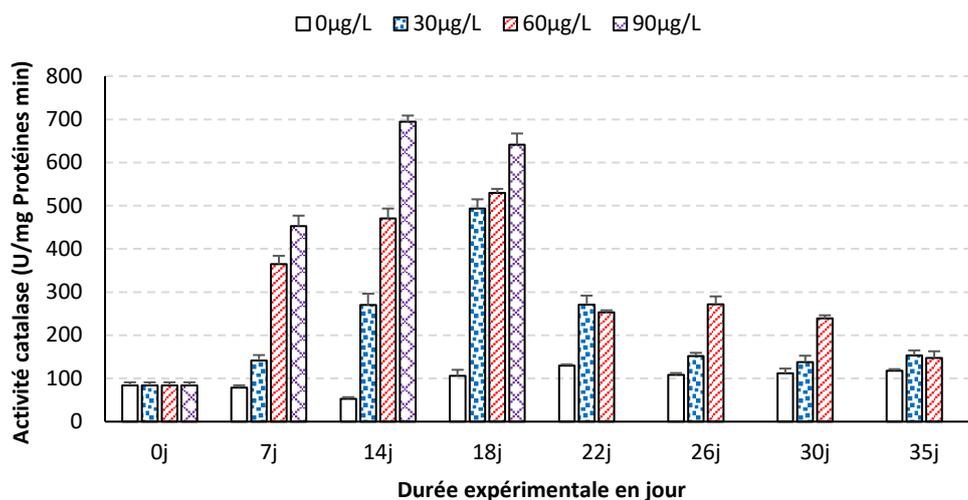
IV.7.3/- Résultats du dosage de la catalase (CAT)

La figure (IV.12) ci-dessous représente les variations des activités catalase CAT durant les deux cycles de contamination et de décontamination.

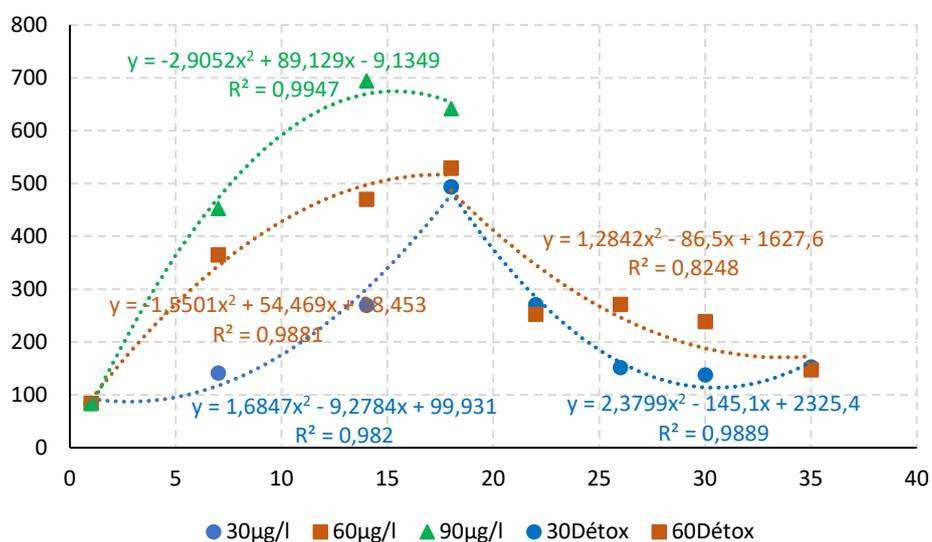
❖ Cycle de contamination

L'étude statistique (anova2, fig IV.7.A) n'a mis en évidence aucune différence significative ($p > 0,05$) entre les taux d'activité catalase CAT relevés chez les témoins, tout au long de la période d'étude, couvrant à la fois le cycle de contamination et celui de décontamination. Les activités CAT oscillaient entre 52,97 (min au 14^{ème} jour) et 129,79 (max au 22^{ème} jour) (moyenne : $98,64 \pm 24,94$). Ainsi, l'adaptation des moules aux conditions expérimentales paraît parfaite et aucun effet du milieu d'élevage sur les réponses biologiques des moules n'est donc probable.

Par ailleurs, et durant la période de contamination (0 à 14jours), des relations proportionnelles (fig IV.7 A et B) sont notées entre les niveaux d'induction de l'enzyme antioxydante CAT et les concentrations du cuivre testées. Ainsi, l'étude des relations doses-durée/effet, exprimées par $\Delta\text{CAT}/\Delta\text{temps}$ et $\Delta\text{CAT}/\Delta\text{concentration}$, a révélé des variations distinctes dans les réponses enzymatiques.



(A)



(B)

Figure IV.7 : Evolution de l'activité CAT durant la période d'étude.

Pour des différences statistiques significatives par rapport aux témoins ($p < 0,05$ à 7 jours et $p < 0,01$ à 14 jours), l'induction de la catalase CAT montre que le temps d'exposition est plus influent que la dose de 30µg/L. Pour cette dose, les stimulations de la CAT sont faibles mais continues avec le temps ($Y_{30} = 0,6744x^2 + 4,1818x + 79,144$). De plus, l'activité de la catalase mesurée au 14ème jour est statistiquement différente ($p < 0,01$) de celle mesurée au 7ème jour d'exposition.

En revanche, l'augmentation de la dose d'exposition (60µg/L et 90µg/L) entraîne des réponses enzymatiques accélérées ($\Delta\text{CAT} > \Delta\text{temps}$). La plus forte activité catalase mesurée au niveau de la chair des moules *Mytilus galloprovincialis* (918,287 U/mg Protéine.min) est observée au 14^{ème} jour d'exposition à la concentration la plus élevée du xénobiotique Cu (90µg/L). Cependant, les inductions de la catalase montrent une tendance à ralentir par la suite (figure, simulation polynomiale). Comparativement aux activités de la catalase des témoins, les concentrations de 60µg/L et 90µg/L induisent des différences significatives ($p < 0,01$) à 7 et 14 jours d'exposition.

Pour une même concentration d'exposition, la différence statistique entre les taux d'induction de la catalase reste significative ($p < 0,01$) entre les périodes d'exposition de 7 jours et de 14 jours. Par ailleurs, l'analyse des effets du gradient de concentrations (30, 60 et 90µg/L) montre des augmentations de l'activité catalase de plus en plus significatives pour une même durée d'exposition. Ainsi, la réponse enzymatique de défense antistress oxydatif de la catalase dépend non seulement de la durée d'exposition mais surtout de la dose d'exposition.

❖ **Cycle de décontamination**

Après 4 jours de détoxification (18j selon la fig IV.7.A), les moules *Mytilus* précédemment exposées à 90µgCu/L ont montré une baisse significative de l'induction de la catalase ($p < 0,05$) par rapport aux niveaux mesurés à la fin du cycle de contamination (14j). Cette diminution indique une inhibition de l'enzyme CAT plutôt qu'une réversibilité vers l'homéostasie, suggérant que l'animal devient incapable de se défendre, et, dans les cas extrêmes, cela conduit à la mort. Comme mentionné précédemment, le taux de mortalité (>50%) observé au 22^{ème} jour (après 8 jours de détoxification) a mis fin à la série de détoxification pour le groupe exposé à 90µg/L.

Pour les groupes exposés à 30µg/L et 60µg/L, les activités de la catalase ont continué d'augmenter ($\Delta\text{CAT} > 0$) jusqu'au 18^{ème} jour (4 jours de détoxification), montrant des différences d'induction très significatives ($p < 0,01$ pour les deux groupes) par rapport aux niveaux d'induction CAT observés à la fin du cycle de contamination (14j). Cependant, les niveaux atteints chez les deux groupes de moules (CAT30µg/L = 493,54 ; CAT60µg/L = 529,72) ne présentent pas de différence statistiquement significative ($p > 0,05$).

Après 8 jours de décontamination des moules *Mytilus*, une diminution notable de l'activité CAT est observée (entre 18j et 22j : $\Delta\text{CAT}_{30\mu\text{g/L}} = -222,83$ ($p < 0,01$) ; $\Delta\text{CAT}_{60\mu\text{g/L}} = -276,7$ ($p < 0,01$). Bien que la différence d'activité de la catalase entre les deux groupes ne soit pas significative ($p = 0,91$), elle reste significativement supérieure par rapport aux témoins ($p < 0,01$).

En analysant la cinétique de diminution du stress oxydant ($\Delta\text{CAT}/\Delta\text{temps}$), deux patterns distincts émergent entre les deux groupes de détox (fig B). Au 22^{ème} jour (8 jours de détox), les activités mesurées dans le groupe 30 $\mu\text{g/L}$ continuent de décroître jusqu'au 30^{ème} jour (16 jours de détox), atteignant des niveaux comparables à ceux des témoins ($p = 0,45$). En revanche, dans le groupe 60 $\mu\text{g/L}$, l'activité de la catalase montre une phase de stagnation entre le 22^{ème} et le 30^{ème} jour (ΔCAT identique, $p > 0,05$), avant de diminuer au 35^{ème} jour pour atteindre des niveaux similaires à ceux des témoins ($p = 0,27$) et du groupe 30 $\mu\text{g/L}$ ($p = 0,99$).

IV.7.4/- Résultats du dosage de la protéase

Les résultats du dosage de la protéase sont représentés dans la figure (IV.8) ci-dessous.

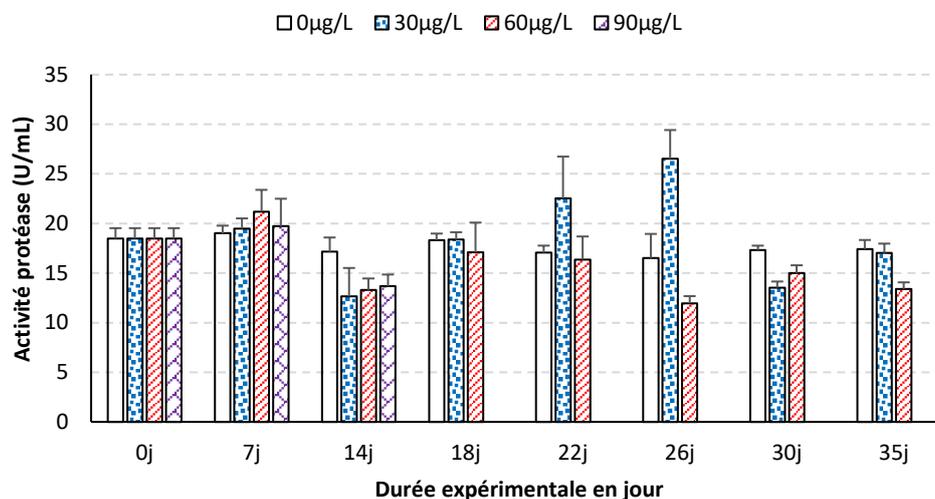


Figure IV.8 : Evolution de l'activité protéase durant la période d'étude.

D'après la figure obtenue, il est observé que les activités de l'enzyme digestive, la protéase, mesurées chez les témoins sont restées pratiquement stables tout au long du cycle expérimental ($p \sim 0,99$).

Ces résultats suggèrent que les conditions expérimentales maintenues n'ont probablement aucun effet perturbateur sur l'alimentation et la respiration des individus *Mytilus* de cette étude.

Au 7^{ème} jour d'exposition aux différentes concentrations de cuivre, l'activité protéase des moules *Mytilus*, s'est trouvée doses-durée indépendante ($p \sim 0,9$). Toutefois, et comparativement aux témoins, le temps d'exposition démontre son effet à la fin du cycle de contamination (14j), avec des diminutions (%diminution : -31,49 à 30 $\mu\text{g/L}$; -27,96 à 60 $\mu\text{g/L}$ et -25,81 à 90 $\mu\text{g/L}$) significative ($p < 0,05$) de l'activité digestive. Nonobstant, les effets sont doses indépendants ($p \sim 0,99$) encore une fois (Moyenne ($\Delta\text{Protéase}/\Delta\text{temps}$) = 0,0203 U/mL.j).

Une reprise rapide de l'activité protéase est observée juste après 4jours de décontamination des moules *Mytilus* antérieurement contaminées par les doses 30 et 60 $\mu\text{g/L}$, pour montrer des valeurs identiques quel que soit le groupe considéré ($p \sim 0,99$).

Comparativement aux témoins, le groupe de moules décontaminées de la concentration de 60 $\mu\text{g/L}$ continue à présenter des différences non significatives (et parfois identiques) jusqu'à la fin du cycle expérimental de 35 jours. À noter qu'une différence non significative (avec un seuil de risque de $p = 0,057$) est observée au 22^{ème} jour entre les témoins et le groupe décontaminé de 30 $\mu\text{g/L}$, tandis que ce dernier montre une augmentation significative ($p < 0,05$) de son activité digestive par rapport au groupe de 60 $\mu\text{g/L}$. Les différences dans l'activité protéase demeurent très significatives ($p < 0,001$) même après 12 jours de détoxification (26^{ème} jour) par rapport aux témoins et au groupe de 30 $\mu\text{g/L}$. Cependant, les augmentations observées dans l'activité de l'enzyme digestive rediminuent au 30^{ème} jour, montrant des différences non significatives ($p > 0,05$) entre les groupes de test, ce qui persiste jusqu'à la fin du cycle expérimental (35 jours).

❖ Discussion

Comme discuté dans la partie des tests de 96 heures, la biodisponibilité se réfère à la fraction de la substance chimique qui est accessible pour être absorbée par les organismes vivants. Les bivalves peuvent concentrer les éléments traces métalliques (ETM) à des niveaux plus élevés que ceux présents dans leur environnement par le biais de l'eau et/ou de la nourriture.

Une fois absorbé, seulement une fraction du produit chimique parvient effectivement à circuler et à se distribuer dans le corps d'un animal. Cette quantité est influencée par des processus tels que l'absorption, le transport, la biotransformation et l'excrétion à travers les branchies ou les reins. Ces mécanismes jouent un rôle crucial dans la capacité des espèces à faire face aux stress causés par l'exposition aux contaminants, y compris les éléments traces métalliques comme le cuivre [323].

En outre, d'autres facteurs influencent la toxicité des métaux et déterminent la tolérance des bivalves face à l'exposition aux contaminants. Bien que les tests d'écotoxicité fournissent des indications sur les effets toxiques des contaminants sur les organismes, une question persiste : est-il certain que ces effets ne sont pas réversibles en cas de cessation de l'exposition ? De plus, si l'exposition se prolonge, est-il évident que les dommages aux cibles biologiques empêchent l'organisme de rétablir son homéostasie ?

Dans cette étude, les réponses de la catalase ont montré une dépendance aux doses et à la durée d'exposition, avec un effet significatif de la concentration en cuivre. Nos résultats concordent parfaitement avec ceux rapportés par Xu *et al.*, [324] pour la moule *Mytilus coruscus*, exposée à des concentrations de Cuivre de 2µg/L et 8µg/L pendant 18 jours. Ainsi, Les variations observées dans l'activité catalasique pourraient être attribuées à l'excès de radicaux oxygénés (ROS) générés au niveau cellulaire. Le cuivre, en tant qu'élément essentiel pour tous les organismes aérobies en raison de son rôle de cofacteur des enzymes mitochondriales [325, 326], et notamment comme composant de l'hémocyanine (protéine transportant l'oxygène) chez les mollusques aquatiques, est connu pour son activité redox qui génère des ROS et devient un toxique potentiel [327, 328]. A des concentrations élevées, il peut même causer des dommages irréversibles à certaines espèces [91].

La sensibilité de l'enzyme CAT en tant que biomarqueur précoce face au stress oxydatif démontre encore sa pertinence incontournable. En effet, cette enzyme se révèle sensible même à des concentrations extrêmement faibles. Les résultats de Kaida Xu [324] ont montré une augmentation significative de l'activité de la CAT dans les hémocytes de la moule *Mytilus coruscus* exposées à 8 µg/L de cuivre.

En milieu naturel, les sources de pollution (diversement dans le milieu récepteur) peuvent varier considérablement en termes de débit, de nature et de charge des rejets, ainsi que par la diffusion continue qui détermine la dispersion spatio-temporelle des contaminants. Ainsi, la corrélation dose/effet observée dans la présente étude peut fournir des indications sur les risques potentiels en milieu naturel en cas d'exposition à une source de pollution importante, même accidentelle ou non permanente. Bien que la moule *Mytilus* soit réputée pour sa résistance aux xénobiotiques, sa tolérance peut être compromise par des expositions élevées aux contaminants. Cela rend les moules vulnérables aux maladies infectieuses. Le système immunitaire des organismes aquatiques est fortement affecté par les polluants chimiques, ce qui les rend plus fragile à d'autres altérations externes [329].

Dans le cas des tests de courte durée (96 heures), les réponses de la catalase (CAT) étaient incessantes et dépendaient de la concentration en métal. Aussi, aucune mortalité n'a été observée pour l'ensemble des concentrations testées. Toutefois, dans ce test chronique (14 jours d'exposition), nous avons constaté des réponses enzymatiques accélérées ($\Delta\text{CAT} > \Delta\text{temps}$) montrant une tendance à ralentir avant de décliner sous l'effet de la forte concentration de 90 µg/L. Les individus exposés à cette concentration étaient incapables de survivre, avec une mortalité dépassant 50% après 8 jours de détoxification. A titre de comparaison, Al-Subiai *et al.*, [330] ont observé une mortalité totale (100%) après 5 jours d'exposition des moules *Mytilus edulis* à une concentration de 100 µg/L de cuivre. De plus, Brooks *et al.*, [16] rapportent des taux de mortalité de 100% chez trois espèces de moules *Mytilus (galloprovincialis, edulis et trossulus)* exposées au cuivre (100 et 500 µg/L) pendant 21 jours.

Dans notre étude, la catalase, en tant que signal précoce de la dégradation de l'état de santé des organismes, démontre encore une sensibilité accrue au degré d'exposition au contaminant métallique Cu. Selon Di Giulio *et al.*, [331], la CAT peut nous renseigner sur le degré d'altération cellulaire.

La mortalité représente le stade final d'une atteinte irréversible de la physiologie cellulaire. Avant cela, les métaux peuvent se lier aux sites actifs des enzymes, qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des activités biochimiques, métaboliques et physiologiques, modifiant leurs configurations et inhibant leurs activités [332].

Dans une série d'expériences de 6 jours [333], il a été constaté que les taux de mortalité chez les moules *Mytilus galloprovincialis* augmentaient avec l'augmentation de la concentration en cuivre (0,12 ; 0,36 ; 0,60 et 1,21 mg/L) dans les aquariums. Cet effet a été attribué à la capacité d'absorption des moules, qui est positivement corrélée à l'augmentation de la concentration en Cu, atteignant des niveaux 5,06 fois plus élevés qu'avant l'exposition. Cependant, le temps d'exposition s'est révélé être un facteur important dans le processus d'absorption. Il a été observé que la concentration de Cu atteignait 266–463 µg/g à 0,36 mg/L (la forte concentration) pendant les 3 premiers jours, puis diminuait à 158–334 µg/g le dernier jour. Cela montre que la majeure partie du Cu a été absorbée par les tissus des moules au cours des 3 premiers jours, avant de diminuer.

Il est évident que le cuivre est plus facilement absorbé au début de l'exposition, avant que la moule ne ferme ses valves (réduisant ainsi l'activité de filtration) pour se protéger de l'exposition au cuivre et/ou en excréant du mucus pour freiner la pénétration du métal à l'intérieur de l'animal [264, 333]. Toutefois, l'absorption du Cu augmente certainement la génération de ROS au niveau cellulaire, et le Cu peut également interagir directement avec les constituants de la cellule (lipides, protéines, ADN, etc.) [334-336].

Si la catalase, une enzyme non consommatrice d'énergie, rentre en première ligne de défense contre les ROS [337], son activité peut être inhibée de manière inévitable en cas d'un déséquilibre de la balance redox en faveur d'un surplus importants d'oxydants [292]. Les enzymes antioxydantes peuvent être désactivées par les ROS ou subir des modifications de leur conformation, ce qui entraîne une inefficacité globale du système antioxydant et, dans les cas les plus graves, peut conduire à son effondrement suivi de la mort cellulaire.

Dans notre étude, l'activité de l'enzyme digestive (protéases) démontre une sensibilité à la durée d'exposition, indépendamment de la concentration testée en xénobiotique Cu. Les effets du stress chimique induit par le cuivre deviennent plus perceptibles avec l'augmentation de la durée d'exposition. Du point de vue cinétique de réponse, la protéase se révèle moins sensible que la catalase en termes de rapidité de réaction.

Les enzymes digestives sont généralement résistantes et montrent une capacité d'adaptation aux divers types de stress, qu'il s'agisse de stress alimentaire (disponibilité, quantité et qualité de la nourriture) ou environnemental (température, pH, etc.) [338]. Cependant, l'exposition des spécimens à des substances chimiques peut entraîner des altérations des enzymes digestives. La glande digestive des bivalves joue un rôle crucial dans la digestion en synthétisant et sécrétant des enzymes digestives [19, 234, 339]. Toutefois, cet organe est également une cible pour les contaminants chimiques qui y sont transportés pour être détoxifiés.

Plusieurs auteurs ont rapporté une diminution des activités digestives chez des espèces d'invertébrés exposées *in vitro* ou *in situ* à des polluants chimiques, notamment des métaux lourds [338, 340-345]. Cependant, la réponse des enzymes digestives aux facteurs de stress chimiques peut être assez complexe et dépend, entre autres, du temps d'exposition, de la concentration du toxique et de la voie d'exposition.

Les contaminants toxiques comme le cuivre (Cu) présents dans l'eau peuvent initialement réduire les apports énergétiques des moules en diminuant l'apport alimentaire et altérant les mécanismes d'alimentation (réduction de l'activité de filtration, augmentation de la fermeture des valves) [330, 346]. A une concentration de 18µg/L de Cu, une diminution significative du taux de clairance des moules *Mytilus edulis* a été observée par Xu *et al.*, [324]. La moule étant chémosensible aux contaminants dans le milieu plutôt qu'à leur accumulation dans les tissus.

Dans notre étude, l'activité des protéases au 7^{ème} jour d'exposition s'est révélée indépendante de la dose et de la durée. Cependant, à ce même jour, les activités de la catalase (CAT) étaient clairement induites en hausse avec la concentration de Cu. Les moules peuvent alors être obligées d'activer ou d'améliorer leurs mécanismes de défense et de réparation, augmentant ainsi leurs besoins métaboliques (syndrome général d'adaptation).

Avec l'augmentation des besoins énergétiques, les moules pourraient ajuster leurs processus digestifs (par exemple, augmenter les activités enzymatiques, prolonger le temps de passage dans l'appareil digestif) pour maximiser l'assimilation de l'énergie alimentaire.

Par ailleurs, il est rapporté que le Cu est principalement accumulé dans les branchies, contrairement au mercure (Hg) qui cible la glande digestive comme organe d'accumulation [349]. En conséquence, les effets du Cu sur l'activité digestive sont ralentis, bien que la génération de ROS provoque un stress oxydatif inévitable. La réponse antioxydante précoce de la CAT est induite pour prévenir les dommages nocifs causés par un excès de ROS au niveau cellulaire.

Par ailleurs, l'atteinte de l'enzyme digestive (protéase) est clairement perceptible au 14^{ème} jour d'exposition au Cu, avec des taux d'inhibition variant entre -25,81% et 31,49% selon la concentration testée. Si l'exposition persiste ou s'aggrave, les systèmes de détoxification des moules peuvent devenir incapables de gérer la pénétration des substances toxiques, qui peuvent alors exercer des effets délétères au niveau intracellulaire, entraînant des troubles nerveux, ainsi qu'une hypertrophie lysosomale dans les cellules digestives des moules [347-351].

Les substances toxiques peuvent également interférer avec l'activité enzymatique digestive intracellulaire, soit par une régulation à la baisse des propriétés hydrolytiques enzymatiques (interaction directe), soit par des processus d'expression (interaction indirecte). Sous stress chimique, les réponses enzymatiques digestives suivent généralement une courbe en cloche : l'induction précoce des activités enzymatiques est suivie d'une diminution de celles-ci. De plus, les contaminants métalliques ingérés avec les particules alimentaires peuvent interagir avec les enzymes extracellulaires, par exemple en se liant au site actif ou en modifiant la structure enzymatique, ce qui entraîne une induction suivie d'un déclin de leur activité [352].

Si les réponses digestives de la présente étude sont indépendantes de la dose ($p \sim 0,99$), la concentration de $90 \mu\text{g/L}$ a eu un effet clair sur la **biométrie** des moules avec une réduction significative ($p < 0,05$) de l'indice de condition (**IC**), qui reflète l'investissement énergétique envers le gain de poids en chair. Cet indice traduit également les perturbations métaboliques subies par l'organisme [353, 354].

En milieu naturel, l'IC varie en fonction de la saison, déterminant généralement le statut reproducteur des bivalves. Avant la période de ponte, la moule investit son énergie dans le développement des organes reproducteurs, puis, après la gamétogenèse, elle perd une part significative de sa masse viscérale et entre en période de repos pendant quelques mois avant de reprendre le cycle de reproduction. Néanmoins, l'exposition aux contaminants peut affecter la condition générale des organismes aquatiques, et ces effets sont perceptibles sur des durées d'exposition relativement courtes, comme dans notre étude. Nonobstant, bien qu'il ait été observé espèces-dépendant, l'IC n'a montré aucune diminution d'avantage en réponse à l'exposition au Cu (10, 100 et 500µg/L ; pendant 21jours) chez les trois espèces de moules *Mytilus ssp* [16].

✓ Décontamination

Dans notre étude, une mortalité (>50%) a été observée pendant le cycle de détoxification (8^{ème} jours) des moules *Mytilus galloprovincialis*. Cette mortalité peut être attribuée à un épuisement des réserves énergétiques durant le cycle de contamination, nécessaire pour surmonter les dommages causés par les ROS. Toute altération de l'activité enzymatique peut perturber certaines voies métaboliques, réduisant ainsi le développement et la survie des individus [355, 356]. Le cuivre, en particulier, est connu pour ses effets délétères. Il est également notable que l'effet létal peut se manifester même après l'arrêt de l'exposition.

Les activités CAT mesurées dans cette étude sous l'effet des concentrations de 30 et 60µg/L montrent une réponse de défense visant à contrer l'excès de ROS au niveau cellulaire. Les inductions observées à la fin du cycle de contamination (14jours) continuent d'augmenter pendant les 4 jours de décontamination des moules *Mytilus*. Ce résultat reflète une neutralisation continue des ROS, étant donné qu'aucune inhibition de l'activité CAT n'est observée, permettant ainsi de rétablir une homéostasie avec un équilibre redox. Une baisse considérable de l'activité CAT est relevée après 8 jours de décontamination (22j, fig IV.7) pour les deux groupes de tests (détox : 30 et 60µg/L), indiquant une réversibilité de l'état de santé des moules stressées par le Cu. Cependant, les stratégies de détoxification se manifestent différemment entre les deux groupes (fig IV.7).

Chez les individus *Mytilus* du groupe détoxifié de la concentration de 30µg/L, les baisses de l'activité CAT étaient incessantes, atteignant des valeurs comparables à celles des témoins, suggérant une durée suffisante pour un retour à l'homéostasie. En revanche, la stagnation de l'activité CAT pendant 8 jours (entre 22j et 30j ; fig. IV.7) chez le groupe de détox 60µg/L ne traduit pas une incapacité à la détoxification, puisqu'une baisse de l'état de stress est mesurée après 21 jours, montrant des valeurs identiques à celles des témoins et du groupe de détox 30µg/L. Cependant, il est difficile de conclure que la durée de 21 jours est suffisante pour que les moules de ce dernier groupe retrouvent leur état d'équilibre et reviennent à l'homéostasie.

Les cinétiques d'absorption et d'élimination des xénobiotiques chez les bivalves varient considérablement selon l'espèce considérée, influencées par divers facteurs intrinsèques tels que la taille, le sexe, les organes, les tissus et la physiologie, ainsi que des facteurs extrinsèques incluant les paramètres du milieu, la nature et la concentration des contaminants, et la durée d'exposition. Chez *Mytilus galloprovincialis* exposées au Cuivre et au Mercure (80µg/L pendant 11 jours) [16], l'étude a montré qu'il n'y avait aucune détoxification du Cuivre observée pendant 7 jours, alors que le Mercure était rapidement éliminé des tissus, avec une détoxification complète sur environ 4 à 7 jours. Des résultats similaires ont été rapportés pour *Perna perna* [357].

Les métaux essentiels sont généralement détoxifiés lentement, avec une absorption souvent plus rapide que l'élimination. Dans le cas de la glande digestive, l'accumulation de Cuivre chez les palourdes (*Venerupis philippinarum*) exposées à des concentrations de 2 et 10µg/L était dose-dépendante, étant significativement plus élevée ($p < 0,05$) à 10µg/L. Pendant la période de détoxification, les concentrations de cuivre accumulé ont commencé à diminuer après 10 jours et sont revenues aux niveaux initiaux chez les palourdes exposées à 2 µg/L [328]. En conclusion, des études ont souligné les dommages graves subis par les bivalves suite à l'exposition au Mercure, comparativement au Cuivre.

Dans la présente étude, la détoxification des ROS par l'enzyme antioxydante CAT peut être corrélée à la perte de Cu durant le cycle de décontamination. Cependant, la perte du métal ne signifie pas un retour immédiat à l'homéostasie.

La neutralisation du surplus de ROS et la réparation des dommages subis nécessitent une période plus longue. Cela est illustré par les taux de CAT observés chez les moules détoxifiées de la concentration de 60µg/L. La disponibilité du Cu est étroitement régulée au sein des cellules : elle est immédiatement transférée à la métallothionéine (MT) qui à son tour fournit des mécanismes efficaces et spécifiques pour son stockage et son transport intracellulaire [358-360].

Par ailleurs, l'augmentation significative de l'activité digestive pendant la période de récupération n'est pas facilement interprétable et est probablement liée à une augmentation du métabolisme associée à la réparation des dommages tissulaires.

❖ Synthèse

Dans une perspective de synthèse des résultats des mesures biochimiques des biomarqueurs catalase (CAT) et protéase, il est évident que l'augmentation des dépenses énergétiques allouées à la défense, reflétée par l'induction de l'enzyme antioxydante CAT, ainsi que la perturbation de l'enzyme digestive protéase, peuvent être à l'origine de l'atteinte de la biométrie et du métabolisme bioénergétique suite à une exposition prolongée au xénobiotique Cu²⁺. Ces deux biomarqueurs sont particulièrement pertinents comme signaux précoces de la dégradation de l'état de santé des organismes indicateurs. Ils peuvent fournir aux gestionnaires de l'environnement des informations essentielles pour prendre des mesures urgentes afin d'améliorer la qualité des écosystèmes, protéger la biodiversité et maintenir l'intégrité des milieux avant que les effets ne deviennent perceptibles à des niveaux supérieurs, conduisant finalement à une dégradation écologique totale de l'écosystème.

En conclusion, les systèmes de défense antioxydants, comme la catalase (CAT), sont des biomarqueurs capables d'établir un diagnostic individuel des effets des dommages dus au stress oxydant et constituent des signaux d'alarme précoces pour d'éventuels dommages au niveau de l'écosystème. Cependant, pour les utiliser comme éléments prédictifs des effets à l'échelle des populations et des communautés, il est nécessaire d'établir un lien entre les défenses antioxydantes et les indicateurs de l'état de santé des individus (croissance, réserves énergétiques, fonctions métaboliques). L'intégration des biomarqueurs CAT et protéase est donc cruciale pour déterminer leur capacité à prédire d'éventuels effets au niveau populationnel.

IV.9/- Modélisation des réponses biologiques (explicative, prédictive)

Dans le but d'étudier les variations de la réponse biologique, chez les moules *Mytilus* de la présente étude, face à des facteurs influents (concentration et durée d'exposition) nous avons utilisé des modèles mathématiques basés sur la régression multilinéaire (MLR : *Multilinear regression*). La régression linéaire est incontestablement la méthode de modélisation statistique la plus employée. Elle se divise habituellement en régression simple (une seule variable explicative) et régression multiple (plusieurs variables explicatives) bien que le cadre conceptuel et les méthodes de calcul soient identiques. La régression multilinéaire reste la méthode la plus simple et la plus employée pour élaborer des modèles prédictifs [361, 362].

Dans la terminologie des statistiques, la propriété étudiée (ex : réponse CAT) est appelée variable cible ou variable dépendante ou encore variable Y endogène. C'est la caractéristique que l'on cherche à expliquer. Les descripteurs, en l'occurrence exogènes (concentration, temps d'exposition etc.), sont appelés variables explicatives, variables indépendantes ou encore variables X.

L'objectif de cette partie de l'étude est de parvenir à identifier et qualifier les combinaisons de facteurs (concentration C et durée d'exposition T) qui influencent les variables endogènes mesurées chez les moules *Mytilus* à savoir : la catalase (CAT), la protéase (Pase) et les protéines (Prot). L'utilisation de méthodes statistiques multivariées nous permettra de progresser dans la compréhension de cette relation.

La méthode MLR permet d'établir une relation d'approximation entre les variables endogènes et les variables exogènes. En effet, la réponse biologique est influencée par la variation des paramètres externes que l'on appelle stimuli. Ces facteurs peuvent être représentés par des variables notées X_i avec i varie de 1 à n et qui permettent de représenter les variations par des modèles mathématiques. Ces derniers résument la relation d'approximation entre la réponse dépendante (Y) et la variable d'entrée indépendante (X_i : facteur d'effet) [363].

L'expression qui relie une réponse (Y) à un ensemble de facteurs (X_i) est de la forme :

$$Y = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_p) + \varepsilon \quad (1)$$

Où f est la fonction-réponse qui dépend des variables X_i indépendantes ; ε est un terme qui représente d'autres sources de variabilité (résiduelle). La forme générale de l'équation est la suivante :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_p X_p + \varepsilon \quad (2)$$

Où β_i sont les coefficients de la régression.

La détermination de l'équation (2) se fait alors à partir d'une base de données de n observations pour laquelle a la fois les variables dépendantes et la variable indépendante sont connues. Il s'agit donc de considérer un système de p équations.

$$Y_1 = \beta_0 + \beta_1 X_{1,1} + \beta_2 X_{2,1} + \dots + \beta_p X_{n,1} + \varepsilon_1$$

$$Y_2 = \beta_0 + \beta_1 X_{1,2} + \beta_2 X_{2,2} + \dots + \beta_p X_{n,2} + \varepsilon_2$$

.....

$$Y_n = \beta_0 + \beta_1 X_{1,p} + \beta_2 X_{2,p} + \dots + \beta_p X_{n,p} + \varepsilon_n \quad (3)$$

Où les résidus ε_i représentent l'erreur du modèle, constituée par l'incertitude sur la variable dépendante Y_i d'une part, sur les variables indépendantes X_i d'autre part, mais aussi par les informations contenues dans les variables indépendantes mais non exprimées via les variables dépendantes. En adoptant une écriture matricielle, le modèle s'écrit alors sous la forme :

$$Y = \beta X + \varepsilon \quad (4)$$

La méthode consiste alors à choisir les coefficients du vecteur β en faisant en sorte de minimiser la somme des carrés des écarts entre les valeurs prédites (\hat{Y}) et les valeurs réelles (Y) sur l'intégralité de la base de données et ceci sous couvert de certaines hypothèses de départ. En premier lieu, les variables indépendantes X_i comme leur nom l'indique, sont supposées indépendantes entre elles et leur incertitude est négligeable. Ensuite, les différents échantillons Y_i sont supposés indépendants entre eux. Enfin, par nature, la dépendance de Y vis-à-vis des X_i est supposée linéaire.

IV.9.1/- Modélisation de la réponse CAT

La modélisation statistique nous a permis d'établir une relation d'approximation entre les variables exogènes (concentrations en cuivre et durée d'exposition) et les réponses biologiques de la moule *Mytilus* à savoir : catalase (CAT), protéase (P_{ase}) et Protéines (Prot). Divers logiciels sont disponibles, permettant à l'utilisateur de passer d'un modèle à l'autre selon les études de cas, ainsi que de faire varier les données à corrélérer (variable dépendante) et les descripteurs utilisés dans la corrélation (variables indépendantes). Plusieurs méthodes existent sous le nom de sélection : **forward**, **backward**, **stepwise** ou **sequential replacement**.

Nous avons utilisé les logiciels Statistica et XLSTAT pour modéliser les réponses de la catalase (CAT), de la protéase (P_{ase}) et des protéines (Prot). Les modèles générés par ces deux logiciels ont été comparés afin de prévenir toute erreur potentielle.

Dans un premier temps, nous allons présenter les modèles incluant le terme d'interaction pour l'approximation de la réponse CAT. Notre principal objectif est d'expliquer clairement les divers paramètres à prendre en compte lors de la modélisation, en clarifiant autant que possible la signification de chaque paramètre. Cependant, nous n'aborderons pas en détail les méthodes statistiques sous-jacentes à l'estimation de chaque test ou paramètre. Quatre méthodes sont proposées pour sélectionner un modèle :

❖ Sélection de modèle : *Meilleur modèle*

Le tableau (IV.9), ci-dessous (sous XLSTAT), regroupe les différents paramètres de synthèse pour sélectionner : meilleur modèle descripteur de la réponse catalase CAT.

Tableau IV.9 : Synthèse de la sélection des variables CAT

Variabes	MCE	R ²	R ² ajusté	Cp de Mallows	AIC de Akaike	SBC de Schwarz	PC d'Amemiya
C*t	1313,244	0,973	0,970	2,565	87,975	88,945	0,031
t / C*t	1164,108	0,979	0,974	2,428	87,264	88,719	0,029
C / t / C*t	1243,053	0,980	0,972	4,000	88,638	90,578	0,033

Moyenne des carrés des erreurs MCE= 1164,108 ; Statistique de Durbin-Watson DW= 1,717

L'analyse de la variance permet de calculer une statistique très utile : le R^2 ou R carré. Cette statistique est le rapport de la somme des carrés des réponses calculées (corrigées de la moyenne) à la somme des carrés des réponses mesurées (corrigées de la moyenne) [364].

$$R^2 = \frac{SCM}{SCT} = 1 - \frac{SCR}{SCT}$$

Où : SCM est la somme des carrés du modèle ; SCR est la somme des carrés résiduels (Erreurs) et SCT est la somme des carrés totaux, ceux de l'endogène.

A première vue, le coefficient de détermination R^2 semble clair et évident. Il exprime la part de la variance expliquée par le modèle. Il s'agit généralement du premier indicateur examiné lors d'une régression, avec pour objectif de déterminer la combinaison de variables permettant de maximiser ce coefficient R^2 [363, 365].

Le R^2 est donc une mesure de la qualité du modèle [365]. S'il est égal à 1, le modèle permet de retrouver la valeur des réponses mesurées. S'il est égal à 0, le modèle n'en dit pas plus que la moyenne des réponses. Dans la pratique, il est difficile d'indiquer la valeur d'un bon R^2 car les valeurs varient beaucoup d'une discipline à l'autre [364].

En examinant le coefficient de détermination du modèle CAT de la présente étude ($R^2=0.979$), la qualité du modèle est plus que satisfaisante. Alors, 97,9% de la variabilité de la réponse CAT est expliquée par le modèle, tandis que les 2,1% restants sont probablement dus à des effets résiduels. L'inconvénient du R^2 est qu'il ne prend pas en compte le nombre de variables utilisées pour ajuster le modèle. A cet égard, Le R^2 ajusté est une correction du R^2 qui permet de prendre en compte le nombre de variables utilisées dans le modèle (ddl : degré de liberté) [364, 366].

$$R^2_{ajusté} = 1 - \frac{CMR}{CMT} = 1 - \frac{SCR/(n - p - 1)}{SCT/(n - 1)}$$

Où : CMR sont les carrés moyens résiduels, CMT les carrés moyens totaux, p est le nombre de variables dans le modèle évalué pour n observation. De toute évidence, un R^2 ajusté de 0,974 (tab IV.13) est largement suffisant pour évaluer la qualité du modèle, tant en termes d'ajustement que de prédiction. Il est important de noter que le $R^2_{ajusté}$ diminue à mesure que le nombre de termes dans le modèle augmente, si ces termes supplémentaires n'apportent pas de valeur au modèle [365] (voir ci-après).

Une fois le modèle identifié, le coefficient de détermination, noté R^2 , permet de mesurer la qualité de l'ajustement aux données. Ce coefficient varie entre 0 et 1, atteignant 1 lorsque l'erreur est nulle pour les points de l'échantillon. Cependant, pour éviter le phénomène de surapprentissage, il n'est généralement pas souhaitable de viser un coefficient R^2 trop proche de 1, car l'ajout de termes dans le modèle améliore toujours R^2 . L'objectif est de construire un modèle prédictif capable de fournir de bonnes prédictions sur des données non utilisées pour l'identifier, ce qui reflète sa capacité de généralisation. Pour cela, l'estimation de l'erreur des prédictions du modèle doit prendre en compte non seulement la précision de l'ajustement, mais aussi la stabilité du modèle, qui caractérise ses variations en fonction de l'échantillon d'apprentissage [367, 368].

Pour garantir cette capacité de généralisation, plusieurs critères peuvent être utilisés, tels que le **Cp** de Mallows, le critère d'information d'Akaike (**AIC**) et le critère d'information bayésien (**BIC**). Ces critères, appelés critères de pénalisation, consistent à pénaliser l'erreur empirique du modèle en fonction du nombre de termes présents. Cela permet de compenser l'amélioration monotone du modèle à mesure que le nombre de termes augmente [368-370].

Les estimations par pénalisation consistent à ajuster la somme des carrés résiduels (SCR) en y appliquant une fonction du nombre de termes dans le modèle. Le Cp de Mallows, par exemple, est une estimation de l'erreur quadratique moyenne, qui intègre à la fois le carré du biais et la variance des prédictions.

Un faible Cp indique un meilleur modèle, car il correspond à la somme des carrés résiduels (SCR) la plus faible, avec une pénalisation minimale liée au nombre de paramètres du modèle. Ce critère aide à optimiser l'erreur d'apprentissage du modèle. Il mesure la différence entre l'erreur de généralisation (attendue sur de nouvelles données) et l'erreur d'apprentissage (celle calculée sur les données d'entraînement). Le Cp de Mallows permet d'estimer cette erreur sans utiliser les données elles-mêmes, mais en se basant sur la complexité du modèle et le nombre de données disponibles [371].

Dans notre cas de modélisation de la réponse CAT, le C_p de Mallows le plus faible est de 2,428 (Tab IV.13), ce qui est inférieur à 3 (p variable +1). Cela confirme donc la bonne sélection du modèle. Il est important de rappeler que si $C_p \leq p$, le modèle n'est pas biaisé et toutes les variables importantes ont été incluses, sans en omettre aucune. Selon les recommandations de Mallows, il faut choisir le premier modèle où C_p est inférieur ou égal au nombre de variables dans le modèle et pour lequel la variable d'intérêt est incluse.

Si la qualité globale de la régression est mesurée par le coefficient de détermination (R^2), le C_p de Mallows sert à choisir le meilleur sous-ensemble de variables ayant un rôle significatif dans le modèle probabiliste de la réponse étudiée. Lorsque deux prédicteurs sont fortement corrélés (multicolinéarité : voir ci-après), le C_p de Mallows peut ne pas apparaître dans les résultats. Dans notre étude, le C_p affiché confirme l'absence de colinéarité des variables indépendantes, ce qui est un critère essentiel à respecter dans l'analyse statistique par régression linéaire multiple (MLR).

Par ailleurs, les deux critères, à savoir le critère d'Akaike (AIC) et le critère bayésien de Schwarz (SBC : Schwarz's Bayesian Criterion) (étroitement lié), permettent également de choisir le modèle le mieux ajusté en tenant compte de l'erreur d'estimation et de la parcimonie (nombre de paramètres à ajuster). La distribution avec les valeurs les plus faibles pour ces deux critères est celle qui est sélectionnée [372, 373].

Il convient de souligner que le R^2 remplit efficacement son rôle d'indicateur de la qualité du modèle à condition que les résidus ne soient pas nuls. Les résidus ($\varepsilon_i = Y_i - \hat{Y}_i$) sont les différences entre les valeurs Y réellement observées et celles prédites par l'équation de la régression \hat{Y} . Si les résidus sont nuls, le R^2 est égal à 1 quelle que soit la qualité du modèle. Un tel cas est observé lorsqu'il n'y a pas de degrés de liberté. Par conséquent, le R^2 est un bon indicateur de la qualité du modèle s'il y a plus de points expérimentaux différents que de coefficients dans le modèle proposé, une condition qui est respectée dans notre étude.

Par ailleurs, l'inférence statistique concernant la régression (estimation par intervalle des coefficients, tests d'hypothèses, etc.) repose principalement sur les hypothèses associées au terme d'erreur, « qui résume les informations absentes du modèle ».

Il est donc crucial de vérifier ces hypothèses pour une interprétation correcte des résultats.

Rappelons brièvement les hypothèses liées au terme d'erreur (résidus) :

- Sa distribution doit être symétrique, plus précisément elle suit une loi normale ;
- Sa variance est constante ;
- *Les erreurs sont surtout indépendantes.*

Dans un modèle incluant une constante, la moyenne des résidus est automatiquement égale à zéro (critère que nous avons vérifié avec nos résultats). Or, ce résultat ne préjuge en rien de la pertinence de la régression. En revanche, si la moyenne des résidus est différente de zéro, cela indique à coup sûr des calculs erronés.

Par ailleurs, La statistique du test de Durbin-Watson (DW) évalue l'hypothèse nulle selon laquelle les résidus d'une régression ordinaire des moindres carrés ne sont pas autocorrélés. Si *les erreurs ne sont pas indépendantes*, la régression peut sous-estimer l'erreur type des coefficients. Subséquemment, les prédicteurs (variables explicatives) peuvent paraître significatifs alors qu'ils ne le sont peut-être pas.

Pour conclure le test de Durbin-Watson, il suffit de comparer la valeur affichée pour la statistique DW (dans notre cas, $DW = 1,717$, voir le Tab IV.13) avec les bornes inférieure (D_{inf}) et supérieure (D_{sup}) appropriées figurant dans la table de Savin et White (voir annexes). Alternativement, il est aussi possible de se baser directement sur la valeur de DW pour interpréter les résultats :

- La statistique de Durbin-Watson varie de 0 à 4. Une valeur proche de 2 indique une non-autocorrélation ; une valeur proche de 0 indique une autocorrélation positive ; une valeur proche de 4 indique une autocorrélation négative.

Il n'existe pas de seuil de signification formellement associé au DW. Toutefois, une valeur de cette statistique comprise entre 1 et 3 est acceptable. Avec une valeur relevée de $DW=1,717$, nous pouvons présumer que nous respectons cette prémisse.

- Si $DW (1,717) > D_{sup} (1,579)$, il n'y a pas de corrélation ; si $DW < D_{inf} (0,812)$, il y a une corrélation positive ; si DW est compris entre les deux bornes, le test n'est pas concluant. Le seuil de signification pour le test est de $\alpha=0,05$, alors que la table comprend les modèles avec la constante.

Il est donc concluant que les résidus sont indépendants et que leur distribution suit une loi normale.

Rappelons que les résidus correspondent les écarts entre les valeurs Y réellement observées et celles prédites par le modèle. Pour un point donné, la valeur du résidu, qu'elle soit faible ou élevée, ne détermine pas la qualité du modèle. Cependant, si tous les résidus sont faibles (ou élevés), cela indique respectivement un modèle de bonne (ou mauvaise) qualité.

Par ailleurs, il est possible de vérifier que les résidus sont aléatoires et ne présentent pas d'erreurs systématiques en observant simplement le graphique des résidus. Il suffit d'observer comment les résidus sont répartis selon différents critères. Si cette répartition semble aléatoire, il est probable que toutes les informations pertinentes des données ont été extraites.

Les graphiques résiduel, le graphique de normalité, ainsi que le graphique de la distribution des résidus standardisés ($y - \hat{y}$) ont été représentés dans la figure (V.9 ; de A à C). Ces graphiques des résidus du modèle de régression servent à confirmer la validité des hypothèses.

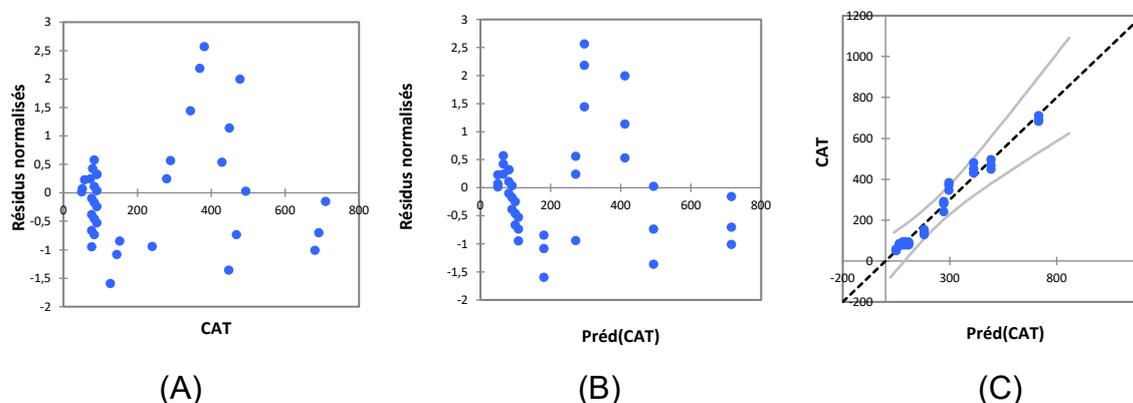


Figure IV.9 : représentation des graphiques résiduels pour la réponse CAT.

Dans notre étude, les graphiques n'ont révélé aucun problème avec les résidus du modèle comportant les variables sélectionnées, car ces résidus sont dispersés de manière presque uniforme autour de la ligne zéro.

Il est également important de noter que les faibles résidus de la régression CAT et le coefficient élevé de R^2 ajusté obtenu suggèrent une bonne capacité prédictive des modèles développés par MLR.

Bien que les techniques numériques avancées soient puissantes, il est préférable de privilégier les techniques graphiques simples, du moins initialement : elles sont universelles dans leur application et offrent un diagnostic détaillé des situations qui peuvent être complexes. Rien n'empêche ensuite de compléter ce diagnostic visuel à l'aide de tests statistiques.

L'analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée avec un intervalle de confiance de 95% ($\alpha=5\%$), comme indiqué dans le tableau (IV.10). Ce tableau fournit une statistique très utile permettant d'évaluer la capacité descriptive du modèle proposé pour représenter les résultats expérimentaux.

Tableau IV10 : Analyse de la variance (pour CAT)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	478783,336	239391,668	205,644	< 0,0001
Erreur	9	10476,973	1164,108		
Total corrigé	11	489260,308			

L'analyse de la variance (ANOVA) nous permet de déterminer à partir de quel seuil un effet peut être considéré comme significatif. D'une façon générale, en matière de régression, le principe de l'analyse de la variance est de subdiviser la variation totale en une composante factorielle relative à l'équation de régression (ou au modèle utilisé), et en une composante résiduelle (Erreur), la première devant être testée par rapport à la deuxième [364, 374].

Le test de Fisher mesure le rapport entre la variance expliquée de la variable dépendante par le modèle de régression et la variance non expliquée. En d'autres termes, il permet de tester l'hypothèse nulle (H_0) selon laquelle chaque coefficient β est significativement différent de zéro, indiquant ainsi une relation claire entre la variable expliquée (CAT) et les variables explicatives (C et T).

Le F de Fisher ($F=205,644$, Tab IV.10) est le rapport entre le carré moyen du modèle (239391,668) et celui des résidus (1164,108). Ce rapport permet de calculer la probabilité que ces deux carrés ne soient pas égaux.

En d'autres termes, un F de Fisher élevé indique une faible probabilité que le modèle soit équivalent à la moyenne, ce qui suggère que les variations des réponses

mesurées sont principalement dues aux variations des facteurs. En revanche, un F de Fisher proche de 1 indique une forte probabilité que le modèle soit similaire à la moyenne, ce qui signifie que les variations des réponses mesurées sont comparables à celles des résidus [364]. Autrement dit, la valeur du F indique que la part de la variance expliquée de la CAT par le modèle est 205,644 fois plus grande que celle qui reste inexpliquée.

Intuitivement, nous rejeterons l'hypothèse nulle (H_0) étant donné que la somme des carrés expliquée par la régression CAT est significativement élevée (478783,336). Afin de ne pas s'appuyer uniquement sur le F, le programme fournit également la ***p-value*** associée au **F** observé. La *p-value* représente le niveau de significativité du test de Fisher-Snedecor, c'est-à-dire la probabilité de dépasser le F observé si l'hypothèse nulle est vraie. On compare cette p-value au seuil de risque $\alpha=0,05$. Si la p-value $\leq \alpha$, alors on rejette l'hypothèse nulle ($\beta_1 = \dots = \beta_p = 0$).

Comme indiqué dans le tableau (IV.10), la p-value associée au test de Fisher (F) est de 0,0001. Cela signifie que le risque de la non signification du modèle est de 0,01%, ce qui est négligeable. En conclusion, l'analyse de la variance a confirmé la qualité du modèle retenu.

Tableau IV.11 : Analyse Type (I, III) Sum of Squares et Paramètres du modèle (CAT)

Analyse Type I Sum of Squares					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
C	0	0,000			
T	1	165769,941	165769,941	142,401	< 0,0001
C*T	1	313013,395	313013,395	268,887	< 0,0001

Analyse Type III Sum of Squares (CAT)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
C	0	0,000			
T	1	2655,468	2655,468	2,281	0,165
C*T	1	313013,395	313013,395	268,887	< 0,0001

Paramètres du modèle (CAT)

Source	Valeur	Erreur standard	t	Pr > t	Borne inférieure (95%)	Borne supérieure (95%)
Constante	94,482	15,573	6,067	0,000	59,253	129,711
C	0,000	0,000				
T	-3,413	2,260	-1,510	0,165	-8,526	1,699
C*T	0,533	0,032	16,398	< 0,0001	0,459	0,606

Les modèles visent à établir des relations liant la réponse tant avec les facteurs, qu'avec les facteurs entres eux (interactions). L'ANOVA présente l'avantage de pouvoir facilement prendre en compte les interactions entre les facteurs, ce qui permet d'évaluer leur contribution respective à la variabilité totale.

Les facteurs susceptibles d'influencer la réponse choisie doivent être identifiés. En comprenant leurs effets, il devient possible d'établir la relation entre la réponse Y et les valeurs des facteurs X [374]. Les effets individuels et combinés des différents paramètres sont discutés en se basant sur la valeur absolue et le signe de chaque coefficient. Ces coefficients déterminent l'intensité de l'effet correspondant et leur impact sur la réponse (CAT).

Cependant, il est crucial d'évaluer l'incertitude associée à ces coefficients afin de comparer leur pertinence et de décider ceux qui doivent être conservés dans le modèle mathématique final et ceux qui peuvent être éliminés.

Il existe deux sources d'erreurs dans la détermination des coefficients d'un modèle. La première est l'erreur expérimentale associée à chaque réponse mesurée. La seconde est liée au modèle mathématique lui-même, qui peut ne pas représenter parfaitement le phénomène étudié, ce qu'on appelle le manque d'ajustement. L'incertitude résulte de ces deux types d'erreurs [364]. Il est important de noter que la racine carrée de la moyenne des carrés des résidus (RMCE) est utilisée pour calculer l'incertitude nécessaire à l'évaluation des coefficients.

Ainsi, l'analyse de variance (test de Fisher et test de Student ; t-test) permet d'identifier le facteur du modèle dont l'influence est la moins significative, c'est-à-dire celui pour lequel la p-value est la plus élevée. Cela permet ensuite d'envisager l'élimination de ce terme du modèle [375].

Le tableau des analyses **Type I SS** permet de visualiser l'influence de l'ajout progressif des variables explicatives sur l'ajustement du modèle, au sens de la somme des carrés des erreurs (SCE), de la moyenne des carrés des erreurs (MCE), du F de Fisher, ou de la probabilité associée au F de Fisher. Plus la probabilité est faible, plus la contribution de la variable au modèle est importante, toutes les autres variables étant déjà dans le modèle. Alors, le tableau des Analyse Type III SS, permet de visualiser l'influence du retrait d'une variable explicative sur l'ajustement du modèle.

Le tableau des paramètres du modèle (CAT) présente, entre autres, la valeur de chaque coefficient du modèle mathématique ainsi que l'erreur standard estimée pour chaque coefficient. L'erreur standard reflète la variabilité du coefficient et permet de calculer la valeur du test **t** de Student. Contrairement au tableau récapitulatif du modèle qui confirme la significativité globale du modèle, la signification de **t** répond à la question essentielle : « Est-ce que le coefficient β du prédicteur est différent de 0 ? », indiquant ainsi si chaque variable contribue de manière significative au modèle. Une valeur élevée de **t** et une petite valeur de **p** indiquent une contribution plus importante du prédicteur au modèle.

Considérant les tableaux des statistiques, le modèle retenu est de la forme :

$$CAT_{(F=205,644; p<0,002)} = 94,482 - 3,413 T_{(p=0,165)} + 0,533 C * T_{(p<0,0001)}$$

Il est évident que la réponse CAT est significativement influencée par l'interaction entre la concentration et la durée d'exposition (C*T), démontrant un effet synergique. Cette combinaison spécifique de paramètres (C et T) exerce un impact notable sur la réponse biologique de l'enzyme antioxydante CAT, ce qui corrobore les conclusions précédemment discutées dans la partie de la discussion.

Bien que l'effet linéaire du facteur temps soit inclus dans le modèle, son impact reste négligeable selon le test de Student ($Pr > |t| = 0,165 > \alpha=0,05$). De plus, ses coefficients normalisés [$T_{nor} : (-0,096)$ et $C*T_{nor} : (1,049)$] indiquent une contribution marginale. Les coefficients normalisés mesurent l'importance relative des variables : plus leur valeur absolue est élevée, plus l'effet de la variable correspondante est significatif. La constante du modèle (94,482) représente la moyenne de la variable dépendante (CAT) et se situe bien dans l'intervalle de confiance de 95% (bornes inférieure et supérieure), avec une probabilité très significative pour être retenue dans le modèle explicatif.

Pour les bornes de confiance, il est crucial que la valeur zéro ne soit pas incluse entre les deux intervalles, comme observé pour la variable temps. Cela indiquerait que la différence de 0 est une possibilité plausible, rendant ainsi la valeur de t non significative. En d'autres termes, cela signifie que l'effet en question n'est pas statistiquement différent de 0, et donc que la variable associée n'a pas d'influence sur la réponse mesurée.

Remarque : Il convient de noter que dans les modèles sans interaction entre les deux facteurs, à savoir la concentration (C : $p=0,004$) et le temps (T : $p=0,007$), les effets linéaires principaux de chaque facteur sont très significatifs.

Aussi, l'analyse de variance montre une statistique de Fisher satisfaisante ($F=13,426$; $p=0,002$) pour le modèle d'approximation. Toutefois, l'ajustement du modèle est moins performant que celui incluant l'interaction, avec un R^2 de 0,749 et un R^2 ajusté de 0,693.

La prédiction du modèle est assez médiocre avec un Q^2 prédictif de 0,425. Par ailleurs, les coefficients normalisés ($0,263 < C : 0,64 < 1,018$ & $0,204 < T : 0,582 < 0,960$) ont un poids presque identique, avec des valeurs comprises dans l'intervalle de confiance à 95 %.

Comme pour toute analyse statistique, il est essentiel d'examiner les valeurs extrêmes des variables, identifiables via des procédures descriptives. Ces valeurs extrêmes influencent fortement le modèle et peuvent faire varier les coefficients bêta de l'équation, rendant celle-ci moins précise. Il est donc crucial de vérifier la présence de telles valeurs.

L'examen des tableaux statistiques des résidus (voir annexes) permet de détecter facilement la présence de valeurs extrêmes. La stratégie consiste à identifier les observations avec des valeurs résiduelles importantes, car une valeur extrême aura un score prédit très différent de la valeur observée. En conséquence, plus les valeurs résiduelles de l'ensemble des observations sont faibles, mieux le modèle de régression est ajusté aux données. Pour faciliter la comparaison, il est préférable de scruter les résidus standardisés. Une limite stricte exige qu'aucun résidu standardisé ne dépasse les valeurs de $> 3,29$ ou $< -3,29$. Dans un échantillon normal, de tels écarts sont très rares. L'observation des résidus standardisés du modèle postulé pour la réponse CAT a révélé des valeurs qui oscillent entre -1,202 et +2,068, confirmant que l'approximation du modèle représente bien les données expérimentales.

Un autre indicateur très utile de la qualité du modèle est la distance de Cook, qui mesure l'influence de chaque observation sur l'ensemble du modèle. Si la distance pour une observation dépasse 1, elle influence probablement l'estimation des coefficients bêta du modèle. Pour évaluer son influence exacte, il faut refaire la régression sans cette observation et comparer les coefficients beta obtenus. Dans notre pratique de modélisation, nous n'avons relevé aucune valeur supérieure à 0,488.

❖ **Sélection de modèle : *Stepwise, Ascendant et Descendant***

Comme suscité, plusieurs méthodes sont disponibles pour la sélection d'un modèle mathématique de régression. A partir du même groupe de variables il est possible de construire divers modèles de régression qui permet de spécifier la manière dont les variables indépendantes sont entrées dans l'analyse.

Dans la méthode Stepwise (pas-à-pas) ou Progressive, la sélection commence par l'ajout de la variable ayant la plus forte contribution au modèle, basée sur la statistique t de Student. Si la probabilité associée à la statistique t de la variable suivante est inférieure à la « Probabilité pour l'entrée », elle est ajoutée au modèle, et ainsi de suite. Après l'ajout de la troisième variable, on évalue l'impact de retirer chaque variable présente dans le modèle. Si la probabilité associée à la statistique t d'une variable est supérieure à la « Probabilité pour le retrait », cette variable est retirée. Ce processus continue jusqu'à ce qu'aucune variable ne puisse être ajoutée ou retirée.

Dans la sélection Ascendante, les variables sont uniquement ajoutées, jamais retirées. En revanche, la procédure de l'élimination Descendante commence par inclure toutes les variables, qui sont ensuite retirées selon la même procédure que la sélection progressive.

Ainsi, les résultats regroupés dans le tableau (IV.16), ci-dessous, montrent pratiquement un même modèle d'approximation de la réponse enzymatique catalase (CAT), alors l'effet synergique (C*T) demeure le facteur le plus influent (voir partie choix des coefficient).

Tableau IV.12 : Résumé des méthodes statistiques *Stepwise*, *Ascendante* et *Descendante*.

Méthodes	Stepwise				Ascendant				Descendant			
Modèle	CAT = 80,590+0,501*C*T				CAT = 80,590+0,501*C*T				CAT = 79,067+0,506*C*T			
MCE	1313,244				1313,244				994,442			
R2	0,973				0,973				0,980			
R2 ajusté	0,970				0,970				0,978			
Cp	2,565				2,565				0,000			
AIC	87,975				87,975				84,638			
SBC	88,945				88,945				85,608			
PC	0,038				0,038				0,028			
DW	1,788				1,788				1,733			
ANOVA	SC	MC	F	Pr > F	SC	MC	F	P	SC	MC	F	Pr > F
Modèle	476127,868	476127,868	362,559	< 0,0001	476127,868	476127,868	362,559	< 0,0001	479315,886	479315,886	481,995	< 0,0001
Erreur	13132,441	1313,244			13132,441	1313,244			9944,422	994,442		
Totale	489260,308				489260,308				489260,308			
Type I SS	SC	MC	F	Pr > F	SC	MC	F	Pr > F	SC	MC	F	Pr > F
C	0				0				0			
T	0				0				0			
C*T	476127,868	476127,868	362,559	< 0,0001	476127,868	476127,868	362,559	< 0,0001	476127,868	476127,868	478,789	< 0,0001
Type III SS	SC	MC	F	Pr > F	SC	MC	F	Pr > F	SC	MC	F	Pr > F
C	0								0			
T	0								0			
C*T	476127,868	476127,868	362,559	< 0,0001	476127,868	476127,868	362,559	< 0,0001	112874,688	112874,688	113,506	< 0,0001
Paramètres	Valeur	Err-stand	t	Pr > t 	Valeur	Err-stand	t	Pr > t 	Valeur	Err-stand	t	Pr > t
Constante	80,590	13,347	6,038	0,000	80,590	13,347	6,038	0,000	79,067	17,511	4,515	0,001
C	0	0			0	0			0	0		
T	0	0			0	0			0	0		
C*T	0,501	0,026	19,041	< 0,0001	0,501	0,026	19,041	< 0,0001	0,506	0,047	10,654	< 0,0001

Globalement, la qualité des modèles est très satisfaisante, avec des R^2 variant de 0,973 à 0,98 et des $R^2_{\text{ajustés}}$ de 0,97 à 0,978. Les valeurs de la statistique de Durbin-Watson, proches de 2 (1,788 ; 1,733), excluent l'hypothèse que les résidus du modèle soient dépendants, avec des moyennes résiduelles égales à zéro pour chaque modèle. De plus, l'analyse de la variance révèle des statistiques très significatives, avec des valeurs de F de Fisher allant de 362,559 à 481,995 et des probabilités associées extrêmement significatives ($p < 0,0001$). Cela indique que le risque de conclure à tort que la variable explicative apporte une quantité d'information significative au modèle est de seulement 0,01% ($< 5\%$). En d'autres termes, la part de la variance de la variable dépendante CAT expliquée par le modèle est au moins 362 fois plus importante que la part de la variance de la variable CAT restant inexpliquée.

Contrairement au meilleur modèle, le terme temps (T) ne figure pas dans les équations mathématiques (voir tableau IV.16). Le poids de l'interaction C*T demeure unique, représentant la seule variable explicative. En effet, la p-value est de 0,0001, indiquant qu'il y a une chance sur 1000 pour que la vraie valeur du coefficient de l'interaction C*T soit nulle. Le choix des variables indépendantes doit être guidé par le principe de parcimonie, qui préconise qu'un bon modèle comporte un nombre optimal de variables, et par la présence d'un lien théorique connu ou présumé avec la variable dépendante. Toutes les étapes suivies et expliquées précédemment (dans le cas du meilleur modèle) ont été vérifiées pour évaluer la qualité de chaque méthode de régression. Cependant, les tableaux correspondants ne sont pas présentés cette fois-ci afin de ne pas alourdir la section interprétation et discussion.

❖ **Synthèse des méthodes de régression**

Il est recommandé, initialement, de construire un modèle global incluant toutes les variables explicatives. Ensuite, ces variables peuvent être regroupées en blocs pour évaluer à la fois le modèle global et la contribution de chaque bloc. Le choix entre une entrée forcée ou progressive des variables dépend de la stratégie adoptée : pour un modèle bien soutenu par la théorie, une méthode globale avec entrée forcée, hiérarchisée ou non, est généralement préférée. Pour des études plus exploratoires, les méthodes progressives sont souvent adaptées.

Parmi les approches présentées, la méthode descendante est souvent privilégiée. Cela est dû au risque moindre de commettre des erreurs de type II par rapport à la méthode ascendante. En effet, la méthode ascendante peut ne pas prendre en compte des variables significatives lorsqu'elles sont combinées, risquant ainsi de négliger un prédicteur important pour la variable dépendante. Enfin, un bon modèle devrait être parcimonieux, incluant uniquement des variables ayant une pertinence théorique, tout en expliquant une proportion significative de la variance de la variable dépendante.

Dans le modèle globale, l'équation d'approximation est de la forme :

$$CAT = 80,35 + 0,314 C - 2,202 T + 0,506 C * T$$

Une synthèse complète des modèles à effet individuel, avec interactions et de second ordre, est présentée ci-dessous pour chaque réponse biologique, à savoir CAT, Pase et Prot. Cette approche facilitera la comparaison et permettra des conclusions éclairées sur la contribution de chaque modèle.

IV.8.2/- Modélisation des réponses protéase P_{ase} et protéines Prot (modèles 1^{ier} degré)

Les résultats montrent que malgré des valeurs significatives de la statistique de Fisher ($p=0,02$) inférieures au seuil $\alpha=0,05$, les modèles de régression pour la réponse protéase sont de qualité médiocre, n'étant pas suffisamment explicatifs. Le coefficient de détermination R^2 ne dépasse pas 0,439, indiquant que 56,1% de la variance reste non expliquée par les modèles. De plus, la statistique DW de 0,698 suggère une dépendance des résidus, en contradiction avec l'une des hypothèses de la régression MLR. Les modèles ne montrent pas de capacité prédictive significative ($Q^2_{max}=0,212$) et tendent à représenter la moyenne des réponses Pase. La réponse protéase semble sensible à la durée d'exposition ($p=0,02$).

Tableau IV.13 : Modélisation des réponses protéase P_{ase} et protéines Prot (modèles 1^{er} degré).

Paramètres	<i>Modèle global</i> Pase = 19,924 - 6,455E-03*C - 0,304*T Prot = 57,412 - 9,738E-02*C - 1,076*T		<i>Meilleur modèle</i> Pase = 19,634 - 0,304*T Prot = 57,412 - 9,738E-02*C - 1,076*T		<i>Stepwise</i> Pase = 19,634 - 0,304*T Prot = 53,029 - 1,076*T		<i>Ascendant</i> Pase = 19,634 - 0,304*T Prot = 53,029 - 1,076*T		<i>Descendant</i> Pase = 19,634 - 0,304*T Prot = 53,029 - 1,076*T	
	Protéase	Protéines	Protéase	Protéines	Protéase	Protéines	Protéase	Protéines	Protéase	Protéines
R2	0,439	0,601	0,432	0,601	0,432	0,469	0,432	0,469	0,439	0,601
R2 ajusté	0,314	0,513	0,375	0,513	0,375	0,416	0,375	0,416	0,382	0,561
MCE	5,248	42,888	4,780	42,888	4,780	51,403	4,780	51,403	4,723	38,599
DW	0,651	2,219	0,698	2,219	0,698	2,128	0,698	2,128	0,698	2,128
Cp	3,000	3,000	1,107	3,000	1,107	3,985	1,107	3,985	1,000	1,000
AIC	22,442	47,651	20,585	47,651	20,585	49,088	20,585	49,088	20,442	45,651
SBC	23,897	49,106	21,554	49,106	21,554	50,058	21,554	50,058	21,412	46,621
PC	0,936	0,665	0,795	0,665	0,795	0,743	0,795	0,743	0,786	0,558
Q2	0,089	0,339	0,212	0,339	0,212	0,263	0,212	0,263	0,212	0,263
F et (Pr > F)	3,516 (0,074)	6,785 (0,016)	7,603 (0,020)	6,785 (0,016)	7,603 (0,020)	8,831 (0,014)	7,603 (0,020)	8,831 (0,014)	7,812 (0,019)	15,077 (0,003)
C et (Pr > t)	-0,006 (0,751)	-0,097 (0,118)	0,000	-0,097 (0,118)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
T et (Pr > t)	-0,304 (0,027)	-1,076 (0,010)	-0,304 (0,020)	-1,076 (0,010)	-0,304 (0,020)	-1,076 (0,014)	-0,304 (0,020)	-1,076 (0,014)	-0,304 (0,020)	-1,076 (0,006)
Constante	19,924 (< 0,0001)	57,412 (< 0,0001)	19,634 (< 0,0001)	57,412 (< 0,0001)	19,634 (< 0,0001)	53,030 (< 0,0001)	19,634 (< 0,0001)	53,030 (< 0,0001)	19,634 (< 0,0001)	53,030 (< 0,0001)

En revanche, bien que les variations des teneurs en protéine en réponse à l'exposition au cuivre pendant 14 jours soient faiblement expliquées par (i) le modèle global ($R^2_{\text{ajusté}}=0,513$), (ii) le meilleur modèle ($R^2_{\text{ajusté}}=0,513$), et (iii) celui de la méthode descendante ($R^2_{\text{ajusté}}=0,561$), les résidus sont indépendants selon le test de Durbin-Watson ($DW=2,219$) et le diagramme des résidus. Le modèle de la méthode descendante s'avère le plus explicatif ($F=15,077$; $p=0,003$), avec la durée d'exposition (T) comme facteur influent ($-1,076$; $p=0,006$).

Par ailleurs, l'analyse des modèles avec interaction n'a pas amélioré la qualité des approximations pour la Pase et les Prot (voir ci-dessous). Le meilleur modèle avec interaction est noté pour le modèle Stepwise et Ascendant, décrivant la protéase sous la forme suivante : $Pase = 50,94 - 0,017C * T$, avec un coefficient de détermination $R^2=0,585$ et un $DW=2,085$. Bien que la qualité explicative soit moyenne, les résidus semblent indépendants, validant ainsi le modèle avec interaction.

Concernant la validation du modèle, deux scénarios sont possibles : soit le modèle est validé, ce qui signifie qu'il représente suffisamment bien le phénomène étudié dans le domaine expérimental, permettant ainsi des prévisions fiables à tout point du domaine expérimental ; soit le modèle n'est pas validé, nécessitant alors la proposition d'un modèle alternatif.

IV.8.3/- Comparaison des modèles : Modèle 1^{er} degré (sans et avec interaction) et modèle 2^{ème} degré avec interaction

❖ Approche : Modèle global

$$\blacksquare \text{ CAT}_{(F=13,426 ; p=0,002)} = -79,013_{(p=0,288)} + 3,855 C_{(p=0,004)} + 20,564 T_{(p=0,007)}$$

$$R^2=0,749 ; R^2_{\text{ajusté}}=0,693 ; DW=1,321 ; Q^2=0,425 ; C_{\text{nor}}=0,640 ; T_{\text{nor}}=0,582$$

$$\blacksquare \text{ CAT}_{(F=128,532 ; p<0,0001)} = 80,35_{(p=0,017)} + 0,314 C_{(p=0,531)} - 2,202 T_{(p=0,481)} + 0,506 C * T_{(p<0,0001)}$$

$$R^2=0,98 ; R^2_{\text{ajusté}}=0,972 ; DW=1,892 ; Q^2=0,962$$

$$\blacksquare \text{ CAT}_{(F=80,093 ; p<0,0001)} = 72,534_{(p=0,048)} + 0,047 C_{(p=0,967)} + 6,783 T_{(p=0,353)} + 0,506 C * T_{(p<0,0001)} + 0,003 C^2_{(p=0,799)} - 0,642 T^2_{(p=0,189)}$$

$$R^2=0,985 ; R^2_{\text{ajusté}}=0,973 ; DW=2,198 ; Q^2=0,95$$

Pour les modèles de premier degré, il apparaît clairement que la variabilité totale de la réponse catalase (CAT) est mieux expliquée par le modèle avec interaction, qui présente un R^2 de 0,98 et un DW de 1,892 (très proche de 2). De plus, la qualité du modèle est supérieure avec une valeur de F de Fisher de 128,532 ($p < 0,0001$). Toutefois, l'effet combiné C*T reste le seul facteur influent ($p < 0,0001$).

En revanche, le modèle de second degré n'apporte aucune amélioration dans l'approximation de CAT avec les différents descripteurs. Nous observons ainsi l'absence d'effets quadratiques et d'effets linéaires, car les coefficients de régression correspondants à chacun de ces effets présentent des valeurs de p supérieures à 0,05. L'interaction demeure le facteur le plus influent ($p < 0,0001$).

- $Pase_{(F=3,516; p=0,074)} = 19,924_{(<0,0001)} - 0,006 C_{(p=0,751)} - 0,304 T_{(p=0,027)}$

$$R^2=0,466; R^2_{ajusté}=0,266; DW=0,767; Q^2=-0,022;$$

- $Pase_{(F=2,331; p=0,151)} = 19,199_{(<0,0001)} + 0,016 C_{(p=0,772)} - 0,201 T_{(p=0,345)} - 0,002 C * T_{(p=0,537)}$

$$R^2=0,439; R^2_{ajusté}=0,314; DW=0,651; Q^2=0,089;$$

- $Pase_{(F=7,898; p=0,013)} = 18,273_{(<0,0001)} - 0,015 C_{(p=0,740)} + 0,805 T_{(p=0,023)} - 0,002 C * T_{(p=0,304)} + 0,0003 C^2_{(p=0,552)} - 0,072 T^2_{(p=0,006)}$

$$R^2=0,868; R^2_{ajusté}=0,758; DW=2,290; Q^2=0,271; T_{nor}=1,738; T^2_{nor}=-2,260$$

En passant du modèle de premier degré sans interaction au modèle de premier degré avec interaction, la qualité descriptive du modèle ne montre aucune amélioration en termes de valeur de F de Fisher, de R^2 , et de DW. L'amélioration est constatée en examinant un modèle de second degré. L'équation mathématique présente des statistiques satisfaisantes ($R^2 = 0,868$; $R^2_{ajusté} = 0,758$; $DW = 2,290$), ce qui permet de retenir le modèle d'approximation de la réponse enzymatique Pase ($F=7,898$; $p=0,013$). Cette dernière se révèle sensible uniquement à la durée d'exposition, en considérant à la fois l'effet simple (T, $p=0,023$) et l'effet quadratique (T^2 , $p=0,006$) du facteur temps. Si le facteur T montre un coefficient normalisé positif ($T_{nor} = 1,738$), le descripteur T^2 indique un effet négatif avec un coefficient normalisé encore plus élevé ($T^2_{nor} = -2,260$).

$$\blacksquare \text{Prot}_{(F=6,785 ; p=0,016)} = 57,412_{(<0,0001)} - 0,097 \text{C}_{(p=0,118)} - 1,076 \text{T}_{(p=0,010)}$$

$$R^2=0,601 ; R^2_{ajusté}=0,531 ; DW=2,219 ; Q^2=0,339 ;$$

$$\blacksquare \text{Prot}_{(F=4,963 ; p=0,031)} = 54,137_{(<0,0001)} - 0,025 \text{C}_{(p=0,758)} - 0,608 \text{T}_{(p=0,301)} - 0,010 \text{C} * \text{T}_{(p=0,319)}$$

$$R^2=0,650 ; R^2_{ajusté}=0,519 ; DW=2,350 ; Q^2=0,236 ;$$

$$\blacksquare \text{Prot}_{(F=2,86 ; p=0,117)} = 54,59_{(<0,0001)} - 0,173 \text{C}_{(p=0,461)} + 0,278 \text{T}_{(p=0,842)} - 0,01 \text{C} * \text{T}_{(p=0,356)} + 0,002 \text{C}^2_{(p=0,484)} - 0,063 \text{T}^2_{(p=0,491)}$$

$$R^2=0,704 ; R^2_{ajusté}=0,458 ; DW=2,712 ; Q^2=-0,243 ;$$

Pour les protéines, le modèle de premier degré sans interaction (Prot, $F=6,785$; $p=0,016$) représente le mieux la variabilité totale de la variable dépendante, celle-ci étant sensible uniquement à la durée expérimentale (T ; $p=0,010$). Pour les deux autres modèles, l'approximation ne reflète que la moyenne de la valeur dépendante, seule la constante étant significativement retenue.

❖ Approche : Meilleur modèle

$$\blacksquare \text{CAT}_{(F=13,426 ; p=0,002)} = -79,013_{(p=0,288)} + 3,855 \text{C}_{(p=0,004)} + 20,564 \text{T}_{(p=0,007)}$$

$$R^2=0,749 ; R^2_{ajusté}=0,693 ; DW=1,321 ; Q^2=0,425 ; C_{nor}=0,640 ; T_{nor}=0,582$$

$$\blacksquare \text{CAT}_{(F=205,644 ; p<0,0001)} = 94,482_{(0,000)} - 3,413 \text{T}_{(p=0,165)} + 0,533 \text{C} * \text{T}_{(p<0,0001)}$$

$$R^2=0,979 ; R^2_{ajusté}=0,974 ; DW=1,717 ; Q^2=0,967 ; T_{nor}=-0,097 ; C * T_{nor}=1,049$$

$$\blacksquare \text{CAT}_{(F=247,788 ; p<0,0001)} = 92,527_{(<0,0001)} + 0,539 \text{C} * \text{T}_{(<0,0001)} - 0,294 \text{T}^2_{(p=0,062)}$$

$$R^2=0,985 ; R^2_{ajusté}=0,973 ; DW=2,198 ; Q^2=0,95 ; C * T_{nor}=1,062 ; T^2_{nor}=-0,121$$

Quel que soit le modèle retenu, la réponse CAT montre des approximations satisfaisantes avec les prédicteurs, comme en témoignent les valeurs de R^2 et de DW. La qualité du modèle descripteur, au sens de l'ANOVA, s'améliore d'un modèle à l'autre. Cependant, les facteurs explicatifs varient entre les modèles. L'effet conjugué C*T reste le facteur le plus influent ($p<0,0001$).

Pour une meilleure approximation, nous optons pour le modèle de second degré. La réponse CAT est très sensible de manière positive à l'effet combiné de la concentration et de la durée d'exposition au cuivre ($C * T_{nor} = 1,062$). Cependant, l'effet quadratique du facteur temps se révèle négativement moins important ($T^2_{nor} = -0,121$), ce qui pourrait indiquer une tendance vers le déclin, voire l'inhibition de l'activité CAT pour des durées d'exposition prolongées.

$$\blacksquare \text{Pase}_{(F=7,603; p=0,020)} = 19,634_{(<0,0001)} - 0,304 T_{(p=0,020)}$$

$$R^2=0,432; R^2_{ajusté}=0,375; DW=0,698; Q^2=0,212;$$

$$\blacksquare \text{Pase}_{(F=7,603; p=0,020)} = 19,634_{(<0,0001)} - 0,304 T_{(p=0,020)}$$

$$R^2=0,432; R^2_{ajusté}=0,375; DW=0,698; Q^2=0,212; C=0, C*T=0$$

$$\blacksquare \text{Pase}_{(F=15,521; p=0,001)} = 18,46_{(<0,0001)} + 0,768 T_{(p=0,011)} - 0,001 C * T_{(p=0,248)} - 0,072 T^2_{(p=0,002)}$$

$$R^2=0,853; R^2_{ajusté}=0,798; DW=2,275; Q^2=0,476; T_{nor}=1,658; C*T_{nor}=-0,221; T^2_{nor}=-2,260$$

La réponse protéase se manifeste sensible à la durée d'exposition au cuivre, quel que soit le modèle appliqué. Cependant, les modèles de premier degré sont de qualité médiocre, notamment en ce qui concerne la statistique de Durbin (DW proche de zéro). Par conséquent, seul le modèle de second degré est retenu, affichant des statistiques très satisfaisantes avec un R^2 de 0,853, un R^2 ajusté de 0,798, et surtout un DW de 2,275. Comme dans le cas du modèle global, l'effet quadratique du facteur temps se révèle une fois de plus le plus influent ($T^2_{nor} = -2,260$).

$$\blacksquare \text{Prot}_{(F=6,785; p=0,016)} = 57,412_{(<0,0001)} - 0,097 C_{(p=0,118)} - 1,076 T_{(p=0,010)}$$

$$R^2=0,601; R^2_{ajusté}=0,513; DW=2,219; Q^2=0,339; C_{nor}=-0,364; T_{nor}=-0,685$$

$$\blacksquare \text{Prot}_{(F=8,251; p=0,009)} = 53,03_{(<0,0001)} - 0,513 T_{(p=0,240)} - 0,013 C * T_{(p=0,062)}$$

$$R^2=0,650; R^2_{ajusté}=0,519; DW=2,350; Q^2=0,236;$$

$$\blacksquare \text{Prot}_{(F=2,86; p=0,117)} = 54,59_{(<0,0001)} - 0,173 C_{(p=0,461)} + 0,278 T_{(p=0,842)} - 0,01 C * T_{(p=0,356)} + 0,002 C^2_{(p=0,484)} - 0,063 T^2_{(p=0,491)}$$

$$R^2=0,704; R^2_{ajusté}=0,458; DW=2,712; Q^2=-0,243; T_{nor}=-0,327; C*T_{nor}=-0,554$$

Comparativement au modèle global, l'approche par le meilleur modèle n'a apporté aucune amélioration de la qualité des modèles descriptifs de la variabilité des réponses protéiques. Le modèle de premier degré retenu demeure le même pour les deux approches.

❖ Approche : Stepwise

$$\blacksquare \text{ CAT}_{(F=13,426; p=0,002)} = -79,013_{(p=0,288)} + 3,855 \text{ C}_{(p=0,004)} + 20,564 \text{ T}_{(p=0,007)}$$

$$R^2=0,749; R^2_{\text{ajusté}}=0,693; DW=1,321; Q^2=0,425; C_{\text{nor}}=0,640; T_{\text{nor}}=0,582$$

$$\blacksquare \text{ CAT}_{(F=362,559; p<0,0001)} = 80,59_{(0,000)} + 0,501 \text{ C} * \text{ T}_{(p<0,0001)}$$

$$R^2=0,973; R^2_{\text{ajusté}}=0,970; DW=1,788; Q^2=0,963;$$

$$\blacksquare \text{ CAT}_{(F=362,559; p<0,0001)} = 80,59_{(0,000)} + 0,501 \text{ C} * \text{ T}_{(<0,0001)}$$

$$R^2=0,973; R^2_{\text{ajusté}}=0,970; DW=1,788; Q^2=0,963;$$

Pour les modèles de premier degré, le passage du modèle sans interaction au modèle avec interaction montre une amélioration significative des paramètres statistiques du modèle. Cependant, l'approximation de second degré n'apporte pas de différence par rapport à celle du premier degré avec interaction. En ce qui concerne le nombre de facteurs explicatifs des modèles de second degré, l'approche par le meilleur modèle est plus explicative que l'approche progressive par étapes (Stepwise).

$$\blacksquare \text{ Pase}_{(F=7,603; p=0,020)} = 19,634_{(<0,0001)} - 0,304 \text{ T}_{(p=0,020)}$$

$$R^2=0,432; R^2_{\text{ajusté}}=0,375; DW=0,698; Q^2=0,212;$$

$$\blacksquare \text{ Pase}_{(F=7,603; p=0,020)} = 19,634_{(<0,0001)} - 0,304 \text{ T}_{(p=0,020)}$$

$$R^2=0,432; R^2_{\text{ajusté}}=0,375; DW=0,698; Q^2=0,212; C=0, C*T=0$$

$$\blacksquare \text{ Pase}_{(F=21,2; p=0,000)} = 18,46_{(<0,0001)} + 0,702 \text{ T}_{(p=0,015)} - 0,072 \text{ T}^2_{(p=0,002)}$$

$$R^2=0,825; R^2_{\text{ajusté}}=0,725; DW=2,446; Q^2=0,698; T_{\text{nor}}=1,514; T^2_{\text{nor}}=-2,260$$

Cette fois encore, le modèle de second degré est retenu pour une meilleure représentativité de la variabilité des réponses protéase. Par ailleurs, une légère différence est relevée en faveur de l'approche par le meilleur modèle, que nous suggérons comme la plus adaptée pour expliquer la variabilité de la Pase ($R^2 = 0,853$; $R^2_{\text{ajusté}} = 0,798$; $DW = 2,275$).

- $\text{Prot}_{(F=8,831 ; p=0,014)} = 53,03_{(<0,0001)} - 1,076 T_{(p=0,014)}$

$R^2=0,469$; $R^2_{\text{ajusté}}=0,416$; $DW=2,128$; $Q^2=0,263$;

- $\text{Prot}_{(F=14,099 ; p=0,004)} = 50,94_{(<0,0001)} - 0,017 C * T_{(p=0,004)}$

$R^2=0,585$; $R^2_{\text{ajusté}}=0,544$; $DW=2,085$; $Q^2=0,225$;

- $\text{Prot}_{(F=14,099 ; p=0,004)} = 50,94_{(<0,0001)} - 0,017 C * T_{(p=0,004)}$

$R^2=0,585$; $R^2_{\text{ajusté}}=0,544$; $DW=2,085$; $Q^2=0,225$;

Contrairement à l'approche par le meilleur modèle, la méthode stepwise montre une statistique de Fisher satisfaisante ($F=14,099$; $p=0,004$) pour améliorer la représentativité du modèle de premier degré avec interaction. Cependant, les effets quadratiques de C et T sont nuls et n'apportent aucune amélioration à l'approximation des réponses protéiques. Le modèle de second degré généré ne diffère pas de celui de premier degré avec interaction.

❖ Approche : Ascendante

- $\text{CAT}_{(F=13,426 ; p=0,002)} = -79,013_{(p=0,288)} + 3,855 C_{(p=0,004)} + 20,564 T_{(p=0,007)}$

$R^2=0,749$; $R^2_{\text{ajusté}}=0,693$; $DW=1,321$; $Q^2=0,425$; $C_{\text{nor}}=0,640$; $T_{\text{nor}}=0,582$

- $\text{CAT}_{(F=362,559 ; p<0,0001)} = 80,59_{(0,000)} + 0,501 C * T_{(p<0,0001)}$

$R^2=0,973$; $R^2_{\text{ajusté}}=0,970$; $DW=1,788$; $Q^2=0,963$;

- $\text{CAT}_{(F=362,559 ; p<0,0001)} = 80,59_{(0,000)} + 0,501 C * T_{(<0,0001)}$

$R^2=0,973$; $R^2_{\text{ajusté}}=0,970$; $DW=1,788$; $Q^2=0,963$;

La méthode ascendante montre les mêmes approximations CAT que celles générées par la méthode progressive stepwise. Le modèle retenu est l'équation de premier degré avec interaction.

- $\mathbf{Pase}_{(F=7,603; p=0,020)} = 19,676_{(<0,0001)} - 0,304 \mathbf{T}_{(p=0,020)}$

$$R^2=0,432; R^2_{ajusté}=0,375; DW=0,698; Q^2=0,212;$$

- $\mathbf{Pase}_{(F=7,603; p=0,020)} = 19,634_{(<0,0001)} - 0,304 \mathbf{T}_{(p=0,020)}$

$$R^2=0,432; R^2_{ajusté}=0,375; DW=0,698; Q^2=0,212; C=0, C*T=0$$

- $\mathbf{Pase}_{(F=21,2; p=0,000)} = 18,46_{(<0,0001)} + 0,702 \mathbf{T}_{(p=0,015)} - 0,072 \mathbf{T}^2_{(p=0,002)}$

$$R^2=0,825; R^2_{ajusté}=0,786; DW=2,446; Q^2=0,689; T_{nor}=1,514; T^2_{nor}=-2,260$$

Le modèle de second degré est une nouvelle fois retenu avec des statistiques presque identiques à celles de la méthode stepwise. La seule différence notable est l'amélioration du $R^2_{ajusté}$ observée avec la méthode ascendante. Cependant, l'approche par le meilleur modèle reste la plus représentative en termes de R^2 (0,853), $R^2_{ajusté}$ (0,798), et surtout de DW (2,275). De plus, le terme d'interaction C*T est retenu, bien que son niveau de significativité soit de 24,8%.

- $\mathbf{Prot}_{(F=8,831; p=0,014)} = 53,03_{(<0,0001)} - 1,076 \mathbf{T}_{(p=0,014)}$

$$R^2=0,469; R^2_{ajusté}=0,416; DW=2,128; Q^2=0,263;$$

- $\mathbf{Prot}_{(F=14,099; p=0,004)} = 50,94_{(<0,0001)} - 0,017 \mathbf{C} * \mathbf{T}_{(p=0,004)}$

$$R^2=0,585; R^2_{ajusté}=0,544; DW=2,085; Q^2=0,225;$$

- $\mathbf{Prot}_{(F=14,099; p=0,004)} = 50,94_{(<0,0001)} - 0,017 \mathbf{C} * \mathbf{T}_{(p=0,004)}$

$$R^2=0,585; R^2_{ajusté}=0,544; DW=2,085; Q^2=0,225;$$

Les modèles obtenus par la méthode ascendante sont identiques à ceux produits par la méthode progressive stepwise. L'interaction C*T du modèle de premier degré suffit pour bien caractériser la variabilité des réponses protéiques.

❖ Approche : Descendante

$$\blacksquare \text{ CAT}_{(F=13,426; p=0,002)} = -79,013_{(p=0,288)} + 3,855 \text{ C}_{(p=0,004)} + 20,564 \text{ T}_{(p=0,007)}$$

$$R^2=0,749; R^2_{\text{ajusté}}=0,693; DW=1,321; Q^2=0,425; C_{\text{nor}}=0,640; T_{\text{nor}}=0,582$$

$$\blacksquare \text{ CAT}_{(F=481,995; p<0,0001)} = 79,067_{(p=0,001)} + 0,506 \text{ C} * \text{ T}_{(p<0,0001)}$$

$$R^2=0,980; R^2_{\text{ajusté}}=0,978; DW=1,733; Q^2=0,937;$$

$$\blacksquare \text{ CAT}_{(F=667,443; p<0,0001)} = 79,067_{(0,000)} + 0,506 \text{ C} * \text{ T}_{(<0,0001)}$$

$$R^2=0,985; R^2_{\text{ajusté}}=0,984; DW=1,733; Q^2=0,937;$$

L'approche descendante n'apporte pratiquement aucune amélioration aux modèles générés pour la réponse CAT, qui présentent des statistiques identiques à celles produites par la méthode ascendante. La meilleure approximation pour CAT demeure toujours celle décrite par le modèle de second degré de l'approche par le meilleur modèle.

$$\blacksquare \text{ Pase}_{(F=7,812; p=0,019)} = 19,634_{(<0,0001)} - 0,304 \text{ T}_{(p=0,020)}$$

$$R^2=0,439; R^2_{\text{ajusté}}=0,382; DW=0,698; Q^2=0,212;$$

$$\blacksquare \text{ Pase}_{(F=8,74; p=0,014)} = 18,909_{(<0,0001)} - 0,201 \text{ T}_{(p=0,288)}$$

$$R^2=0,466; R^2_{\text{ajusté}}=0,413; DW=0,600; Q^2=-0,361; C=0, C*T=0$$

$$\blacksquare \text{ Pase}_{(F=29,619; p=0,000)} = 17,735_{(<0,0001)} + 0,805 \text{ T}_{(p=0,005)} - 0,072 \text{ T}^2_{(p=0,001)}$$

$$R^2=0,868; R^2_{\text{ajusté}}=0,839; DW=1,788; Q^2=0,241; T_{\text{nor}}=1,738; T^2_{\text{nor}}=-2,260$$

Cette fois-ci, l'approche descendante révèle que la meilleure approximation pour les réponses protéase est décrite par le modèle de second degré. Le modèle retenu explique 86,8% de la variabilité de la protéase, et le $R^2_{\text{ajusté}}$ s'améliore de manière significative (0,839). Le poids de l'effet individuel du facteur T augmente également ($T_{\text{nor}}=1,738$) par rapport aux autres approches pour le même modèle.

$$\blacksquare \text{Prot}_{(F=15,077 ; p=0,003)} = 53,03_{(<0,0001)} - 1,076 T_{(p=0,006)}$$

$$R^2=0,601 ; R^2_{ajusté}=0,561 ; DW=2,128 ; Q^2=0,263 ;$$

$$\blacksquare \text{Prot}_{(F=18,61 ; p=0,002)} = 49,755_{(<0,0001)} - 0,608 T_{(p=0,244)}$$

$$R^2=0,650 ; R^2_{ajusté}=0,616 ; DW=1,641 ; Q^2=-0,408 ;$$

$$\blacksquare \text{Prot}_{(F=23,834 ; p=0,001)} = 48,772_{(<0,0001)} - 0,01 C * T_{(p=0,226)}$$

$$R^2=0,704 ; R^2_{ajusté}=0,675 ; DW=1,605 ; Q^2=-1,417 ;$$

Aucune amélioration n'est apportée par la méthode descendante pour mieux caractériser la variabilité des réponses protéines.

❖ Synthèse des méthodes d'approximation

MM

$$\blacksquare \text{CAT}_{(F=247,788 ; p<0,0001)} = 92,527_{(<0,0001)} + 0,539 C * T_{(<0,0001)} - 0,294 T^2_{(p=0,062)}$$

$$R^2=0,985 ; R^2_{ajusté}=0,973 ; DW=2,198 ; Q^2=0,95 ; C*T_{nor}=1,062 ; T^2_{nor}=-0,121$$

Quelle que soit la méthode considérée, les réponses CAT démontrent des approximations très significatives (>0,97) avec les variables explicatives C et T. Cependant, nous avons opté pour le modèle de second degré de l'approche par le meilleur modèle. La réponse CAT se révèle très sensible à l'effet combiné C*T.

Descendante

$$\checkmark \text{Pase}_{(F=29,619 ; p=0,000)} = 17,735_{(<0,0001)} + 0,805 T_{(p=0,005)} - 0,072 T^2_{(p=0,001)}$$

$$R^2=0,868 ; R^2_{ajusté}=0,839 ; DW=1,788 ; Q^2=0,241 ; T_{nor}=1,738 ; T^2_{nor}=-2,260$$

En ce qui concerne les réponses Pase, la meilleure approximation ($R^2=0,868$) est obtenue avec la méthode descendante. La protéase s'est montrée sensible à l'effet linéaire simple et quadratique du facteur T. L'effet d'interaction n'a été présent que dans le modèle de second degré de l'approche par le meilleur modèle, mais avec un seuil de non-significativité de 24,8%.

Stepwise

$$\checkmark \text{Prot}_{(F=14,099; p=0,004)} = 50,94_{(<0,0001)} - 0,017 \text{C} * \text{T}_{(p=0,004)}$$

$$R^2=0,585; R^2_{\text{ajusté}}=0,544; DW=2,085; Q^2=0,225;$$

Ascendante

$$\checkmark \text{Prot}_{(F=14,099; p=0,004)} = 50,94_{(<0,0001)} - 0,017 \text{C} * \text{T}_{(p=0,004)}$$

$$R^2=0,585; R^2_{\text{ajusté}}=0,544; DW=2,085; Q^2=0,225;$$

Les méthodes stepwise et ascendante ont toutes deux généré le meilleur modèle d'approximation des réponses protéiques. Les deux modèles sont retenus car ils intègrent l'effet combiné des deux facteurs influents C et T, avec un DW optimal proche de deux. Cependant, la qualité des deux modèles est seulement moyenne et la variabilité des réponses protéiques n'est expliquée qu'à hauteur de 58,5% de la variabilité totale.

IV.8.4/- Introduction des réponses Pase et Prot comme des variables explicatives

Comme indiqué précédemment, la réponse CAT montre la meilleure approximation avec les deux facteurs influents C et T. Cette fois-ci, nous avons exploré approximativement comment la réponse antioxydante CAT pourrait être traduite en introduisant les valeurs de la Pase et des Prot comme variables explicatives. Les réponses biologiques étant interdépendantes, cela nécessite une approche adaptée ! Toutes les méthodes de modélisation ont été réappliquées, mais nous nous concentrerons uniquement sur celle(s) qui représentent le mieux les différentes approximations.

❖ Approche : Stepwise et Ascendante**1. Modèle 1^{ier} degré avec Interaction CAT = f (C, T, Prot, Pase)**

$$\text{CAT}_{(F=343,354; p<0,0001)} = -120,993_{(0,0989)} + 10,8 \text{Pase}_{(p=0,013)} + 0,541 \text{C} * \text{T}_{(<0,0001)}$$

$$R^2=0,987; R^2_{\text{ajusté}}=0,984; DW=2,423; Q^2=0,976; \text{Pase}_{\text{nor}}=0,142; \text{C} * \text{T}_{\text{nor}}=1,065$$

Bien que les variables C et T soient indépendantes, les approximations impliquant les variables Pase et Prot en combinaison avec C et T ont mis en évidence des multicolinéarités très élevées, avec des facteurs d'inflation de la variance (VIF) largement supérieurs à 10, indiquant un problème de multicolinéarité. Ainsi, ces descripteurs ne peuvent pas être utilisés simultanément dans l'analyse par Régression Linéaire Multiple (MLR), rendant les méthodes de régression non significatives. Les coefficients estimés par ces modèles ne sont probablement pas optimaux, et les estimations des coefficients peuvent être incorrectes.

L'objectif de l'analyse statistique est justement de démêler ces descripteurs et d'identifier ceux qui sont corrélés à la variable cible, fournissant du signal, de ceux qui ne le sont pas, produisant du bruit. L'analyse statistique permet également d'identifier les descripteurs qui sont corrélés entre eux afin de ne conserver que les plus pertinents et de réduire la redondance d'informations [376].

La meilleure combinaison est obtenue en appliquant les méthodes stepwise et ascendante. Ainsi, 98,7% de la variabilité totale est expliquée par le modèle ci-dessus. Les résidus semblent indépendants (DW proche de deux) et le modèle s'ajuste très bien avec les deux variables explicatives, Pase ($p=0,013$) et l'interaction C*T ($<0,0001$). L'interaction reste toujours le facteur le plus influent sur les réponses CAT ($C*T_{nor}=1,065$).

La stimulation des réponses antioxydantes CAT est positivement liée à l'activité digestive des protéases. Il est probable que l'activation de la digestion soit stimulée pour répondre aux besoins énergétiques, favorisant ainsi les activités de CAT et soutenant d'autres fonctions énergétiques de base chez les bivalves, comme la croissance et la reproduction (voir partie discussion des biomarqueurs).

2. Modèle 2^{ème} degré avec Interaction $CAT = f(C, T, Prot, Pase)$

$$CAT_{(F=363,657; p<0,0001)} = -33,843_{(0,374)} + 0,539 C * T_{(<0,0001)} + 0,327 Pase^2_{(<0,010)}$$

$R^2=0,988; R^2_{ajusté}=0,985; DW=2,353; Pase^2_{nor}=0,142; C*T_{nor}=1,061$

Le modèle 2^{ème} degré présente une qualité d'approximation pratiquement similaire à celle du modèle précédent de 1^{er} degré, avec des valeurs de $R^2=0,988$, $R^2_{ajusté}=0,985$ et $DW=2,353$. L'effet combiné C*T demeure toujours le plus influent, et le poids du facteur $Pase^2$ reste le même que celui de $Pase$. Ainsi, le modèle premier degré suffira pour mieux comprendre la relation d'approximation $CAT = f(C, T, Pase, Prot)$.

❖ **Approche : Meilleur modèle, Stepwise et Ascendante**

3. Modèle 1^{er} degré avec Interaction $CAT = f(Prot, Pase)$

$$CAT_{(F=14,621; p=0,003)} = 1026,675_{(p=0,001)} - 17,325 Prot_{(p=0,003)}$$

$R^2=0,594$; $R^2_{ajusté}=0,553$; $DW=1,626$;

Dans cette partie de modélisation, nous avons sélectionné uniquement les variables $Pase$ et $Prot$ pour expliquer la variabilité de la réponse CAT . Cela permet de prédire une situation de stress en l'absence d'informations sur la qualité du milieu environnant. Le meilleur modèle retenu s'ajuste de manière modérée avec les protéines.

❖ **Synthèse et conclusion**

L'objectif principal de la régression multiple, terme initialement introduit par *Pearson* en 1908, est de quantifier la relation entre plusieurs variables indépendantes (ou prédicteurs) et une variable dépendante (ou critère). En sciences naturelles, les procédures de régression multiple sont largement utilisées en recherche. De manière générale, la régression multiple permet aux chercheurs de se poser la question fondamentale (et idéalement d'y répondre) : « Quel est le meilleur indicateur permettant de prédire une variable donnée ? » [377].

Dans le contexte des sciences naturelles, notamment pour les organismes aquatiques comme les bivalves, la prédiction analytique des biomarqueurs de stress constitue un résultat significatif face à divers facteurs de perturbation. Cette prédiction peut être encore améliorée en utilisant des modèles mathématiques dont les performances statistiques permettent de qualifier de manière précise les modèles obtenus. Cela vise à améliorer la précision de l'interprétation des réponses enzymatiques des biomarqueurs de stress.

En résumé, les méthodes de régression linéaire multiple (MLR) nous aident à identifier le modèle qui représente au mieux les données expérimentales, ce qui nous permet de mieux comprendre le comportement et/ou la réponse des bivalves (biomarqueurs) face aux différents types de polluants (chimiques, biologiques, abiotiques).

Dans notre pratique de modélisation, l'approche de régression linéaire multiple (MLR) s'est révélée être un outil facile à utiliser pour décrire les réponses enzymatiques ainsi que celles des protéines. Cependant, les modèles obtenus varient en qualité selon les différentes réponses étudiées.

Pour la réponse CAT, les modèles de régression montrent des qualités très satisfaisantes en termes de paramètres statistiques de validation. Les données expérimentales s'ajustent bien aux modèles obtenus, quel que soit le type de régression appliqué. Alors qu'un modèle de premier degré suffisait pour décrire l'approximation de CAT avec les prédicteurs concentration (C) et durée d'exposition (T), l'introduction de l'interaction (C*T) a montré des améliorations significatives. En revanche, les modèles de second degré n'ont pas apporté d'amélioration supplémentaire par rapport aux modèles de premier degré. La réponse CAT semble être dépendante de la dose et de la durée, avec une sensibilité accrue à l'interaction synergique des deux facteurs C et T. Cette enzyme antioxydante se révèle ainsi comme un biomarqueur précoce très sensible à ces interactions.

En ce qui concerne les réponses protéase, les modèles de deuxième degré générés par la méthode descendante ont bien expliqué les variations. L'activité de cette enzyme digestive est fortement influencée par la durée d'exposition. L'effet linéaire de T stimule l'activité protéase, tandis que l'effet quadratique montre une corrélation négative avec cette activité digestive. L'assurance des besoins énergétiques pour diverses activités physiologiques de base dépend largement de cette activité digestive. En situation de stress prolongé dû à l'exposition à des xénobiotiques, les besoins énergétiques pour la défense peuvent compromettre l'activité des enzymes digestives.

Par ailleurs, les modèles de premier degré avec interaction générés par les méthodes stepwise et ascendante ont interprété de manière moyenne les variations des protéines.

L'incapacité de validation d'un modèle rend son utilisation impossible, nécessitant ainsi l'exploration de modèles alternatifs pour une meilleure représentation de la relation entre la variable dépendante et les variables explicatives.

En outre, la présence de multicollinéarité dans les modèles incluant les variables de concentration (C), durée (T), protéase (Pase) et protéines (Prot) en tant que variables explicatives rend l'interprétation des modèles de CAT insignifiante. Ce problème peut être surmonté en utilisant des approches telles que la PLS (Partial Least Squares). Cependant, les modèles avec interactions n'ont pas montré de qualité d'approximation significative. Certains chercheurs préfèrent utiliser des modèles exponentiels ou des modèles trigonométriques (sinus cosinus) pour améliorer la qualité explicative et prédictive des modèles d'approximation.

En résumé, le domaine de la modélisation est vaste et complexe, surtout dans le contexte des phénomènes biologiques, ce qui peut nécessiter l'utilisation de modèles de plus en plus sophistiqués en fonction des situations rencontrées dans la pratique expérimentale.

Toutefois, l'approche de modélisation explicative devrait certainement contribuer à améliorer la compréhension des réponses des biomarqueurs, comme cela a été démontré dans cette étude pour le biomarqueur CAT. Dans certaines situations, la qualité des modèles s'avère être prédictive, renforçant ainsi l'argument en faveur de l'utilisation du biomarqueur CAT comme un indicateur précoce, sensible et efficace pour diagnostiquer la qualité des milieux aquatiques.

IV.9/- Etude de l'effet des polluants organiques sur les moules *Mytilus* et *Perna*

La nécessité de méthodes d'évaluation de la toxicité à moyen et long terme est largement reconnue de nos jours. Parmi les groupes d'organismes utilisés, les bivalves représentent un matériel de choix. Il nous a donc semblé pertinent, à la lumière des résultats obtenus, de discuter de l'apport potentiel des réponses biologiques des moules dans ce domaine. Cependant, afin de renforcer cette discussion par des données plus générales, il était nécessaire d'élargir nos essais à des substances autres que les métaux. Dans cette optique, trois molécules organiques et trois effluents réels ont été testés.

IV.9.1/- Résultats du test d'exposition au phénol

IV.9.1.1/- Résultats des dosages biochimiques de la catalase

❖ Cycle de contamination

Comparativement aux témoins, la figure (IV.10) ci-dessous illustre les proportions d'augmentation de l'activité catalase (CAT) chez les deux espèces de moules, *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis*, exposées au phénol à différentes concentrations pendant 96 heures.

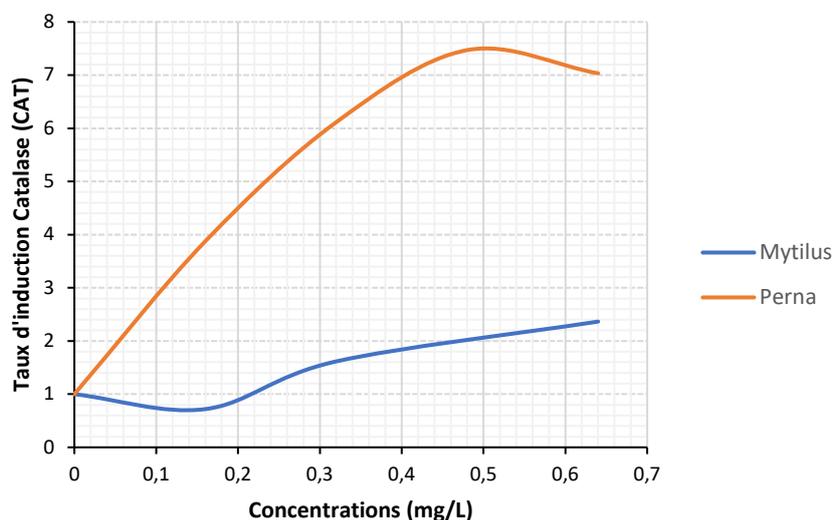


Figure IV.10 : Evolution des activités catalase (CAT) chez les moules *Mytilus* et *Perna* exposées au phénol

Comme première observation, il ressort clairement que les taux d'induction de la CAT mesurés chez les moules *Perna* sont significativement supérieurs à ceux relevés chez l'espèce *Mytilus*. Cependant, les réponses de la CAT chez les deux espèces de moules sont positivement corrélées avec le gradient de concentration de phénol ($CAT_{Mytilus}/C_{Phéno} = 0.846$; $CAT_{Perna}/C_{Phéno} = 0.831$).

Chez l'espèce *Mytilus*, la concentration de 0,16mg/L n'a montré aucune induction significative de l'activité catalase ($CAT = 53,085 \pm$) par rapport aux témoins ($CAT = 73,827 \pm$). En revanche, des effets significatifs sont observés à partir de la concentration de 0,32mg/L. Les inductions de la CAT augmentent progressivement, avec une activité maximale ($CAT = 174,604 \pm$) observée à la concentration maximale de 0,64mg/L, représentant une augmentation de 2,36 fois.

Pour les moules *Perna perna*, des différences significatives dans l'augmentation de l'activité CAT sont notées dès la faible concentration de phénol (0,16mg/L), avec une activité CAT multipliée par 3,875 fois. L'activité maximale est observée à la concentration de 0,48mg/L (7,47 fois). A la concentration de 0,64mg/L, l'augmentation de l'activité CAT n'est pas significativement différente de celle à 0,48mg/L (7,033 fois). Cette stagnation de l'activité CAT peut indiquer soit une adaptation, soit un début d'inhibition enzymatique et/ou une incapacité à gérer le stress induit par le phénol.

Pour clarifier la relation dose/effet de l'exposition des moules aux différentes concentrations de phénol, une étude statistique des régressions linéaires des réponses biologiques a été réalisée, dont les résultats sont exposés ci-dessous. L'objectif est de déterminer si la concentration de phénol influence la réponse des biomarqueurs et comment cette influence peut être exprimée.

La régression diffère de l'analyse de la corrélation, où toutes les variables jouent un rôle symétrique sans distinction entre variable dépendante et indépendante. Cependant, comme dans le contexte de l'analyse de la corrélation, il faut être prudent lorsqu'on formule des relations de causalité. L'existence d'une relation entre X et Y n'implique pas nécessairement une relation de causalité entre elles.

Avant toute analyse, il est important de représenter les données. Le but de la régression simple est de trouver une fonction f telle que $y_i \approx f(x_i)$. Pour définir l'approximation (\approx), il faut établir un critère qui quantifie la qualité de l'ajustement de la fonction f aux données. Ainsi, une étude de régression simple commence toujours par un tracé des observations (x_i, y_i) , $i = 1, \dots, n$. Cette première représentation permet de déterminer si le modèle linéaire est pertinent.

L'analyse de variance des approximation CAT (pour les deux espèces de moules) est présentée dans Le tableau (IV.14), ci-dessous.

Tableau IV.14 : L'analyse de variance des approximation CAT

Source		Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	<i>Mytilus</i>	25511,468	25511,468	25,083	0,001
	<i>Perna</i>	14134,936	7067,468	22,433	< 0,0001
Erreur	<i>Mytilus</i>	10170,771	1017,077		
	<i>Perna</i>	3780,591	315,049		
Total corrigé	<i>Mytilus</i>	35682,239			
	<i>Perna</i>	17915,527			

Les modèles d'approximation sont les suivants :

Mytilus :

$$CAT_{(F=25,083; p=0,001)} = 49,467_{(p=0,011)} + 192,414 C_{(p=0,001)}$$

$$R^2=0,715; R^2_{ajusté}=0,686; DW=2,220; Q^2=0,601; C_{nor}=0,846$$

Perna :

$$CAT_{(F=22,433; p<0,0001)} = 11,225_{(p=0,336)} + 327,661 C_{(p=0,002)} - 292,409 C^2_{(p=0,036)}$$

$$R^2=0,789; R^2_{ajusté}=0,754; DW=2,664; Q^2=0,713; C_{nor}=1,956; C^2_{nor}=-1,167$$

La qualité globale des modèles obtenus est satisfaisante, expliquant plus de 70% de la variabilité totale. Les variabilités non expliquées semblent se cacher dans les résidus. Par ailleurs, l'analyse de la variance montre des valeurs du F de Fisher indiquant que la part de la variance de la CAT expliquée par les modèles est au minimum 22,433 fois plus importante que celle restant inexpliquée.

La probabilité ($Pr > F$) associée au test de Fisher (F) est d'au moins 0,001, ce qui signifie que le risque de non-signification du modèle est de 0,01%, un risque négligeable.

L'approximation CAT chez l'espèce *Mytilus* démontre un effet significativement positif de la concentration ($p=0,001$), et le modèle de 1^{ier} degré semble suffisant pour expliquer la variabilité totale de la réponse CAT.

En revanche, le modèle d'approximation CAT chez l'espèce *Perna* s'améliore avec l'introduction du terme quadratique dans le modèle de régression pour mieux expliquer la variabilité totale. L'effet linéaire de la concentration affiche un coefficient normalisé positif de 1,956 ($p=0,002$), indiquant que la concentration en phénol a un effet stimulateur sur la réponse enzymatique antioxydante CAT. Cependant, l'augmentation de la concentration pourrait avoir un effet inhibiteur sur la capacité de faire face au stress oxydatif causé par le phénol, comme le montre le coefficient normalisé du terme quadratique C^2 avec une valeur négative de -1,167 ($p=0,036$). En termes de poids des coefficients normalisés, l'effet linéaire (1,956) semble plus important que l'effet quadratique (-1,167), qui intervient à des concentrations élevées.

❖ **Cycle de décontamination**

Les variations CAT, mesurées chez les moules *Mytilus*, durant le cycle de décontamination sont graphiquement indiquées par la figure (IV.11) ci-dessous.

Chez les témoins, les activités CAT relevées au cours du cycle expérimental n'ont révélé aucune différence significative ($p > 0,05$). Il est donc facile de conclure que les conditions expérimentales n'ont eu aucun effet stressant apparent sur les moules *Mytilus*.

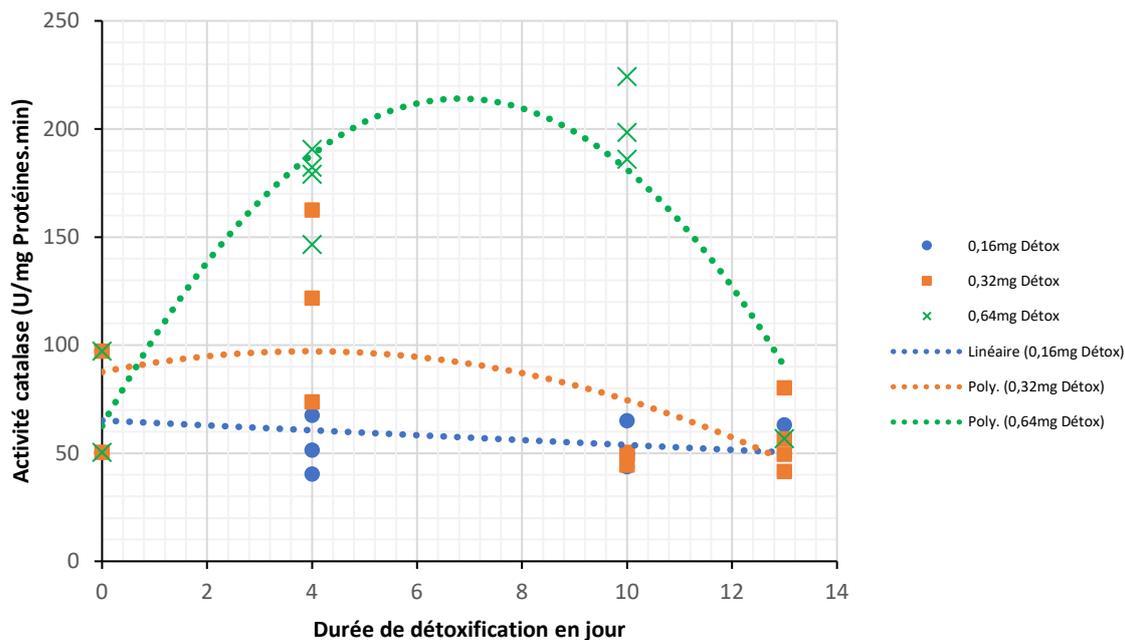


Figure IV.11 : Evolution de l'activité CAT, chez la moule *Mytilus*, durant le cycle de détoxification.

Comme mentionné précédemment, sous l'effet de la concentration de 0,16mg/L de phénol, l'activité CAT s'est trouvée indépendante de la dose. Aucune différence significative ($p > 0,05$) de la CAT n'a été notée chez ce groupe durant le cycle de détoxification, indiquant une stabilité de l'activité antioxydante CAT, ce qui suggère probablement une stratégie d'adaptation aux conditions expérimentales. La détoxification de ce groupe ne montre donc ni l'utilité ni l'efficacité d'un cycle de détoxification. Cela soulève la question : la durée de décontamination est-elle suffisante pour que les moules retrouvent leur métabolisme basal ?

Pour le groupe de moules précédemment exposé à une concentration de 0,32mg/L de phénol, une baisse significative de l'activité CAT a été observée. Une durée de détoxification de 6 jours semblait suffisante pour que les moules retrouvent un métabolisme de défense comparable à celui des témoins. Trois jours supplémentaires de décontamination ont confirmé ce constat.

Pour le groupe de moules exposé à 0,64mg/L, les inductions CAT ont continué d'augmenter jusqu'au 6^{ème} jour de détoxification. Au 9^{ème} jour, une chute considérable des taux d'induction CAT a été observée, avec des valeurs comparables à celles des témoins.

Il est difficile de déterminer si cela indique une guérison des moules ou un déclin précédant une incapacité à maintenir l'homéostasie, voire la survie des moules. Une prolongation du cycle de détoxification aurait pu clarifier cette question.

En résumé, une étude statistique de régression linéaire a été appliquée aux données du groupe 0,32mg/L Détox, tandis que l'application du Spline cubique aux données du groupe 0,64mg/L Détox semblait être la meilleure approche pour décrire les approximations CAT avec la durée de détoxification.

L'analyse de variance et l'estimation des coefficients de la régression sont présentées dans les tableaux (IV.15 et IV.16) ci-après :

Tableau IV.15 : Analyse de la variance (CAT)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	7499,285	7499,285	9,027	0,017
Erreur	8	6646,246	830,781		
Total corrigé	9	14145,531			

Tableau IV.16 : Paramètres du modèle (CAT)

Source	Valeur	Erreur standard	t	Pr > t	Borne inférieure (95%)	Borne supérieure (95%)
Constante	112,443	15,988	7,033	0,000	75,574	149,312
T	-7,308	2,433	-3,004	0,017	-12,918	-1,699

L'équation du modèle d'approximation CAT est la suivante :

Mytilus :

$$CAT_{(F=9,027; p=0,017)} = 112,443_{(p=0,000)} - 7,308 T_{(p=0,017)}$$

$$R^2=0,53; T_{nor}=-0,728$$

Le modèle de régression linéaire ci-dessus décrit une qualité d'ajustement moyenne de 53%. L'effet de la durée de détoxification est significatif ($p=0,017$) et affiche un coefficient de corrélation de -0,728, traduisant les taux de diminution de l'activité antistress oxydatif CAT. En revanche, l'examen d'un modèle 2^{ème} degré n'a apporté aucune amélioration à la qualité descriptive de l'approximation CAT avec la durée de décontamination.

Pour les données du groupe de détox 0,64mg/L, les coefficients du modèle mathématique sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV.17 : Coefficients de la spline cubique

Intervalles de la spline	T ³	T ²	T	Constante
[0jour ; 6jour]	-0,460	0,000	23,117	146,475
[6jour ; 9jour]	0,919	-8,272	-26,512	185,921

Au début de la décontamination jusqu'au 6^{ème} jour, l'effet linéaire de la durée est significativement positif, tandis que l'effet quadratique est nul, n'apportant aucune information supplémentaire sur l'approximation. Après cet intervalle, la baisse des taux de la CAT est représentée par un coefficient linéaire fortement négatif. Le terme quadratique a un coefficient moyennement positif, et le terme cubique est positivement négligeable.

Les variations de l'activité CAT mesurées chez les moules *Perna* pendant le cycle de décontamination sont illustrées graphiquement dans la figure (IV.12) ci-dessous.

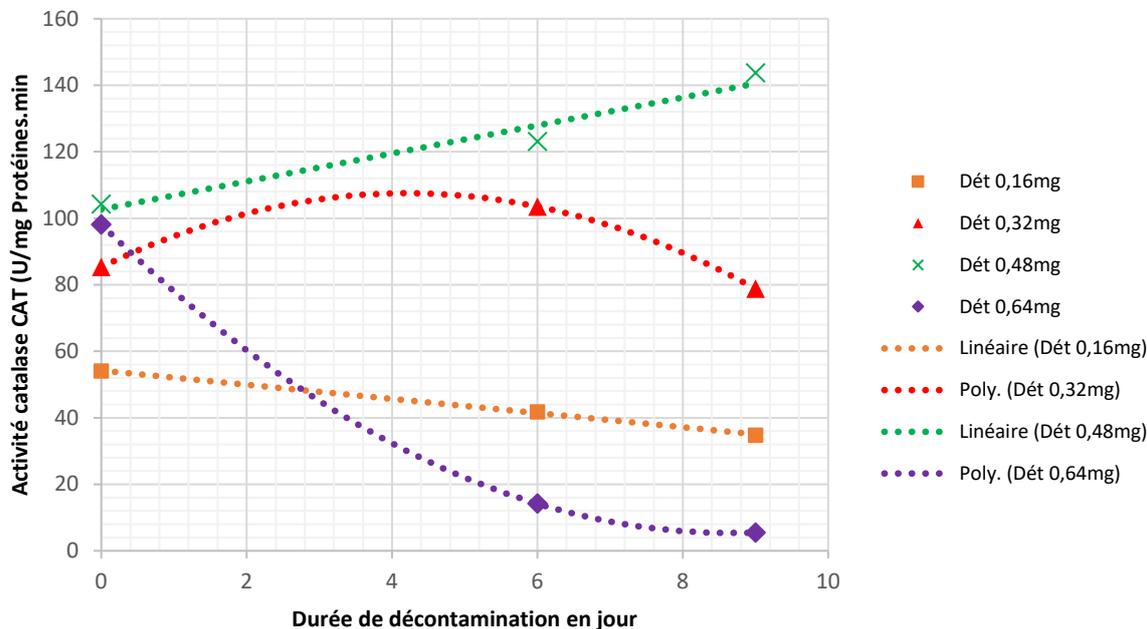


Figure IV.12 : Evolution de l'activité CAT, chez la moule *Perna*, durant le cycle de détoxification.

Pour l'espèce *Perna perna*, la durée de détoxification ne semblait pas suffisante pour permettre un retour à l'état basal de stress. Le groupe de moules détoxifié de la concentration 0,16mg/L n'a montré aucune réversibilité homéostasique, avec des taux d'induction de la CAT restant stationnaires jusqu'au 9^{ème} jour, fin du cycle de décontamination.

Comparativement aux activités CAT relevées à la fin du cycle de contamination, les moules *Perna* détoxifiées de la concentration 0,32 mg/L ont révélé une augmentation significative () après 6 jours de détoxification, suivie d'une légère baisse de l'activité CAT au 9^{ème} jour. Toutefois, l'activité atteinte reste bien supérieure à celle des témoins.

Chez le groupe de moules initialement contaminé par la concentration de 0,48mg/L, l'état de stress, traduit par l'enzyme antioxydante CAT, ne montre aucune possibilité de retour à la normale, avec des inductions continues pendant toute la durée de détoxification. Il est fort probable que les mécanismes physiologiques de base ne soient pas réversibles, ce qui risque de compromettre la survie des individus en raison d'un déclin métabolique.

Les moules détoxifiées de la forte concentration de 0,64mg/L ont montré des taux de CAT très faibles aux 6^{ème} et 9^{ème} jour, indiquant probablement un effet d'inhibition, avec des valeurs proches de l'inactivation de l'enzyme antioxydante CAT.

IV.9.1.2/- Résultats du dosage biochimique de la protéase

❖ Cycle de contamination

Les paramètres statistiques du modèle de régression linéaire décrivant l'approximation de l'activité protéase chez les moules *Perna perna* en réponse à l'effet de la concentration du phénol sont résumés dans les tableaux (V.18, 19 et 20) ci-dessous. Le modèle d'approximation est formulé comme suit :

Perna perna :

$$CAT_{(F=15,263; p=0,002)} = 13,418_{(p<0,0001)} - 7,691 T_{(p=0,002)}$$

Tableau IV.18 : Analyse de la variance (Pase) chez les moules *Perna*.

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	45,426	45,426	15,263	0,002
Erreur	13	38,690	2,976		
Total corrigé	14	84,116			

Tableau IV.19 : Paramètres du modèle (Pase) chez la moule *Perna*.

Source	Valeur	Erreur standard	t	Pr > t	Borne inf (95%)	Borne sup (95%)
Constant	13,418	0,772	17,392	< 0,0001	11,751	15,085
C	-7,691	1,969	-3,907	0,002	-11,944	-3,438

Tableau IV.20 : Coefficients normalisés (Pase) chez les moules *Perna*.

Source	Valeur	Erreur standard	t	Pr > t	Borne inf (95%)	Borne sup (95%)
C	-0,735	0,188	-3,907	0,002	-1,141	-0,329

Chez les moules *Mytilus*, et comparativement aux témoins, les concentrations testées en phénol n'ont eu aucun impact significatif sur l'activité de l'enzyme digestive protéase. Les différences d'activités observées ne sont pas significatives ($p > 0,05$) quelle que soit la concentration considérée, et aucune corrélation n'a été relevée pour décrire l'effet de l'augmentation de la concentration sur l'activité digestive. Par conséquent, il est inutile d'étudier la régression linéaire de la réponse **Pase** chez les moules *Mytilus*.

En revanche, chez les moules *Perna perna*, une exposition de 96 heures semble suffisante pour montrer des atteintes claires à l'enzyme digestive (fig IV.26). Une corrélation négative ($C_{\text{phénol}}/\text{Pase} = -0,735$, $p < 0,05$) a été notée entre le gradient de concentration en phénol et l'activité protéase.

L'étude statistique de la régression linéaire a révélé un modèle d'approximation de l'activité Pase satisfaisant, avec une qualité d'ajustement linéaire moyenne, expliquant 54% de la variabilité totale. La significativité globale du modèle affiche un F de Fisher (15,263) non nul, rejetant l'hypothèse nulle (H_0) selon laquelle l'effet de la concentration serait nul. La probabilité associée au test de Fisher indique un risque de non-significativité du modèle de 0,02 %.

❖ Cycle de décontamination

Les variations de l'activité protéase (Pase) relevées chez l'espèce *Mytilus galloprovincialis*, durant le cycle de décontamination, sont graphiquement illustrées par la figure (IV.13) ci-dessous :

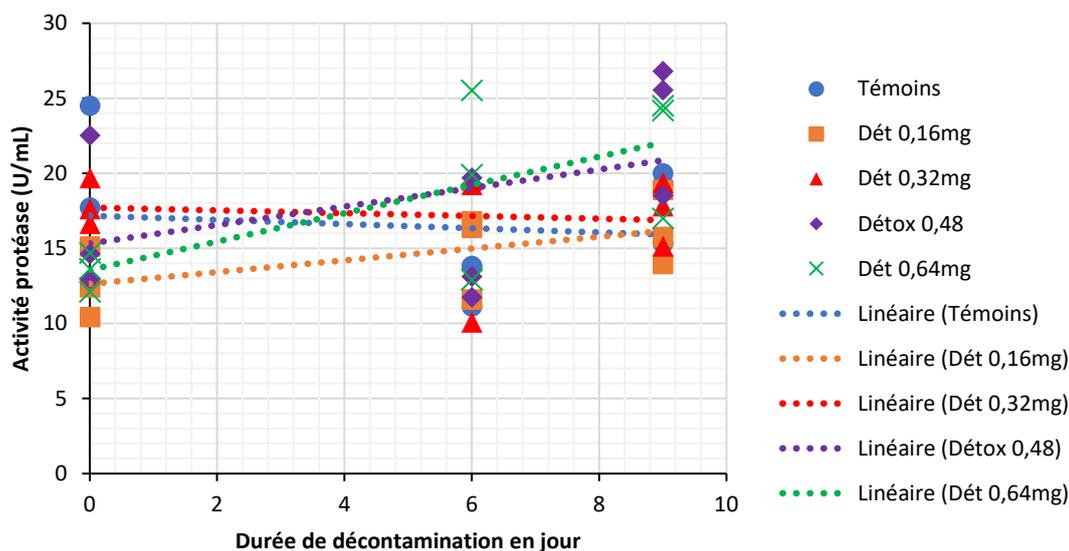


Figure IV.13 : Les variations Pase, mesurées chez les moules *Mytilus*, durant le cycle de décontamination.

Les concentrations testées en phénol n'ont pas eu d'effet significatif sur l'activité de la protéase (Pase) après 96 heures d'exposition. Pendant le cycle de décontamination, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée entre les groupes détoxifiés, quel que soit le temps de détoxification. Cependant, le groupe détoxifié de la concentration 0,64mg/L a montré une légère augmentation de l'activité Pase, avec une corrélation positive de 0,695, et un modèle de régression décrit comme suit :

Mytilus galloprovincialis :

$$\text{Détox } 0,64\text{mg: } P_{ase} (F=0,549 ; p=0,038) = 13,57 (p<0,001) + 0,943 T (p=0,038)$$

Pour résumer, le tableau ci-dessous présente les paramètres statistiques qui qualifient la relation entre la durée de détoxification et la réponse enzymatique pour chaque groupe de détoxification.

Tableau IV.21 : Synthèse de tous les Y (les différents groupes de détox de *Mytilus*).

	Témoins	Détox 0,16mg	Détox 0,32mg	Détox 0,48	Détox 0,64mg
R²	0,017	0,325	0,014	0,186	0,483
F	0,120	3,374	0,101	1,605	6,549
Pr > F	0,739	0,109	0,760	0,246	0,038

La figure (IV.14), ci-dessous, représente les variations de l'activité protéase (Pase) relevées chez l'espèce *Perna* durant le cycle de décontamination.

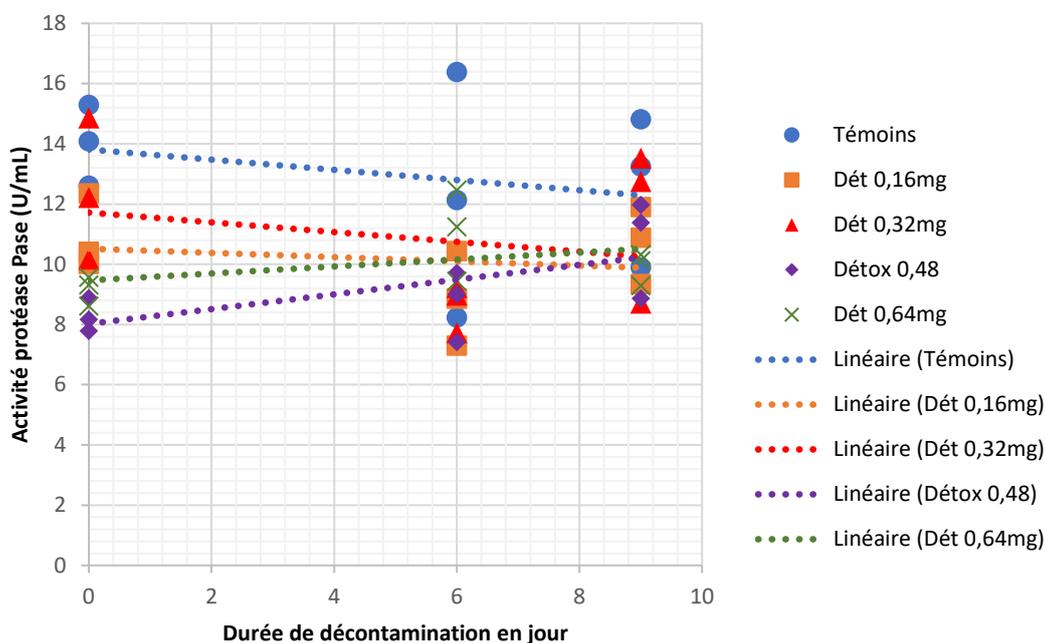


Figure IV.14 : Les variations Pase, mesurées chez les moules *Perna*, durant le cycle de décontamination.

Chez l'espèce *Perna perna*, aucune reprise de l'activité de l'enzyme digestive Pase n'a été observée (figure IV.14) pendant le cycle de décontamination. De plus, la durée de détoxification s'est avérée insuffisante pour détecter des différences significatives entre les groupes détoxifiés (voir tableau ci-dessous).

Tableau IV.22 : Synthèse pour tous les Y (les différents groupes de détox de *Perna*).

	Témoins	Détox 0,16mg	Détox 0,32mg	Détox 0,48	Détox 0,64mg
R²	0,066	0,033	0,067	0,393	0,152
F	0,495	0,236	0,499	4,539	1,257
Pr > F	0,504	0,642	0,503	0,071	0,299

IV.9.1.3/- Résultats des dosages biochimiques des protéines

❖ Cycle de contamination

Les paramètres statistiques du modèle de régression linéaire décrivant l'approximation des variations des teneurs en protéines chez les moules *Perna perna* en réponse à l'effet de la concentration de phénol sont résumés dans les tableaux (IV.23, 24 et 25) ci-dessous. Le modèle d'approximation est formulé comme suit :

Perna perna :

$$\text{Prot}_{(F=6,146 ; p=0,038)} = 43,83_{(p<0,0001)} - 31,788 C_{(p=0,038)}$$

Tableau IV.23 : Analyse de la variance (Prot) chez les moules *Perna*.

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	517,372	517,372	6,146	0,038
Erreur	8	673,454	84,182		
Total corrigé	9	1190,826			

Tableau IV.24 : Paramètres du modèle (Prot) chez la moule *Perna*.

Source	Valeur	Erreur standard	t	Pr > t	Borne inf (95%)	Borne sup (95%)
Constante	43,830	5,025	8,722	< 0,0001	32,241	55,419
C	-31,788	12,823	-2,479	0,038	-61,357	-2,219

Tableau IV.25 : Coefficients normalisés (Prot) chez les moules *Perna*.

Source	Valeur	Erreur standard	t	Pr > t	Borne inf (95%)	Borne sup (95%)
C	-0,659	0,266	-2,479	0,038	-1,272	-0,046

Comme pour la réponse de la protéase, les teneurs en protéines relevées chez l'espèce *Mytilus* n'ont montré aucune corrélation significative avec le gradient de concentration de phénol testé.

En revanche, chez les moules *Perna perna*, un effet de l'exposition au phénol sur les réserves protéiques est observé. Une déplétion des teneurs en protéines est notée après 96 heures d'exposition aux différentes concentrations de phénol. Cette diminution (corrélation : -0,659) est significative ($p < 0,05$) pour toutes les concentrations examinées par rapport au témoin. Il en résulte que l'espèce *Perna perna* est plus sensible à la mobilisation des réserves protéiques après 96 heures d'exposition, comparativement à l'espèce *Mytilus galloprovincialis* (comme ce fut le cas dans les tests d'exposition aux ETM).

Ainsi, la tendance chez l'espèce *Perna perna* est une diminution de la concentration des protéines. Cependant, la qualité d'ajustement des teneurs en protéines avec le gradient de concentration en phénol est médiocre. Bien que la statistique de Durbin-Watson affiche un DW (1,848) proche de 2 (résidus non corrélés), le meilleur modèle obtenu explique au maximum 43,4 % de la variabilité totale de l'approximation étudiée.

❖ **Cycle de décontamination**

Les figures (IV.15 et IV.16) illustrent les variations des teneurs en protéines (Prot), mesurées chez les moules *Mytilus* et *Perna* respectivement, durant le cycle de décontamination. Alors, les tableaux (IV.26 et IV.27) ci-dessous présentent les paramètres statistiques caractérisant la relation entre la durée de détoxification et la variation des teneurs protéiniques, chez les moules *Mytilus* et *Perna* respectivement, pour chaque groupe de détoxification.

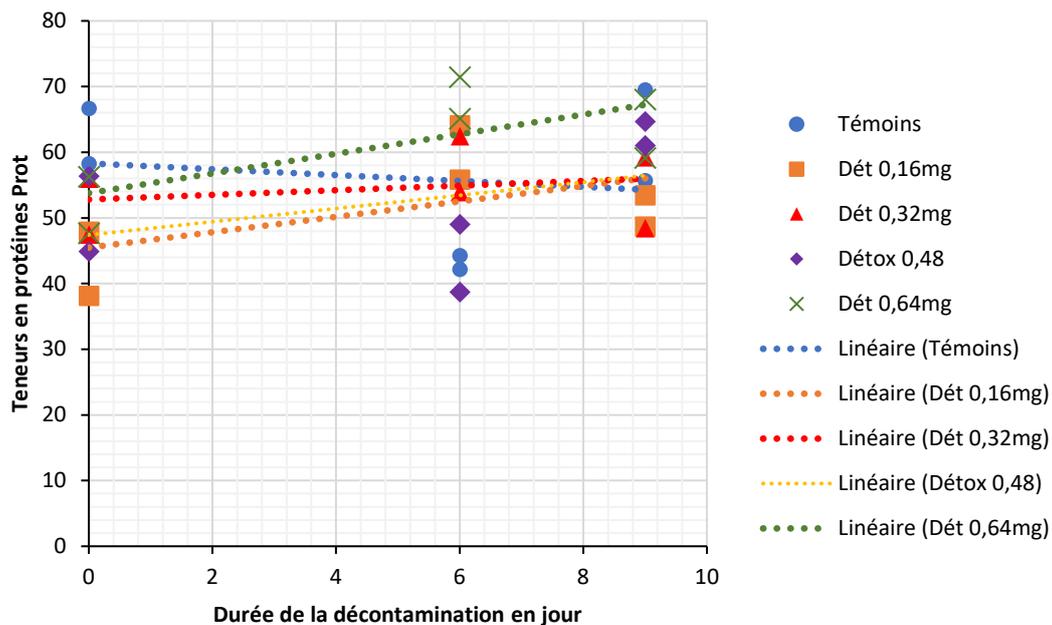


Figure IV.15 : Variations des teneurs en protéines (Prot), mesurées chez les moules *Mytilus*, durant le cycle de décontamination

Tableau IV.26 : Synthèse pour tous les Y (Prot) (les différents groupes de détox de *Mytilus*).

	Témoins	Détox 0,16mg	Détox 0,32mg	Détox 0,48	Détox 0,64mg
R²	0,027	0,302	0,060	0,171	0,495
F	0,109	1,733	0,255	0,826	3,918
Pr > F	0,758	0,258	0,640	0,415	0,119

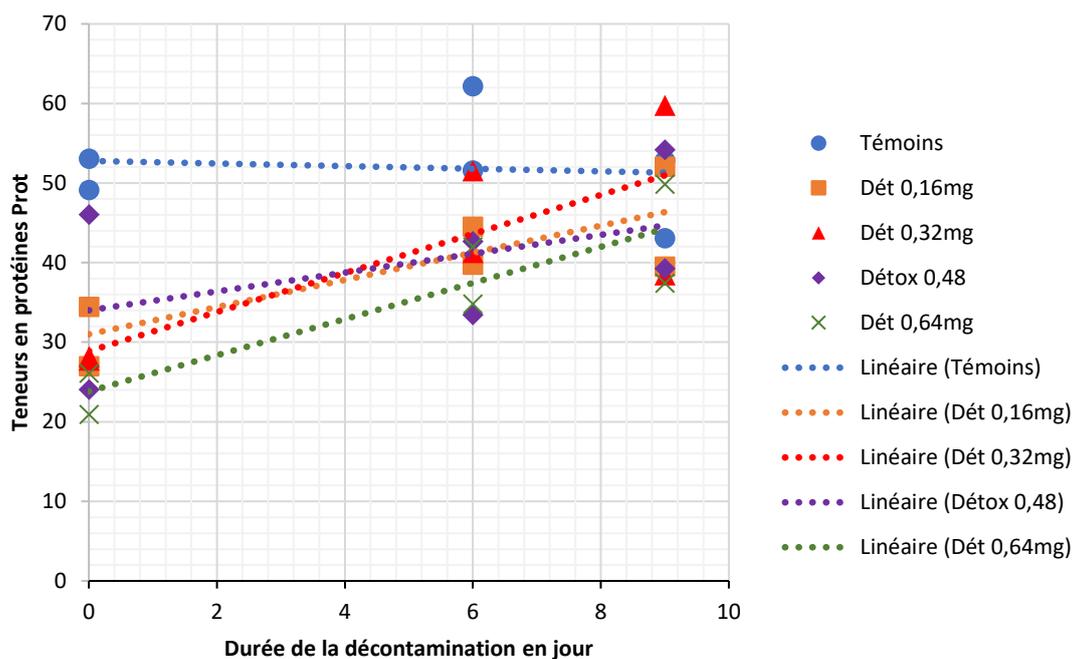


Figure IV.16 : Variations des teneurs en protéines (Prot), mesurées chez les moules *Perna*, durant le cycle de décontamination

Tableau IV.27 : Synthèse pour tous les Y (Prot) (les différents groupes de détox de *Perna*).

	Témoins	Détox 0,16mg	Détox 0,32mg	Détox 0,48	Détox 0,64mg
R²	0,012	0,670	0,625	0,218	0,784
F	0,048	8,113	6,653	1,112	14,548
Pr > F	0,838	0,046	0,061	0,351	0,019

Aucune variation significative (tab IV.26) des teneurs protéiques n'est relevée dans les différents groupes de détoxification chez les moules *Mytilus*.

Par ailleurs, les pertes en protéines observées chez les individus *Perna* après 96 heures d'exposition à différentes concentrations de phénol ont été compensées par des gains plus ou moins significatifs lors de la détoxification des spécimens de moules. L'analyse de la variance (Tab IV.27) montre une statistique de Fisher non significative ($F=1,112$, $p=0,351$) pour le groupe de détoxification à 0,48 mg/L, tandis que des résultats significatifs sont observés pour les trois autres groupes de détoxification : 0,16mg/L ($F=8,113$, $p=0,046$), 0,32mg/L ($F=6,653$, $p=0,061$) et 0,64mg/L ($F=14,548$, $p=0,019$). Ainsi, la tendance générale indique une reprise des teneurs en protéines pour atteindre des valeurs comparables à celles des témoins.

❖ Discussion :

Les modes d'action des polluants organiques se classent en six catégories : (1) Narcotiques non-polaires, (2) Phénols narcotiques polaires, (3) Électrophiles mous, (4) Acides faibles découpleurs de la respiration, (5) Proélectrophiles, et (6) Anilines narcotiques polaires [378].

La narcose est un processus non spécifique et non réactif impliquant l'accumulation de molécules xénobiotiques dans les membranes cellulaires, perturbant leur fonction. Cette perturbation peut entraîner la rupture de l'enveloppe cellulaire ou le dysfonctionnement des protéines membranaires essentielles [379].

La toxicité par ce mécanisme est principalement déterminée par l'hydrophobie des molécules, évaluée à l'aide de coefficients de partage comme le logP (coefficient de partage octanol-eau) ou des coefficients de partage membrane-eau. La solubilité aqueuse, corrélée au logP, peut aussi être utilisée [380].

Les polluants organiques, une fois au niveau cellulaire, sont connus pour provoquer un stress oxydatif [381-383]. De nombreux xénobiotiques, tels que les hydrocarbures, les phénols, les quinones et certains pesticides, exercent leurs effets délétères par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme le peroxyde d'hydrogène et les radicaux superoxydes, qui réagissent avec les biomolécules [384-386].

Ainsi, comme première supposition, le phénol, en tant que narcotique polaire, pénètre la barrière cellulaire et provoque un stress oxydatif chez les moules étudiées dans ce travail. Les niveaux de la catalase observés, en réponse aux différentes concentrations, peuvent être attribués à l'accumulation de H₂O₂ au niveau cellulaire. Les corrélations entre l'activité de la catalase et le gradient de concentration confirment un excès de production de peroxyde d'hydrogène, potentiellement toxique pour les organismes et précurseur d'autres ROS [381, 387].

Dans la membrane interne de la mitochondrie, les complexes respiratoires (I, II, III, IV) ainsi que des complexes mobiles tels que l'ubiquinone Q et le cytochrome C facilitent le transfert des électrons.

Lorsque des éléments métalliques perturbent cette chaîne de transport, les électrons sont délocalisés et captés par l'oxygène, formant des anions superoxydes et déclenchant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (voir partie test ETM). Les molécules organiques à cycle benzénique, comme les diols et les quinones, exploitent également ce cycle redox.

Les diols sont oxydés en quinones via une semi-quinone, un radical générateur de stress oxydant, cette réaction est catalysée par la superoxyde dismutase et inversée par l'enzyme NADPH-CYP450 réductase. Ces composés peuvent donc être interconvertis cycliquement entre hydroquinone, semi-quinone et quinone, générant des anions superoxydes et épuisant les stocks de NAD(P)H à chaque cycle [379, 388].

Le phénol, facilement oxydé en quinone, perturbe la chaîne de transport des électrons, entraînant un stress oxydatif inévitable, particulièrement la surproduction de H₂O₂ [389]. La dysfonction mitochondriale en résulte, car le H₂O₂ réagit avec le fer libre Fe²⁺ via la réaction de Fenton pour produire des radicaux hydroxyles très réactifs. Ces radicaux peuvent initier une oxydation des chaînes phospholipidiques polyinsaturées, conduisant à la peroxydation lipidique des membranes biologiques, entraînant des troubles fonctionnels et structurels [386, 390-393].

La catalase, par son rôle catalytique, assure la dismutation du peroxyde d'hydrogène (réduction de H₂O₂ en utilisant une autre molécule de H₂O₂ comme donneur d'électrons). Cette enzyme peut également agir comme peroxydase, utilisant d'autres molécules telles que les alcools, les phénols, les acides ou les formaldéhydes comme donneurs d'électrons [382, 383].

Pour neutraliser l'excès de H₂O₂ et/ou détoxifier le phénol utilisé comme substrat, la catalase augmente ses niveaux d'induction. Chez les organismes aquatiques, l'augmentation des niveaux des enzymes de défense antioxydante, comme la catalase, aide à se protéger des dommages oxydatifs en cas d'exposition aux polluants organiques [179, 243, 383].

Les réponses de la catalase (CAT) chez les deux espèces de moules étudiées, sous l'effet du phénol, varient en fonction de l'espèce et de la concentration. *Perna perna* montre une sensibilité accrue au phénol par rapport à *Mytilus galloprovincialis*, comme c'était le cas avec les éléments métalliques (Pb et Cd).

Par ailleurs, les modèles de régression de la CAT indiquent des différences physiologiques entre les deux espèces. *Mytilus* présente des réponses CAT continues avec une corrélation positive, sans déclin d'activité, suggérant une stratégie d'adaptation au stress du phénol. En revanche, *Perna* montre des taux d'induction plus élevés et un effet quadratique négatif de la concentration, indiquant une adaptation compromise.

La sensibilité de *Perna* est également visible dans la diminution significative des activités de la protéase et des teneurs en protéines. Chez *Mytilus*, les effets du phénol sur les activités des protéases et les teneurs en protéines ne sont pas significatifs. Cela pourrait être dû au fait que *Mytilus* maintient son activité digestive pour répondre aux besoins énergétiques accrus nécessaires pour contrer le stress. Cela suggère une possible adaptation physiologique, car un organisme doit dépenser plus d'énergie pour lutter contre le stress et maintenir son homéostasie interne.

L'exposition au phénol et à ses dérivés peut induire la production de ROS et causer des dommages oxydatifs aux tissus et cellules [394]. Elle peut également entraver les processus métaboliques tels que la glycolyse, limitant ainsi l'approvisionnement énergétique [395, 396]. Par exemple, l'exposition des moules *Lithophaga lithophaga* à différentes concentrations de bisphénol A (BPA) (0,25 à 5µg/L pendant 4 semaines) a entraîné une augmentation des fréquences de fermeture des valves [386]. La chémosensibilité aux polluants conduit à une fermeture prolongée des valves pour réduire la diffusion des contaminants [386, 397-399].

Les bivalves filtreurs maximisent leur rendement énergétique en augmentant la filtration pour capturer plus de nourriture, essentielle pour la digestion et la production d'énergie [400, 401]. En cas de stress tolérable, les organismes augmentent leur digestion pour répondre aux besoins énergétiques accrus de la défense. Cependant, chez les moules *Perna* de la présente étude, un déclin de la digestion implique un déficit énergétique, nécessitant la mobilisation des réserves de l'organisme. En cas de stress sévère, la mobilisation des protéines indique une incapacité à compenser le manque d'énergie, compromettant ainsi la santé de l'organisme. Si cette situation persiste, elle peut mener à la mort de l'organisme. Toutefois, l'exposition au phénol pendant 96 heures n'a entraîné aucune mortalité chez les deux espèces de moules *Perna* et *Mytilus*.

En revanche, différentes études ont rapporté une diminution des niveaux de protéines après exposition à divers polluants tels que les hydrocarbures et les métaux, suggérant un impact direct sur leur synthèse et leur dégradation [402-404].

Se référant aux séries de tests d'écotoxicité par les ETM (Cu, Pb et Cd), la moule *Mytilus* se révèle cette fois aussi plus résistante que la moule *Perna*. Ainsi, il est fort probable que l'adaptation physiologique des deux espèces ne soit pas la même.

Par ailleurs, la détoxification a montré des profils différents entre les deux espèces de moules. Après 6 jours, les moules *Mytilus* détoxifiées de la concentration 0,32mg/L de phénol, ont pu retrouver leur homéostasie. Ce groupe a maintenu sa stabilité métabolique pendant 3 jours supplémentaires, indiquant que la concentration de 0,32 mg/L de phénol est faiblement toxique et que la période de décontamination est suffisante pour permettre aux mécanismes de détoxification et d'élimination du toxique de fonctionner efficacement. Ainsi, il semble que cette concentration de phénol n'ait pas atteint les constituants cellulaires pour causer des dommages avancés, notamment à l'ADN et aux protéines. De plus, la génération accélérée de ROS induite par le phénol semble être efficacement maîtrisée par les mécanismes de défense antioxydants, en particulier la catalase, qui joue un rôle clé contre l'excès de peroxyde d'hydrogène.

En revanche, l'efficacité de la détoxification à la concentration de 0,64mg/L de phénol est plus difficile à conclure vu les activités élevées de la CAT relevées au 6^{ème} jour de décontamination. Cela peut indiquer une exposition antérieure au contaminant, mais il est également possible que les dommages causés par une telle concentration soient déjà avancés. L'accumulation de phénol au niveau cellulaire pourrait déclencher un cycle redox nécessitant plus de temps pour neutraliser les ROS. La détoxification pourrait impliquer d'autres mécanismes actifs pour réduire la toxicité des xénobiotiques.

Ainsi, la biotransformation des xénobiotiques organiques lipophiles dans les organes implique la conversion en métabolites hydrosolubles (phase I) et leur conjugaison (phase II) pour favoriser leur élimination [383].

Cette transformation métabolique vise à rendre les molécules exogènes plus facilement excrétées [405], par exemple par l'oxydation du glutathion (GSH) en glutathion oxydé (GSSG), processus qui réduit les xénobiotiques toxiques [406, 407]. Cependant, cette voie est énergivore, consommant notamment du cofacteur NADPH par l'action de la glutathion peroxydase pour réduire les peroxydes [408].

La diminution marquée des niveaux de la catalase (CAT) observée au 9^{ème} jour de détoxification introduit une ambiguïté dans l'interprétation des résultats. Il reste incertain s'il s'agit d'un retour vers l'homéostasie ou d'un déclin d'activité. Des dommages cellulaires avancés, tels que la destruction de l'ADN, les perturbations métaboliques, la désactivation enzymatique, et les altérations membranaires comme la lipoperoxydation, peuvent rendre les moules incapables de surmonter le stress et de réparer les dommages.

Pour mieux comprendre nos observations, nous avons étudié l'activité digestive des moules à travers l'enzyme protéase ainsi que leurs réserves, exprimées principalement par les teneurs en protéines chez les bivalves. Ainsi, bien que le phénol n'ait montré aucun effet significatif ($p < 0,05$) sur les activités protéase des moules *Mytilus* pendant la contamination, nous n'avons observé aucune différence significative ($p < 0,05$) dans la variation d'activité protéase pendant la décontamination pour les trois premiers groupes exposés aux concentrations de 0,16 0,32 et 0,48 mg/L.

En revanche, une légère mais significative augmentation de l'activité protéase a été notée chez les individus détoxifiés de la concentration de 0,64mg/L, avec un modèle linéaire satisfaisant ($F=6,549$; $p=0,038$). Cette augmentation pourrait refléter un besoin accru en énergie, en lien avec le système de défense caractérisé par l'augmentation de l'activité de la catalase (CAT). Les teneurs en protéines sont restées stables, et aucune différence significative n'a été observée entre les groupes. Le métabolisme est un processus continu d'échanges de substances et d'énergie, et une approche métabolomique pourrait nous éclairer sur les fonctions spécifiquement affectées par les polluants, comme souligné par [381].

Basé sur les résultats précédemment discutés, il semble probable que les moules détoxifiées à la concentration de 0,64mg/L ont retrouvé leur état de santé avec un retour vers l'homéostasie.

L'intégration des réponses biologiques mesurées chez les moules *Mytilus* dans cette étude, combinée à l'examen des modèles d'approximation, révèle une pertinence cruciale pour améliorer la compréhension des effets du xénobiotique phénol.

Par ailleurs, la durée de décontamination de 9 jours s'avère insuffisante pour que les moules de l'espèce *Perna*, quel que soit le groupe de détoxification, retrouvent leur état de santé initial et/ou comparable à celui des témoins. Aucune diminution significative de l'activité de l'enzyme antioxydante n'a été observée, même chez le groupe détoxifié à la concentration la plus faible de 0,16mg/L. Cela suggère que l'enzyme antioxydante est incapable de neutraliser le surplus de H₂O₂ même en l'absence de l'exposition au xénobiotique. Les dommages subis pendant le cycle de contamination sont probablement sévères, nécessitant ainsi une quantité accrue d'énergie pour leur réparation. Ce déficit énergétique peut être estimé en évaluant les réponses de l'enzyme digestive protéase, qui n'a montré aucune amélioration dans l'ensemble des groupes de détoxification même à la fin du cycle de détox de 9 jours.

Il est important de noter que les mécanismes de détoxification utilisent des ressources de l'organisme, qui ne sont pas infinies. En cas d'exposition à une dose trop élevée ou à une exposition chronique ou prolongée, ces ressources peuvent s'épuiser ou ne pas se renouveler rapidement, rendant la détoxification inefficace. Ainsi, la survie des spécimens *Perna* reste compromise en raison de leur balance énergétique. Les taux continus d'induction de la catalase indiquent une incapacité à retrouver l'homéostasie, notamment chez les moules détoxifiées de la concentration 0,64mg/L de phénol, où l'activité antioxydante est presque nulle.

Chez les moules *Mytilus* prélevées de sites contaminés, des activités significativement faibles de CAT, SOD et GR ont été rapportées, interprétées comme un signe d'incapacité des défenses antioxydantes à éliminer les ROS, indiquant une hypersensibilité au stress oxydatif [409-411].

Par ailleurs, le phénol est connu pour découpler la phosphorylation oxydative en transportant des protons, perturbant ainsi le système enzymatique de la membrane interne de la mitochondrie. Ce mécanisme s'attaque au gradient de protons créé par les complexes de la chaîne de transport d'électrons, essentiel au fonctionnement de l'ATP-synthase [379]. L'ATP-synthase catalyse la formation d'ATP à partir d'ADP et de phosphate, en utilisant le gradient de protons. L'ATP, riche en énergie, est nécessaire à de nombreux processus enzymatiques dans l'organisme [412]. Si la production d'ATP est arrêtée, l'organisme ne peut plus survivre. La chaîne de transport d'électrons, qui convertit l'oxygène moléculaire en eau, est couplée à la synthèse d'ATP, rendant la production d'ATP dépendante de ce gradient de protons [413]. En supprimant ce gradient, la synthèse d'ATP est stoppée. Le processus continue alors de pomper des protons hors de la matrice interne sans produire d'ATP, privant ainsi l'organisme de l'énergie nécessaire pour ses mécanismes de défense, compromettant ainsi sa survie.

La catalase (CAT) étant faiblement consommatrice d'énergie et ne nécessitant pas de cofacteur, son inhibition ou inactivation est préoccupante. Ainsi, si l'énergie disponible n'est pas suffisante pour activer la catalase, la survie des organismes est sans doute compromise. Ce résultat aurait pu être confirmé en prolongeant la durée de détoxification. Malheureusement, le nombre d'individus restants n'était pas suffisant pour continuer la détoxification tout en garantissant un minimum de 50% de la population initiale, nécessaire pour assurer la significativité du test selon le protocole établi.

Au contraire, les teneurs en protéines ont montré des gains plus ou moins significatifs et comparables à celles des témoins. Cette significativité est également observée avec l'augmentation de la durée de décontamination. Aussi, les approximations linéaires (Prot) ont montré des qualités d'ajustement des modèles acceptables avec une statistique de Fisher significative. Il est donc difficile de tirer une conclusion définitive sur les gains rattrapées, car il est probable qu'il s'agissait d'un phénomène de lyse cellulaire et de libération de protéines membranaires.

❖ Synthèse

Il est fort probable que les systèmes de détoxification chez les deux espèces soient de stratégies différentes, la génétique jouant probablement un rôle important. Les organismes vivants ont développé une variété de stratégies pour répondre aux changements environnementaux. Les réactions utilisées pour maintenir l'homéostasie cellulaire sous conditions de stress sont souvent comportementales, métaboliques ou physiologiques. En raison de leur immobilité, les organismes sessiles, en particulier, comptent sur la plasticité physiologique, telle que la régulation de l'expression génique, pour s'adapter aux agressions environnementales et coloniser rapidement des habitats fluctuants [414-417].

Chez les moules, cette plasticité physiologique est cruciale pour leur survie dans des environnements pollués ou changeants. La régulation de l'expression génique permet à ces organismes de modifier rapidement leur profil métabolique et de renforcer leurs mécanismes de défense en réponse à des facteurs de stress tels que les xénobiotiques. Cela peut inclure l'augmentation de l'expression des enzymes de détoxification, la production de protéines de choc thermique, ou encore l'activation de voies métaboliques alternatives pour gérer le stress oxydatif [334, 418, 419].

Cependant, si le stress ou les facteurs de stress persistent sans qu'une adaptation physiologique adéquate soit possible, des effets sublétaux peuvent apparaître, tels que des perturbations métaboliques, une diminution de la reproduction ou une altération des fonctions cellulaires. Dans les cas extrêmes, cela peut conduire à la mort des organismes. La capacité de chaque espèce à s'adapter à de telles conditions varie en fonction de leur patrimoine génétique, de leur historique d'exposition et de la spécificité de leurs mécanismes de détoxification. Cette variabilité génétique et physiologique explique pourquoi certaines espèces peuvent mieux résister aux polluants que d'autres, malgré des conditions environnementales similaires [420, 421].

IV.9.2/- Résultats du test d'exposition aux colorants

IV.10.2.1/- Résultats du dosage de la catalase

Les graphiques ci-dessous (fig IV.17 ; A et B) montrent les variations de l'activité catalase mesurées chez les moules *Perna perna* sous l'influence des deux colorants, Vert de Malachite (VM) et Rouge Congo (RC), tout au long des cycles de contamination et de décontamination.

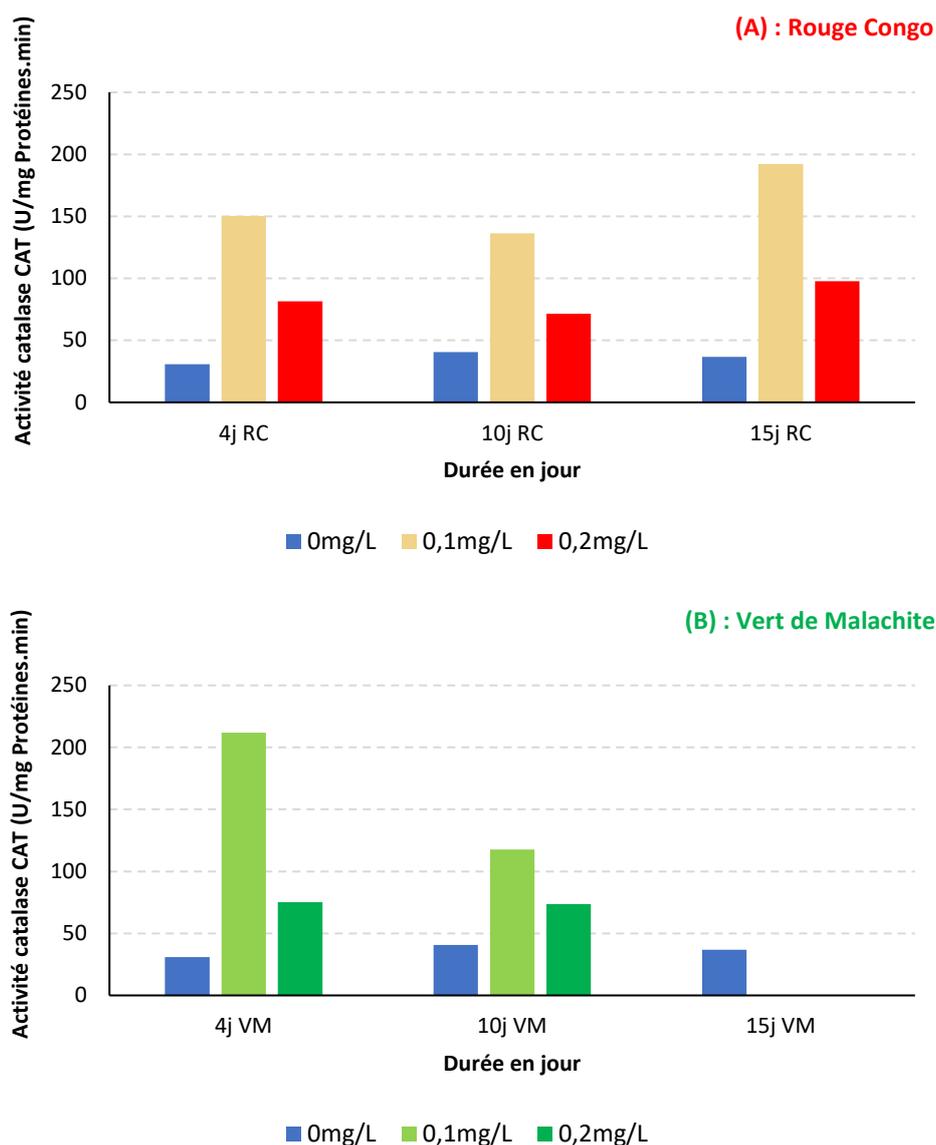


Figure IV.17 : Variation des activités catalase, sous l'effet des colorants RC (A) et VM (B).

❖ Cycle de contamination

D'après la figure, on observe que l'activité CAT présente une courbe en cloche en réponse aux concentrations des deux colorants VM et RC. La concentration C1 (0,1 mg/L) induit une augmentation très significative de l'activité antioxydante par rapport à la concentration C2 (0,2 mg/L). Les différences d'activité CAT, indépendamment de la concentration en xénobiotiques, sont hautement significatives ($p < 0,01$), suggérant un effet inhibiteur à plus forte concentration.

A la concentration de 0,1mg/L, l'activité de la catalase est dépendante du xénobiotique, avec le VM montrant une capacité inductive supérieure à celle du RC. Cependant, les différences d'activité observées à la concentration de 0,2 mg/L ne sont pas significatives ($p > 0,05$).

❖ Cycle de décontamination

Chez les moules détoxifiées du xénobiotique RC, la durée du cycle de décontamination s'est révélée insuffisante pour que les individus *Perna* retrouvent un état d'homéostasie comparable à celui des témoins. Le groupe de moules détoxifiées à la concentration de 0,2mg/L n'a montré aucune diminution de l'activité antioxydante CAT. De même, les taux de CAT relevés durant le cycle de décontamination ne différaient pas ($p > 0,05$) de ceux mesurés à la fin du cycle de contamination (4 jours). En revanche, une augmentation très significative ($p < 0,001$) de l'activité antioxydante a été observée à la fin du cycle (15 jours) chez le groupe détoxifié à la concentration de 0,1mg/L.

Par ailleurs, une baisse très importante de l'activité CAT a été mesurée après 6 jours de décontamination chez les moules précédemment exposées à 0,1mg/L de xénobiotique VM. Toutefois, les taux de CAT relevés chez le groupe détoxifié à la concentration de 0,2mg/L de VM apparaissent inchangés. Comment expliquer la stabilité et la baisse de l'activité CAT au 10^{ème} jour alors qu'une mortalité totale des individus *Perna* est observée au 15^{ème} jour, à la fin du cycle de décontamination ?

IV.9.2.3/- Résultats du traitement global des réponses biochimiques

Le tableau (IV.28), ci-dessous, regroupe les taux d'augmentation des réponses biochimiques chez les moules de groupes de contamination par rapport aux témoins. Il s'agit entre autres de :

- ❖ CAT-VM : réponse de la catalase en cas d'exposition au Vert Malachite ;
- ❖ CAT-RC : réponse de la catalase en cas d'exposition au Rouge Congo ;
- ❖ Pase-VM : réponse de la protéase en cas d'exposition au Vert Malachite ;
- ❖ Pase-RC : réponse de la protéase en cas d'exposition au Rouge Congo ;
- ❖ Prot-VM : teneurs en protéines en cas d'exposition au Vert Malachite ;
- ❖ Prot-RC : teneurs en protéines en cas d'exposition au Rouge Congo.

Tableau IV.28 : Taux d'augmentation des réponses biochimiques.

CAT	4j VM	4j RC	10j VM	10 RC	15j VM	15j RC
Témoins	1	1	1	1	1	1
C1	6,87594256	4,8711866	2,89317676	3,35102556	0	5,23519815
C2	2,43562066	2,64541673	1,81341272	1,75714152	0	2,66165731
Pase	4j VM	4j RC	10j VM	10 RC	15j VM	15j RC
Témoins	1	1	1	1	1	1
C1	1,09170306	0,91830051	0,84764239	0,77187214	0	0,57487535
C2	1,29596293	0,97783174	0,87418789	0,85366097	0	0,76551247
Prot	4j VM	4j RC	10j VM	10 RC	15j VM	15j RC
Témoins	1	1	1	1	1	1
C1	0,88923516	0,91332136	0,76597701	0,60632184	0	0,77315837
C2	0,92478344	0,91923727	1,04247126	0,82701149	0	1,19390672

Du point de vue de la cinétique de réponse (Tab IV.28), la catalase se révèle très sensible au stress causé par l'exposition aux colorants chimiques VM et RC. En revanche, les protéines ne montrent aucune variation significative ($p > 0,05$) de leurs concentrations face à l'effet délétère des xénobiotiques VM et RC. Il en va de même pour l'activité protéase sous l'effet du RC. L'activité digestive, quant à elle, est dépendante de la concentration lors de l'exposition des moules *Perna* au VM, bien que la corrélation soit faiblement significative.

Pour résumer, la sensibilité d'induction de la CAT est observée à la faible concentration de 0,1mg/L, avec une réponse en forme de cloche apparaissant à une concentration de 0,2mg/L. A 0,1mg/L, le VM se révèle être un inducteur plus puissant que le RC. L'augmentation de l'activité digestive devient significativement perceptible à la concentration de 0,2mg/L. L'activité observée sous l'effet du VM est significativement supérieure à celle observée sous l'effet du RC. Néanmoins, les taux protéiques demeurent inchangés, quelle que soit la concentration testée.

❖ Discussion

Au fil des années, les colorants naturels et synthétiques ont été largement utilisés pour colorer divers produits, mais bon nombre d'entre eux pourraient être toxiques et avoir des effets néfastes sur la santé humaine et aquatique. Les colorants synthétiques, en particulier, sont difficiles à éliminer par des processus biologiques naturels, ce qui augmente leur persistance dans l'environnement en raison de leur structure et de leur réactivité chimique [422-424].

Les deux colorants testés dans cette étude sont de types différents. Bien que les mêmes concentrations aient été utilisées, les réponses biologiques mesurées chez la même espèce de moules, *Perna perna*, varient. Les données sur la toxicité des colorants chimiques pour le biote sont relativement rares [423], à l'exception de celles concernant les poissons, notamment le vert de malachite, utilisé comme fongicide en aquaculture (actuellement interdit).

Comparativement aux concentrations d'exposition rapportées, nous avons choisi deux concentrations inférieures aux seuils létaux pour les moules. Effectivement, aucune mortalité n'a été observée pendant les 96 heures de contamination. Cependant, les réponses de la catalase (CAT) suggèrent un effet inhibiteur pour des durées d'exposition plus longues, avec une forme en cloche suspectée d'inactivation de l'enzyme antioxydante CAT.

En raison de sa nature, nous nous attendions à ce que le RC soit plus toxique que le VM. Pourtant, les taux d'induction de la CAT sous l'effet du RC, quelle que soit la concentration, étaient significativement inférieurs à ceux observés lors de l'exposition au VM.

Le Rouge Congo est un colorant azoïque, de moins en moins utilisé dans l'industrie textile en raison de sa toxicité. Les risques toxicologiques des colorants synthétiques pour la santé humaine dépendent du mode et du temps d'exposition, comme l'ingestion, la sensibilisation cutanée et respiratoire. Les colorants azo-aromatiques sont particulièrement préoccupants en raison de leur dangerosité et de leur production massive. Les hydrazines, en se métabolisant, génèrent des radicaux libres et des composés réactifs, causant un stress oxydatif et des dommages à l'ADN [379, 423]. Dans cette étude, l'incapacité des moules *Perna* à regagner l'homéostasie est probablement attribuée à des dommages tissulaires avancés, entravant leurs fonctions physiologiques essentielles. Bien que les résultats sur la protéase et les protéines soient difficiles à interpréter, les inductions continues de la CAT pendant la décontamination indiquent un état de stress avancé.

Le vert de malachite, un composé de la famille des triarylméthanes, est utilisé comme désinfectant médical, agent antiparasitaire, et colorant dans les industries du textile, de la confiserie, du papier et de l'acrylique. Il est également efficace pour traiter et prévenir diverses maladies chez les poissons. Cependant, en raison de sa toxicité, l'OMS a recommandé son interdiction en aquaculture à la fin des années 2000 [425-427].

En raison de sa structure iminium, le vert de malachite (VM) peut agir comme accepteur et donneur d'électrons, ce qui conduit à la formation d'espèces radicalaires oxygénées pouvant affecter certains processus cellulaires, tels que la respiration mitochondriale [428]. En tant que colorant triarylméthane électrophile, le VM peut former des adduits avec le glutathion (GSH), les protéines et les nucléophiles liés aux protéines, ce qui peut entraîner l'inhibition de l'activité enzymatique [429, 430].

Des études histologiques ont révélé des effets néfastes sur le foie, les branchies, l'intestin, les gonades et l'hypophyse des animaux exposés au vert de malachite. Ces effets sont particulièrement préoccupants compte tenu de l'accumulation du vert de malachite dans les tissus et de la persistance encore plus longue de sa forme réduite, le leucomalachite (LVM), qui a des effets similaires au composé d'origine [425, 431, 432].

Jiang *et al.*, [433] ont montré une absorption rapide du vert de malachite et une élimination lente du leucomalachite, avec des concentrations maximales de vert de malachite atteintes dans les branchies de trois espèces de poissons d'eau douce (*Parabramis pekinensis*, *Carassius auratus*, *Ophiocephalus argus*) pendant les 20 premières minutes d'exposition (6mg/L de VM).

Ainsi, la détoxification du colorant semble inefficace, compromettant la survie des individus *Perna* dans cette étude. La mortalité des moules observée au 15^{ème} jour du cycle expérimental confirme l'inefficacité de leur système de détoxification. De plus, elle met en évidence l'incapacité de leur système de défense antioxydant (CAT), avec une inhibition de l'enzyme et une baisse considérable de l'activité antioxydante dès le 10^{ème} jour.

La toxicité des colorants alimentaires, comme le Jaune Sunset (SNY) et le curcumine (QY), est mieux documentée, notamment par des tests *in vitro*. Ces colorants peuvent former des complexes stables avec les sites actifs des enzymes comme la catalase, provoquant des altérations conformationnelles et une inhibition significative de l'activité catalytique via un mécanisme non compétitif. L'interaction de SNY avec divers récepteurs entraîne une toxicité et une cancérogénicité par la formation de radicaux libres [422].

Quelle que soit la nature d'un colorant, son utilisation soulève des questions quant à sa toxicité, notamment pour les biotes du milieu récepteur des eaux usées industrielles chargées en colorants [423, 434]. Malgré leur interdiction, des colorants comme le vert de malachite continuent d'être utilisés en raison de leur large spectre d'efficacité pour traiter les infections fongiques et parasitaires chez les poissons et protéger les œufs en incubation contre les champignons.

IV.10/- Résultats de l'étude de l'effet des effluents réels sur les réponses biologiques des espèces sentinelles : Cas d'un rejet industriel, d'effluent portuaire et d'un rejet d'une station de dessalement

IV.10.1/- Caractérisation des eaux de rejet industriel

Les résultats de l'analyse des principaux paramètres de pollution de l'effluent industriel sont présentés dans le tableau (IV.29).

Tableau IV.29 : Paramètres physicochimiques de l'effluent industriel.

JORA: Journal Officiel de la République Algérienne.

Paramètres	Unités	Normes d'analyses	Résultats	Normes JORA2006
Température	°C	Multi paramètres	23,7	<30
pH	/		6,89	5,5 – 8,5
Conductivité électrique	ms/cm		2,06	/
MES	mg/L	ISO 11923 : 1997	5150	35
Azote kjeldahl		ISO 5663 : 1984	59,5	30
Phosphore total		ISO 6878 : 2004	3,35	10
Ortho phosphates			< 0,05	/
DCO		ISO 6060 : 1989	5250	120
DBO ₅		ISO 5815-1 : 2003	525	35
Chlorures		Rodier	390	/
Ammonium			3,5	/
Nitrates		ISO 7890-11 :1986	9,75	/
Aluminium		ISO 12020 : 1997	18	3
Cadmium		ISO 8288 : 1986	< 0,03	0,2
Chrome		ISO 9174 : 1998	< 0,2	0,5
Cobalt		ISO 8288 : 1986	< 0,2	/
Cuivre		ISO 8288 : 1986	0,4	0,5
Fer		FD T90-112	8,1	3
Mercure		µg/L	ISO 5666 : 1999	2,615
Nickel	mg/L	ISO 8288 : 1986	< 0,2	0,5
Plomb		ISO 8288 : 1986	< 0,2	0,5
Zinc		ISO 8288 : 1986	0,95	3
Sulfates		Rodier	170	/

Globalement, les valeurs inscrites dans ce tableau (IV.29) dépassent largement les limites fixées pour le rejet d'effluents liquides industriels selon la norme algérienne (JORA, 2006). De plus, certains paramètres excèdent même les valeurs limites maximales (JORA, 2009) pour les substances nocives contenues dans les eaux usées non domestiques lors de leur déversement dans un réseau public d'assainissement ou dans une station d'épuration.

Ainsi, les valeurs de MES et de la DCO dépassent respectivement huit fois et cinq fois les normes algériennes pour les rejets liquides non traités (JORA 2009). De plus, l'eau de rejet industriel est très riche en sels dissous (Conductivité > 2 selon : [435]), avec des concentrations élevées en chlorures (390mg/L) et en certains éléments métalliques tels que le fer (8,1mg/L), l'aluminium (18mg/L), et surtout le mercure (4,23 mg/L). Ce dernier, en particulier, ne peut être éliminé par les organismes vivants, ce qui entraîne une bioaccumulation tout au long de la chaîne alimentaire, avec des effets néfastes notables comme la neurotoxicité, l'immunotoxicité, le stress et les dommages oxydatifs, la modification du comportement, l'inhibition de la croissance et l'altération de la reproduction [436, 437]. Ces valeurs sont très préoccupantes en considérant l'impact direct à court et à long terme sur le milieu récepteur. De plus, l'effluent industriel est très difficilement biodégradable, comme en témoigne le rapport DCO/DBO5 de 10. La présence de substances toxiques dans les rejets inhibe le développement de certains organismes aquatiques ou provoque leur mortalité [438].

Un excès de MES dans un milieu aquatique naturel (lagune, cours d'eau, estuaire, etc.) peut entraîner deux types d'effets néfastes. D'abord, sur le plan physique, il peut former un écran qui bloque la pénétration de la lumière, réduisant ainsi la photosynthèse et ayant des conséquences tout au long de la chaîne alimentaire. Il peut également obstruer les branchies des poissons. Ensuite, sur le plan chimique, la sédimentation des MES peut créer une réserve potentielle de polluants [439, 440]. Bien que l'envasement ne pose pas de problème immédiat en raison de la grande capacité d'absorption de la mer, la diminution de la transparence et la forte turbidité de l'eau, visibles de très loin, indiquent une pollution manifeste qui compromet la vie animale et végétale de certaines espèces [441].

Les valeurs des autres paramètres consignées dans le tableau (IV.29) sont proches ou dans l'intervalle normatif des rejets. Cependant, le rejet étudié est déversé directement en mer. Compte tenu du débit continu du rejet liquide, les teneurs en substances nocives vont certainement contribuer à l'enrichissement des milieux récepteurs. Par exemple, 30mg/L d'azote Kjeldahl peuvent potentiellement produire environ 130mg/L de nitrates dans l'eau [441].

Selon Yadav *et al.*, [435], la présence d'odeur et de couleur, observée dans le rejet liquide de la présente étude, est due à la présence d'ammonium (3,5mg/L, soit bien au-delà des 0,5mg/L des normes OMS) et d'éléments de transition et/ou de leurs complexes respectifs. Ils attribuent également la toxicité de l'effluent de l'industrie des fertilisants (Fertilizer industry effluent) sur le poisson *Channa striatus* à l'impact de certains éléments métalliques et de l'ammonium présents dans le rejet.

Bien que les teneurs en éléments métalliques (Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb et Zn) dans le rejet de cette étude soient inférieures à la limite de détection ou à la norme, il subsiste un risque de pollution permanente de l'environnement avec des conséquences écologiques graves. Nous avons observé une mortalité accrue de l'oursin *Paracentrotus lividus* à une certaine distance du point de déversement de l'effluent liquide. L'atteinte de cet élément crucial de la chaîne trophique indique clairement une perturbation de la biodiversité du milieu récepteur.

Les substances nocives présentes dans les rejets industriels, notamment les éléments traces métalliques (ETM), sont généralement libérées dans le milieu aquatique sous forme biodisponible, donc bioassimilable par la faune et la flore [59, 442-444]. La présence des ETM dans le compartiment aquatique peut avoir un effet toxique (délétère) sur les premiers stades de développement embryonnaire de plusieurs espèces marines. Nadella *et al.*, [445] ont démontré un effet très toxique de certains métaux dissous sur les embryons de *Mytilus trossolus*, classant la toxicité des métaux dissous comme suit : Cu > Zn > Ni > Cd. Roccheri *et al.*, [446] ont montré que même après un cycle de décontamination, suite à l'exposition des embryons d'oursin *Paracentrotus lividus* au cadmium, les protéines de stress continuaient à être synthétisées, concluant à l'irréversibilité des mécanismes de stress. Boukadida *et al.*, [447] ont constaté que l'hyper sensibilité du stade embryo-larvaire de la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis*, à la pollution par les métaux traces (Cu, Ag et leurs mélanges) en combinaison avec l'augmentation de la température, conduira probablement à une dégradation de la reproduction de *Mytilus galloprovincialis* en mer Méditerranée en raison du réchauffement climatique. Coppola *et al.*, [448] ont confirmé le risque accru de l'effet combiné de l'arsenic et de la température sur la moule *Mytilus galloprovincialis*.

En outre, des atteintes négatives sur le système immunitaire, avec des effets histopathologiques et sur la fertilisation (par exemple, embryons tardifs de *Pluteus* irrégulier) de plusieurs espèces aquatiques, sont décrites sous l'effet des ETM et autres polluants chimiques, activant divers mécanismes de stress et de défense, notamment la synthèse de HSP et l'apparition de l'apoptose et/ou de l'autophagie. Ces effets se conjuguent avec l'élévation de la température [1, 2, 27, 459-451].

IV.10.2/- Evolution de l'activité CAT durant le cycle de contamination

Les résultats relatifs au dosage de la catalase (CAT) chez les moules (*Mytilus galloprovincialis*) contaminées par le rejet industriel sont représentés par la figure (IV.18) ci-dessous.

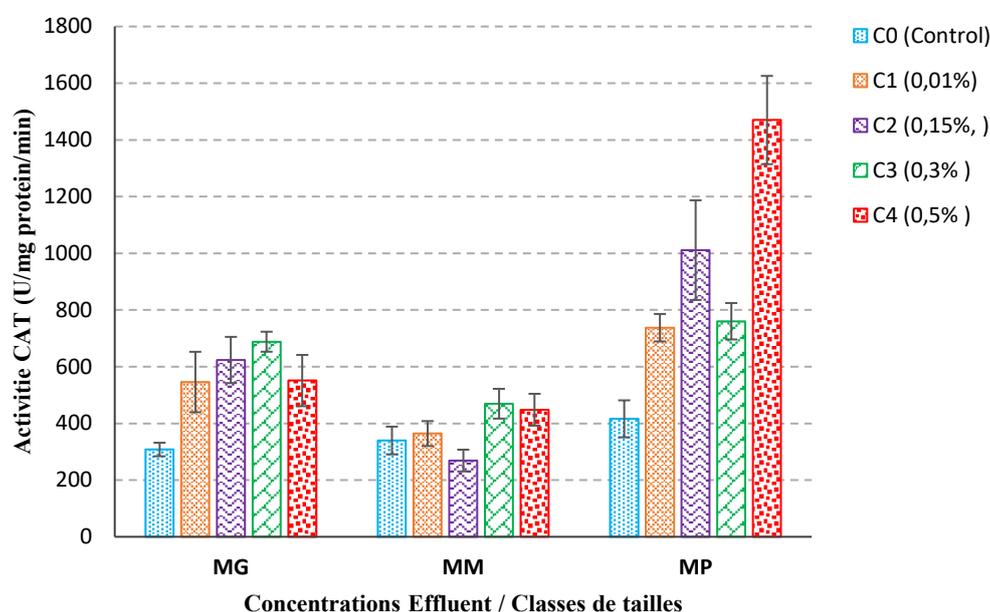


Figure IV.18 : Variation de l'activité catalase chez la moule *Mytilus galloprovincialis* contaminé par les eaux du rejet industriel.

MG: *Mytilus* Grande, **MM:** *Mytilus* Moyenne, **MS:** *Mytilus* Petite.

Pour les moules *Mytilus* de la classe de taille **moyenne**, les analyses statistiques n'ont révélé aucun effet significatif de la contamination par l'effluent industriel sur l'activité de l'enzyme de défense catalase, comparativement aux témoins et au gradient de concentration examiné. Les quatre concentrations de polluant testées n'ont pas montré d'effet notable sur l'induction du mécanisme de défense antioxydant, sans différence significative entre les concentrations.

En revanche, un effet significatif de la contamination par le rejet industriel a été observé chez les moules *Mytilus* de la classe de taille **grande** exposées aux concentrations C2 (0,15%) et C3 (0,3%). Comparativement aux individus témoins (CAT : $307,89 \pm 23,86$ U/mg protéines.min), une augmentation proportionnelle de l'activité catalase a été mesurée chez les spécimens exposés aux xénobiotiques de l'effluent pour les concentrations C1, C2 et C3. Les activités mesurées étaient respectivement de $545,89 \pm 106,65$; $623,71 \pm 81,48$ et $688,09 \pm 35,33$ U/mg protéines min. La concentration C4 (CAT : $551,08 \pm 90,46$ U/mg protéines.min) a montré un effet non significatif et similaire à celui de la concentration C1 sur l'induction de l'enzyme antioxydante catalase.

Chez les moules de la classe de taille **petite**, les individus ont montré une hyperactivité dans l'induction du mécanisme antioxydant, indiquée par l'activité de la catalase (CAT). Par rapport aux témoins, la plus forte induction de la catalase (253,25%) a été mesurée sous l'effet de la concentration C4. La tendance était presque proportionnelle avec les quatre concentrations testées. Il n'y avait aucune différence significative entre la concentration C1 (CAT : $737,59 \pm 4,33$ U/mg protéines.min) et C3 (CAT : $760,33 \pm 64,27$ U/mg protéines.min), tandis qu'un effet très significatif de la concentration était observé comparativement aux témoins ($416,13 \pm 65,25$ U/mg de protéines).

L'étude de l'effet indépendant de chaque concentration sur la réponse CAT chez les trois classes de tailles a révélé des effets significatifs et non significatifs selon le cas considéré. Les valeurs mesurées de l'activité catalase chez les individus témoins (sans contaminant) n'ont montré aucune différence significative entre les trois classes étudiées. Sous l'effet de la concentration C2, la différence statistique est significative quelle que soit la classe de taille étudiée. Comparativement à la classe de petite taille, la différence est toujours significative entre les autres classes de taille. Cependant, l'analyse statistique révèle un effet non significatif entre les classes de taille moyenne et grande sous l'effet des concentrations C1, C3 et C4.

A la lumière des résultats obtenus, l'analyse statistique des effets de la concentration en contaminants et de l'interaction avec la classe de taille a révélé que les moules *Mytilus* de taille **moyenne** (juvéniles) sont les plus **résistantes** à la contamination.

Les individus de grande taille ont montré une sensibilité modérée, tandis que les petites *Mytilus* se sont révélées les plus sensibles à la concentration des contaminants.

La figure (IV.19), ci-dessous, représente les réponses de l'activité enzymatique de la catalase mesurée chez la moule *Perna perna*.

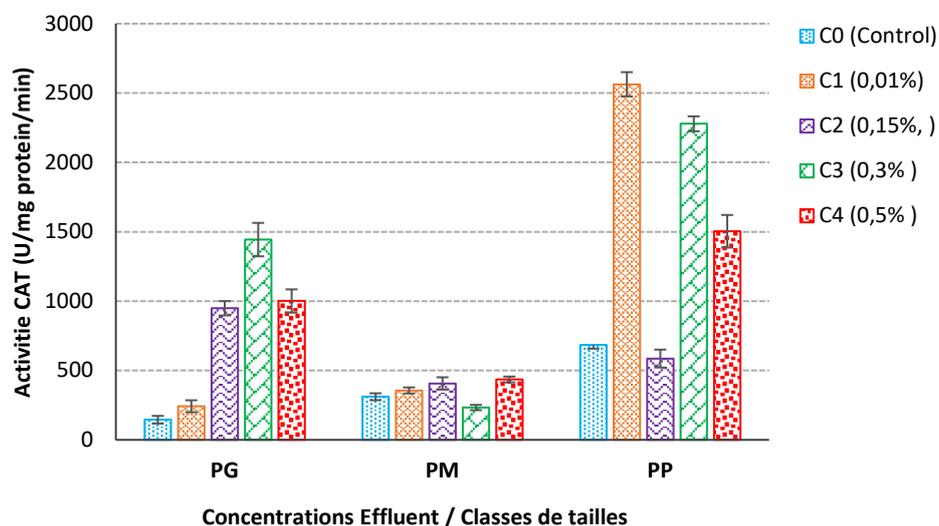


Figure IV.19 : Variation de l'activité catalase chez la moule *Perna perna* contaminé par les eaux du rejet industriel.

PG: *Perna* Grande, **PM:** *Perna* Moyenne, **PP:** *Perna* Petite.

Comme pour l'espèce *Mytilus*, la moule *Perna* de la classe de taille **moyenne** (juvénile) n'a montré aucune sensibilité à la contamination par le mélange de xénobiotiques présents dans l'effluent industriel. Les activités de la catalase (CAT) relevées chez les individus de cette classe de taille, sous l'effet des quatre concentrations, n'ont montré aucune différence ($p > 0,05$) significative de la réponse enzymatique.

Chez les individus *Perna* de la classe de taille **grande**, la concentration C1 n'a eu aucun effet significatif ($p > 0,05$) sur l'induction de l'enzyme antioxydante CAT. Comparativement aux témoins (CAT : $145,24 \pm 27,68$ U/mg protéines.min), les concentrations C2, C3 et C4 ont entraîné une induction importante de l'enzyme CAT, avec un maximum d'activité (893,95%) mesuré sous l'effet de la concentration C3 (CAT : $1443,61 \pm 120,57$ U/mg protéines.min). Les concentrations C2 et C4 ont montré un effet identique sur l'activation de l'enzyme de défense CAT ($984,45 \pm 51,69$ et $1001,07 \pm 83,95$ U/mg protéines.min, soit 553% et 589,26% respectivement).

Les plus importantes inductions de l'activité CAT chez la moule *Perna* ont également été observées chez les spécimens de la classe de taille **petite**. Comparativement aux témoins (CAT : $684,14 \pm 26,60$ U/mg protéines.min), des taux d'induction très significatifs de l'ordre de 274,69%, 233,01% et 119,76% ont été mesurés chez les individus exposés aux concentrations C1, C3 et C4 respectivement. En revanche, l'activité CAT relevée sous l'effet de la concentration C2 ($585,91 \pm 64,54$ U/mg protéines.min) indique une inactivation de l'activité antistress oxydatif, bien que la différence par rapport aux témoins ne soit pas significative. Les mesures reproductibles suggèrent une possible inhibition de l'enzyme. Chez les organismes aquatiques, les enzymes du système antioxydant sont induites ou inhibées par le polluant en fonction de la dose testée, de l'espèce et de la durée d'exposition.

Comparativement à la classe de petite taille (CAT : $684,14 \pm 26,60$ U/mg protéines.min) et en l'absence de contaminants (témoins), des différences significatives ont été observées dans le taux d'activité CAT entre les trois classes de taille étudiées. Cependant, aucune différence significative n'a été relevée entre les classes de taille moyenne et grande.

Les effets des concentrations C3 et C4 sur le taux d'induction de la catalase ont montré des différences significatives, quelle que soit la classe de taille, avec un effet marqué de la concentration C3 chez les petites *Perna*. La concentration C1 a montré la plus forte induction de l'enzyme antistress oxydatif CAT chez les petites *Perna*, mais n'a eu aucun effet significatif chez les classes de taille moyenne et grande. La différence n'étant pas significative entre les espèces ni au sein de la même classe de taille, comparativement aux témoins.

Aucune différence significative de l'effet de la concentration C2 n'a été observée entre les classes de taille petite et moyenne. Cependant, la différence de l'effet de cette même concentration est très significative entre les *Perna* petites/grandes et *Perna* moyennes/grandes.

Sur la base de ces résultats, la moule *Perna* de taille moyenne se montre la plus résistante à la contamination par le rejet industriel. La classe de taille grande a révélé une sensibilité modérée aux xénobiotiques de l'effluent.

L'hyperactivité du mécanisme de défense antistress oxydatif est encore marquée chez les moules *Perna* de petite taille.

IV.10.3/- Evolution de la CAT durant le cycle de décontamination

Les figures (IV.20 et IV.21) illustrent les activités de la catalase à la fin du cycle de décontamination chez les groupes témoins et ceux préalablement contaminés par les concentrations C3 et C4 des espèces *Mytilus* et *Perna* respectivement. Les activités de la catalase relevées à la fin du cycle de contamination (C3 et C4) sont incluses dans le graphique à des fins de comparaison afin d'étudier la réversibilité du mécanisme antistress oxydatif et la possibilité de restaurer l'état de santé de l'espèce sentinelle.

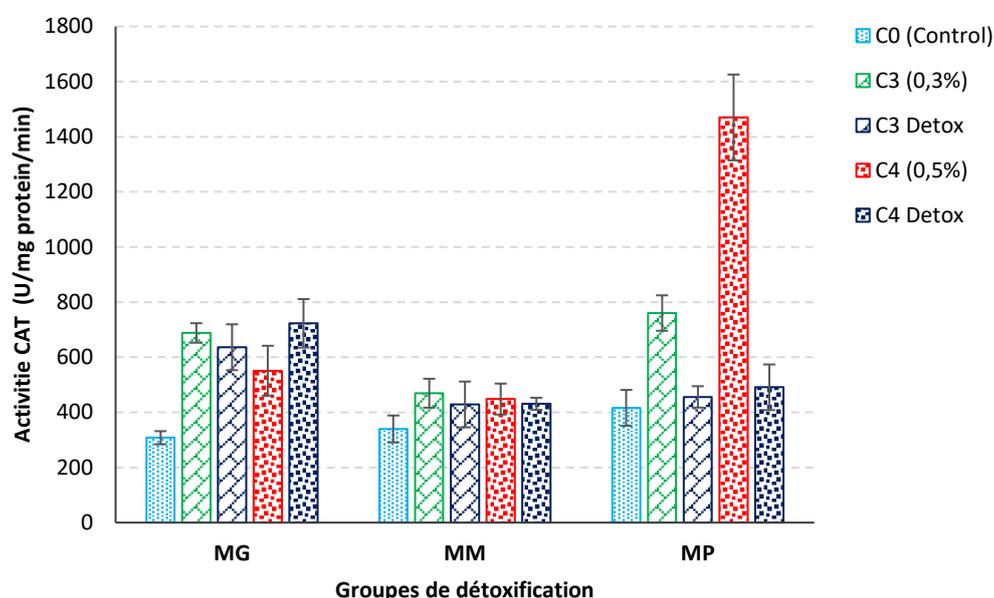


Figure IV.20 : Variation de l'activité catalase chez les moules *Mytilus* après le cycle de décontamination.

Chez les moules *Mytilus* de la classe de taille **moyenne**, la contamination n'a montré aucun effet notable sur l'augmentation de l'activité antioxydante de la catalase. Après détoxification, une légère diminution de 8.68% (C3Détox) et 3.85% (C4Détox) des activités de la catalase a été observée, ramenant les niveaux d'activité proches de ceux des témoins. L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative entre les activités mesurées.

Pour les moules *Mytilus* de la classe de taille **grande**, après détoxification, une diminution non significative de 7.53% de l'activité catalase a été observée chez ceux précédemment exposés à la concentration C3, sans différence significative par rapport au groupe témoin. Cependant, une augmentation significative de 31% de l'activité catalase a été mesurée chez les moules de grande taille exposées à la concentration C4, comparativement aux témoins.

Il semble que la détoxification ait un effet curatif chez les moules précédemment exposées à la concentration C3, indiquant une réversibilité du mécanisme antioxydant. Cependant, la période de 10 jours semble insuffisante pour permettre aux moules exposées à la forte concentration de C4 de rétablir leur état physiologique de base.

En revanche, chez les moules *Mytilus* de petite taille, une réversibilité claire du processus enzymatique a été observée. Après détoxification, des diminutions significatives de 40.01% et 66.60% des activités catalase ont été relevées chez les spécimens exposés aux concentrations C3 et C4 respectivement, ramenant les activités catalase à des niveaux similaires à ceux des témoins. Ces résultats suggèrent une capacité de rétablissement de l'état de santé des moules de petite taille.

Ces résultats mettent en lumière la capacité de rétablissement des moules après détoxification, bien que les effets varient selon la taille et la concentration de contamination.

Pour les moules *Perna* de taille **moyenne**, aucune différence significative n'a été observée entre les activités catalase mesurées à la fin du cycle de détoxification et celles des témoins. Des augmentations non significatives de 2.34% et 2.25% ont été notées chez les individus précédemment exposés aux concentrations C3 et C4 respectivement, indiquant une stabilité de l'activité biochimique chez ces jeunes moules.

Chez les moules *Perna* de **grande** taille, une diminution significative de l'activité catalase (26.95%) a été observée à la fin du cycle de détoxification chez les individus précédemment exposés à la concentration C4. En revanche, la diminution était non significative (9.95%) chez ceux exposés à la concentration C3.

Malgré ces diminutions, les activités mesurées étaient supérieures à celles du groupe témoin, indiquant que les moules *Perna* de grande taille pourraient nécessiter une période de détoxification plus longue pour rétablir pleinement leur homéostasie.

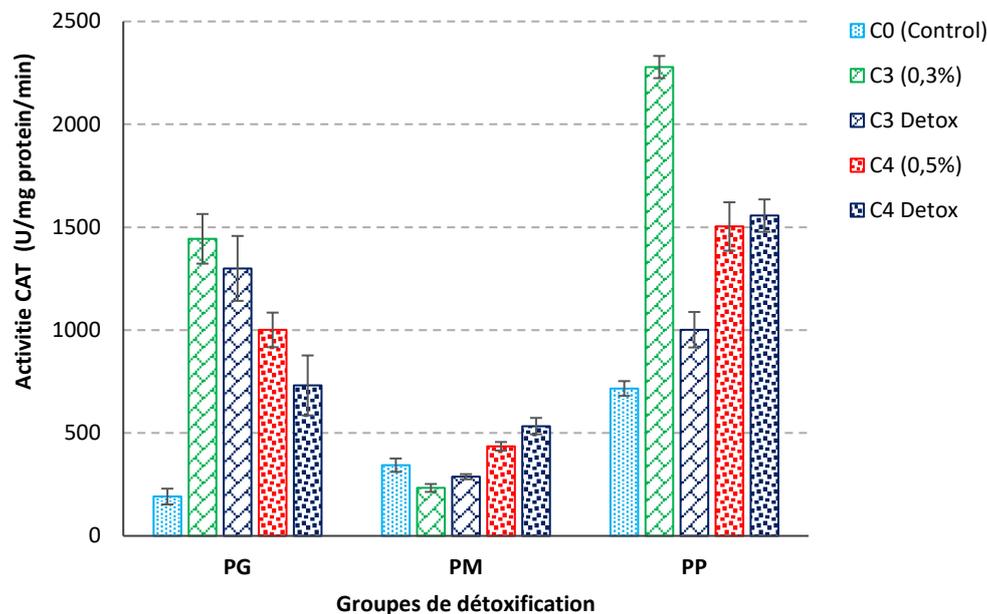


Figure IV.21 : Variation de l'activité catalase chez les moules *Perna* après le cycle de décontamination

Pour les moules *Perna* de **petite** taille, une baisse très significative de 56% de l'activité catalase a été observée chez les individus exposés à la concentration C3 après détoxification. Comparativement à l'activité catalase mesurée à la fin du cycle de contamination (1503.53 ± 117.67 U/mg protéines.min), une légère augmentation de 3.51% a été notée chez ceux détoxiqués de la concentration C4, bien que cette différence ne soit pas significative. Il semble donc que la période de détoxification reste insuffisante pour ramener les activités catalase des spécimens précédemment contaminés (1001.87 ± 86.11 et 1556.33 ± 78.88 U/mg protéines.min) à celles des témoins (716.22 ± 35.94 U/mg protéines.min).

Dans l'ensemble, l'espèce *Perna* a maintenu des différences similaires entre les témoins des trois classes de taille tout au long du cycle de contamination et de détoxification.

Les différences étaient significatives pour les moules détoxiquées de la concentration C3 quel que soit la classe de taille. De plus, la détoxification des moules exposées à la concentration C4 a révélé des différences significatives entre *Perna* petite/*Perna* moyenne et *Perna* petite/*Perna* grande, tandis que la différence entre *Perna* moyenne et *Perna* grande était non significative, indiquant une réponse similaire de détoxification entre ces deux classes de taille.

❖ Discussion

Depuis l'élaboration du programme « *Mussel Watch* » par Goldberg en 1975, l'utilisation des mollusques bivalves s'est généralisée pour surveiller l'évolution positive ou négative de l'environnement et étudier ses impacts biologiques et physiologiques [452, 453].

L'enzyme antioxydante CAT, induite pour contrer le stress oxydatif [217, 336, 337, 454-456], est largement utilisée comme indicateur du niveau de pollution [201, 243] et de l'état de santé cellulaire [331, 457] chez la moule *Mytilus galloprovincialis*.

Le métabolisme énergétique est étroitement lié à l'énergie allouée aux fonctions de défense de l'organisme ainsi qu'à la maintenance du métabolisme de base, à la croissance et à la reproduction [7, 17, 19, 458, 459]. Selon Jean-Claude et Claude [19], les biomarqueurs de défense permettent aux organismes de survivre à la présence de polluants, mais cela a un coût énergétique. De nombreuses études [193, 194, 235, 460, 461] confirment l'augmentation des taux métaboliques chez les organismes exposés à des stress chimiques variés.

Dans notre étude sur les moules *Perna* et *Mytilus*, les individus de taille moyenne (jeunes) étaient les plus résistants à la contamination, sans effets significatifs sur les réponses CAT. En revanche, les moules de grande et petite taille ont montré une sensibilité accrue, avec des augmentations importantes de l'enzyme de défense CAT. Cette augmentation des dépenses énergétiques peut réduire l'investissement énergétique dans la croissance et/ou la reproduction, impactant la population.

Les molécules toxiques interagissent avec les molécules biologiques, entraînant divers mécanismes de défense (évitement, isolement, élimination active, neutralisation) qui ont un coût énergétique. Il existe une corrélation entre la capacité de défense de l'organisme et sa capacité de production de biomasse. Chez les moules, les enzymes antioxydantes sont cruciales pour faire face aux xénobiotiques. L'excrétion et la séquestration des métaux dans les tissus peuvent également intervenir. Les premières réponses aux contaminants sont souvent liées au système antioxydant [18, 199, 201, 217, 243].

Nous avons observé des augmentations de l'activité CAT sous l'effet de la contamination, et des baisses à la fin du cycle de détoxification, indiquant une relation directe entre le niveau de pollution et la stimulation de l'enzyme CAT. La baisse d'activité CAT peut signaler une réversibilité de l'état de santé. Les biomarqueurs de défense comme la CAT contribuent au maintien de l'homéostasie [199, 201, 217, 243].

Sans contaminants, les processus d'élimination interviennent rapidement, surtout si la cible biologique n'est pas atteinte de manière aiguë. Geffard *et al.*, [462] ont démontré que l'élimination des métaux peut se produire en déplaçant des organismes d'un milieu contaminé à un milieu propre.

La restauration de la santé des spécimens est due à l'efficacité des processus de décontamination et d'élimination des xénobiotiques, traduite par une diminution des polluants bioaccumulés. Box *et al.*, [243] ont mesuré la concentration de malondialdéhyde (MDA) chez des moules transplantées dans différents estuaires, sans observer de changements significatifs de MDA malgré l'augmentation de l'activité CAT, soulignant le rôle protecteur de la CAT. L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) est restée inchangée, confirmant l'importance de la réponse CAT au stress oxydant.

Amiard *et al.*, [19, 458] ont noté que les organismes favorisent les enzymes à faible consommation énergétique sous stress. La catalase est privilégiée car elle ne nécessite ni cofacteur ni énergie, contrairement à la glutathion peroxydase. Xu *et al.*, [324] ont observé une réponse significative de la CAT chez les moules *Mytilus coruscus* exposées à du cuivre, avec des changements non significatifs de l'activité SOD et des concentrations en MDA.

En revanche, il a été démontré que des niveaux élevés de MDA accompagnés d'une activité CAT réduite sont observés en cas de forte pollution persistante [463]. Selon Mejdoub *et al.*, [18], la faible activité des enzymes antioxydantes telles que la CAT augmente la teneur en radicaux superoxydes et en H₂O₂, qui réagissent ensemble pour produire des radicaux hydroxyles capables d'attaquer toutes les biomolécules et de perturber le métabolisme cellulaire.

Par ailleurs, Vlahogianni *et al.*, [201] indiquent que de nombreux scientifiques considèrent la CAT comme un biomarqueur sensible et important du stress oxydant, souvent plus pertinent que la SOD pour révéler les effets biologiques sur le statut redox des organismes marins.

Bien que certains auteurs [4, 464-468] aient observé des réponses retardées ou contradictoires de la CAT, ou encore des corrélations non significatives entre la CAT et la nature du polluant, plusieurs autres chercheurs confirment la pertinence de la catalase comme biomarqueur du stress oxydatif causé par les polluants chimiques et biologiques [5, 18, 336, 469, 470].

Richir et Gobert [471] ont étudié les corrélations de bioaccumulation de 19 ETM par la moule *Mytilus galloprovincialis* en fonction de la taille, du poids, du sexe et du stade de maturité. Ils ont constaté que la classe de taille moyenne présentait les meilleures corrélations avec une certaine stabilité métabolique. Les moules de petite taille montraient des variations interindividuelles et une modélisation de la bioaccumulation difficile en raison de leur hyperactivité. Cependant, la plus forte accumulation des 19 ETM était observée chez les petites moules. Les auteurs recommandent donc de ne pas utiliser les classes de tailles extrêmes (petites et grandes) dans les programmes de surveillance. La classe de taille moyenne, étant plus résistante et métaboliquement stable, est préférée comme bioindicateur de pollution.

Les résultats de Richir et Gobert [471] confirment nos résultats expérimentaux, démontrant l'effet de la pollution industrielle sur les moules *Mytilus* et *Perna* de notre étude. L'impact environnemental affecte particulièrement les petites moules, les empêchant d'atteindre l'âge adulte et de se reproduire, et les grandes moules, réduisant leur capacité à générer une nouvelle génération sous des conditions stressantes.

Une augmentation des dépenses énergétiques pour le métabolisme de base, due au stress, peut réduire l'investissement énergétique pour la croissance et la reproduction. Ainsi, la classe de taille moyenne seule ne peut garantir la pérennité de la population, ce qui peut entraîner la disparition de l'espèce, comme observé sur les côtes algériennes. Cela a des effets considérables sur la richesse et la biodiversité des milieux côtiers, qui représentent environ 80% de la biodiversité marine selon plusieurs scientifiques [472].

Vu les caractéristiques et la sensibilité de réponse de l'enzyme CAT, cette dernière présente une pertinence cinétique élevée. En raison de la simplicité de son dosage, de nombreux auteurs considèrent la catalase comme un biomarqueur sensible et pratique pour le biomonitoring des écosystèmes aquatiques [4, 18, 179, 201, 203, 235, 236, 436, 473-475].

IV.11.4/- Etude comparative entre les différents types de rejets (Moule *Mytillus* de taille moyenne)

Les résultats relatifs au dosage de la catalase (CAT) chez la moule (*Mytillus galloprovincialis* de taille moyenne) contaminé par les différents types de rejets liquides sont représentés par la figure (IV.22).

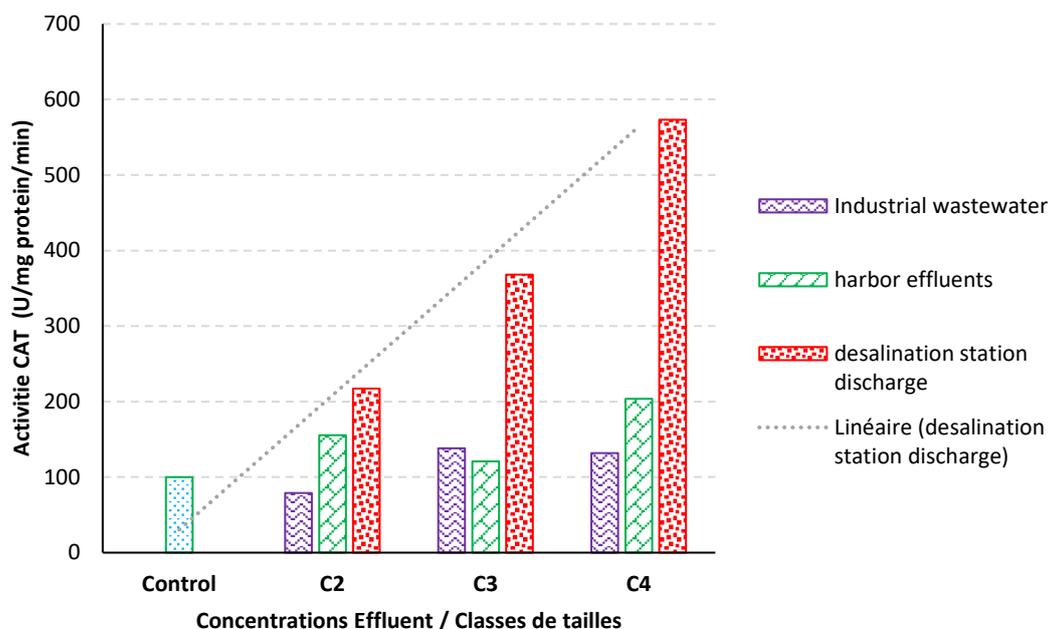


Figure IV.22 : Variation de l'activité catalase chez les moules *Mytillus* jeune (classe de taille moyenne) sous l'effet des différents effluents.

Quelle que soit la concentration du rejet liquide industriel (RI) testée, l'ANOVA-2 n'a révélé aucune différence significative ($p > 0.05$) entre les activités catalase mesurées (fig IV.22). Concernant l'effluent portuaire (EP), par rapport à l'effet de la concentration C2, aucune différence significative des activités catalase n'a été observée selon l'analyse statistique. Cependant, la différence d'activité de l'enzyme antioxydante était significative ($p < 0.01$) entre l'effet de la concentration C3 et celui de C4.

D'autre part, le rejet de la station de dessalement (RSD) de l'eau de mer a conduit à des inductions très importantes de la catalase, proportionnelles aux concentrations testées. La plus forte induction (5,73%, soit six fois) de l'enzyme antistress oxydatif a été observée sous l'effet de la concentration C4. Les différences d'activités catalase étaient très significatives ($p < 0.0001$) quel que soit la concentration employée du rejet (RSD).

L'étude de l'effet indépendant de la concentration C2 (ANOVA-2) sur les réponses catalase n'a révélé aucune différence significative ($p > 0.05$) entre l'effluent portuaire et celui de la station de dessalement. Cependant, des différences significatives ont été observées entre RI et EP, et encore plus significatives entre RI et RSD.

Pour la concentration C3, aucune différence significative n'a été relevée quant à l'effet du type de rejet entre RI et EP. En revanche, des différences nettement significatives ont été observées entre RI-RSD et EP-RSD.

Quel que soit le type de rejet liquide testé, les différences d'activité catalase mesurées sous l'effet de la concentration C4 étaient significatives ($p < 0.05$) entre RI-EP et très significatives ($p < 0.0001$) entre RI-RSD et EP-RSD.

❖ **Discussion**

Les activités catalase mesurées dans notre étude, sous l'influence des divers rejets liquides, fournissent une indication claire du degré de toxicité de chaque effluent. En particulier, le rejet de la station de dessalement s'est révélé être le plus toxique, quelle que soit la concentration testée.

En situation de stress sévère, les enzymes de défense sont induites rapidement et de manière significative pour contrer les effets subis. Cependant, dans certains cas, cela peut conduire à une inhibition finale des mécanismes de défense [476, 477]. Notre étude a mis en évidence des taux de mortalité significatifs à la fin de l'exposition des moules aux différentes concentrations du rejet de la station de dessalement, ce qui reflète une altération totale des mécanismes physiologiques chez *Mytilus*, utilisé comme bioindicateur du degré de contamination. En revanche, aucune mortalité n'a été observée sous l'effet du rejet industriel (RI) ou de l'effluent portuaire (EP). Ainsi, il est manifeste que le rejet de la station de dessalement présente une toxicité substantielle.

La bioaccumulation des xénobiotiques varie en fonction de leurs propriétés chimiques, ce qui fournit une indication précieuse sur leur biodisponibilité dans l'environnement [453, 478]. Cette connaissance permet d'évaluer les risques potentiels à différents niveaux physiologiques tels que l'immunité, la reproduction et la génétique [343, 453, 479].

L'étude comparative des effets des différentes sources de contamination sur nos spécimens de moule *Mytilus galloprovincialis* de taille moyenne (jeunes moules) a révélé que le rejet de la station de dessalement est le plus perturbateur. Conformément à nos observations, l'introduction des diverses concentrations de contaminants industriels et portuaires n'a pas entraîné de variations dans les paramètres physico-chimiques de l'eau d'élevage par rapport aux groupes témoins. Ainsi, les effets néfastes observés sur nos spécimens peuvent être attribués aux xénobiotiques présents dans ces deux types d'effluents.

En revanche, le rejet de la station de dessalement a induit une augmentation de la salinité et de la conductivité de l'eau des aquariums. L'action combinée des xénobiotiques présents dans cet effluent et cette augmentation de la salinité pourrait amplifier le signal de stress mesuré par l'activité de l'enzyme catalase (CAT).

Comme observé dans notre étude, les rejets industriels sont souvent déversés directement dans les milieux récepteurs, tels que les eaux côtières, sans aucun prétraitement. Ces rejets sont généralement très chargés en matières en suspension, sels dissous, et éléments traces chimiques organiques et/ou inorganiques. Une fois dans les milieux récepteurs, ces effluents liquides peuvent avoir des effets très néfastes sur la composante biologique du milieu et peuvent également modifier les propriétés physicochimiques de la colonne d'eau, voire des fonds sédimentaires en raison de l'accumulation et de la précipitation des xénobiotiques apportés par les débits continus des rejets.

Certains contaminants ne sont pas éliminés par les organismes vivants, entraînant ainsi une bioaccumulation tout au long de la chaîne alimentaire, avec des effets néfastes notables tels que la neurotoxicité, l'immunotoxicité, le stress et les dommages oxydatifs, les modifications du comportement, l'inhibition de la croissance et l'altération de la reproduction [436, 437]. Les effets à long terme sur le milieu récepteur sont particulièrement préoccupants.

Les débits continus des rejets liquides industriels introduisent non seulement une charge importante en xénobiotiques, mais peuvent également entraîner une légère diminution de la salinité des eaux côtières réceptrices.

La sensibilité des organismes aquatiques à cette diminution de salinité est bien documentée par plusieurs chercheurs.

Hamer *et al.*, [480] ont observé une augmentation de la mortalité des moules *Mytilus galloprovincialis* à des salinités plus faibles. Ils ont constaté que le taux de consommation d'oxygène des moules augmentait inversement avec la salinité.

Bussell *et al.*, [481] ont montré qu'une réduction de moitié de la salinité de l'eau de mer entraînait une diminution significative de plusieurs mesures de la fonction immunitaire chez les moules, incluant la concentration d'hémocytes, le pourcentage d'hémocytes éosinophiles et la phagocytose.

Wang *et al.*, [482] ont observé que le taux de filtration, l'efficacité d'absorption, le taux de respiration et la marge de croissance de la moule *Perna viridis* diminuaient avec la baisse de la salinité et de la concentration d'oxygène dissous.

Bakhmet *et al.*, [483] ont rapporté que les moules *Mytilus edulis* exposées à une hyposalinité modérée (15g/L) montraient une diminution significative de la fréquence cardiaque par rapport à la salinité de contrôle (25g/L). Le rythme cardiaque s'accélérait rapidement lorsque les moules retournaient dans le milieu à la salinité normale.

Chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, Freitas *et al.*, [484] ont constaté qu'à faible salinité, malgré une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes, la peroxydation des lipides (LPO) augmentait, probablement en raison d'une surproduction de ROS due à une activité accrue du système de transport d'électrons.

En revanche, les rejets des stations de dessalement peuvent augmenter la salinité des zones proches des émissaires. La dispersion de saumure peut varier considérablement en fonction des caractéristiques propres au site, du volume de l'effluent, du mode de rejet et des conditions hydrographiques existantes. Néanmoins, la salinité et la température sont souvent plus élevées que les normes de référence aux sites de rejet [485-487].

La rive sud de la Méditerranée est considérée comme l'une des régions les plus pauvres en eau dans le monde. En conséquence, les efforts de dessalement se concentrent principalement sur ses rives sud et est, ainsi qu'en Espagne.

En 2013, plus de 1 532 usines de dessalement d'eau de mer étaient installées autour de la mer Méditerranée, avec une capacité totale cumulée d'environ 12 Mm³/jour. L'Espagne était le principal producteur avec 31% de la capacité totale, suivie par l'Algérie et la Libye, avec respectivement 20% et 11% [488]. Compte tenu de cet effort de dessalement, la biodiversité de nos eaux côtières est compromise [488].

La salinité et la température ont longtemps été perçues comme des facteurs environnementaux inhibiteurs pour la survie et la croissance du biote marin [489, 490]. Des expériences en laboratoire et en mésocosme ont montré la sensibilité de certains herbiers marins à l'hypersalinité, avec des tolérances variant d'une espèce à l'autre. Généralement, la physiologie, la croissance foliaire et le taux de survie sont affectés [491-496].

Sur le terrain, il a été démontré qu'une prairie de *Posidonia oceanica* peu profonde est affectée après six années d'exposition à la saumure [497], tandis que la communauté benthique est modifiée [498-500], avec la disparition de certains échinodermes [501, 502].

Au voisinage, même lointain, des émissaires des rejets liquides de la présente étude, nous avons observé une disparition de l'herbier *Posidonia oceanica*, de l'oursin *Paracentrotus lividus*, et les naissains de moules *Mytilus* installés sur des substrats durs n'ont pas eu l'occasion de grandir.

Plusieurs auteurs s'accordent sur l'importance de la salinité, montrant son influence en tant que facteur abiotique sur l'activité métabolique et les réponses enzymatiques. Ainsi, l'augmentation de la salinité chez les groupes contaminés peut constituer un paramètre interférant avec les activités métaboliques des espèces indicatrices. De plus, les xénobiotiques présents dans le rejet de la station de dessalement peuvent conduire à un effet conjugué, augmentant le signal de stress (CAT) sous l'effet de la salinité.

IV.11/- Etude de l'effet combiné de la contamination par le rejet industriel avec l'élévation de la température : Simulation du changement climatique

Les écosystèmes marins côtiers subissent des pressions anthropiques et naturelles qui placent les organismes aquatiques dans des situations de multi-stress. Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'impact et de mieux comprendre les mécanismes de réponse des moules exposées à deux facteurs environnementaux majeurs : la pollution par les rejets industriels et l'augmentation des températures des eaux marines côtières. Les effets induits par l'exposition aux polluants et à un stress thermique, seuls et en combinaison, ont été évalués sur les moules *Mytilus galloprovincialis*.

A l'exception de la température, Les autres paramètres ont été maintenus aussi constants que possible pour ne pas interférer avec les résultats expérimentaux. Pendant tout le cycle expérimental, la variation de la salinité était presque nulle ($36,33 \pm 0,059\text{‰}$), se situant dans l'intervalle optimal pour la croissance des moules *Mytilus galloprovincialis*. De plus, les mesures du pH étaient quasiment identiques dans chaque bac. Les valeurs journalières de l'oxygène dissous mesurées (moyenne de 6mg/L) répondaient aux exigences des spécimens. En conclusion, à l'exception de la température, les paramètres physicochimiques suggèrent que les conditions expérimentales ne génèrent probablement pas de stress, l'unique stress altérant les moules étant la combinaison de l'effet de la température et celui du rejet polluant.

IV.11.1/- Résultats du dosage de la catalase

Les résultats du dosage du biomarqueur catalase dans la chair des moules sont illustrés graphiquement dans la figure (IV.23).

L'objectif de l'étude était d'évaluer l'effet combiné de la pollution et de l'augmentation de la température afin de simuler l'impact saisonnier en présence de sources polluantes. Pour simplifier la comparaison entre l'effet saisonnier et celui de la pollution, nous avons utilisé une concentration constante de polluant (rejet industriel).

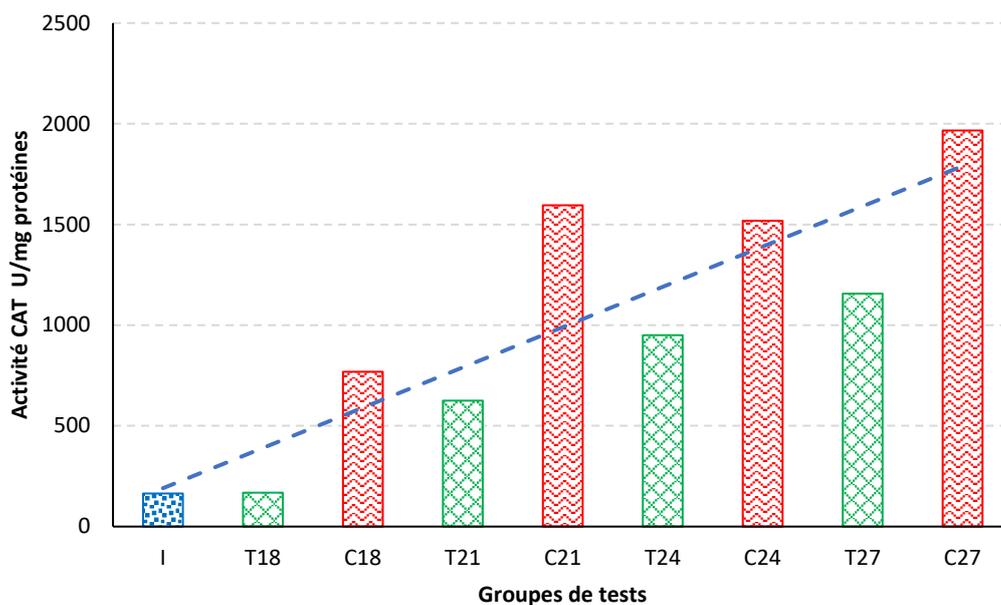


Figure IV.23 : Variation de l'activité catalase chez la moule *Mytilus galloprovincialis* dans les deux groupes de test témoin et contaminé.

I : Echantillon Initial ; T18 : Groupe sans contamination maintenu à 18°C ; C18 : Groupe de contamination maintenu à 18°C ; T21 : Groupe sans contamination maintenu à 21°C ; C21 : Groupe de contamination maintenu à 21°C ; T24 : Groupe sans contamination maintenu à 24°C ; C24 : Groupe de contamination maintenu à 24°C ; T27 : Groupe sans contamination maintenu à 27°C ; C27 : Groupe de contamination maintenu à 27°C.

D'après le graphe (fig IV.23), les moules *Mytilus* maintenues à 18°C sans contamination ont présenté une activité catalase similaire à celle mesurée chez les individus lors du prélèvement initial, indiquant que la période d'adaptation n'a pas induit de stress notable pour les moules. La température de l'eau de mer au moment du prélèvement initial des moules était de 17°C.

De plus, une augmentation proportionnelle de l'activité CAT est observée chez les individus témoins avec l'élévation de la température, la plus forte activité catalase (1156,481 U/mg protéine.min) étant relevée à 27°C. En revanche, les activités catalase mesurées chez les témoins étaient nettement inférieures à celles mesurées chez les moules contaminées, et ce, pour les différentes températures testées, indiquant un effet additionnel de la présence de polluants dans le milieu.

En se référant à l'étude de la partie du test d'exposition au rejet industriel, l'augmentation de la concentration en polluant à une température constante (22°C) a conduit à une élévation de l'activité de l'enzyme antioxydante CAT. Cette même activité est observée dans cette partie d'étude à une température d'exposition de 21°C. Par conséquent, on peut conclure que l'augmentation de la température a un impact significatif sur les réponses biologiques des moules *Mytilus*, ce qui pourrait traduire l'effet de la saison chaude sur la dynamique des moulières naturelles.

IV.11.2/-Résultats du dosage de la SOD

La figure (IV.24) ci-dessous représente la variation de l'activité de l'enzyme SOD chez les moules des deux groupes de test témoins et contaminés.

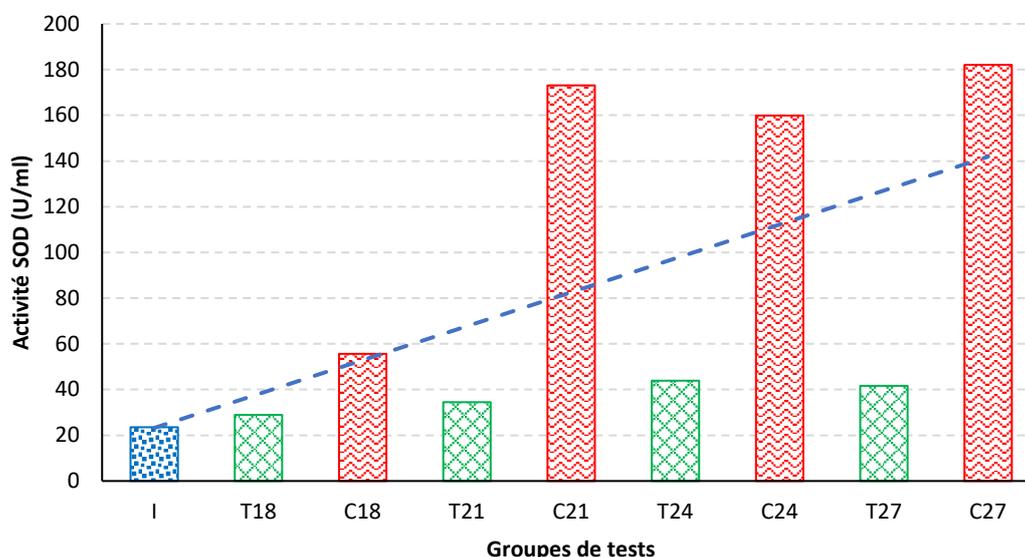


Figure IV.24 : Variation de l'activité SOD chez la moule *Mytilus galloprovincialis* dans les deux groupes de test témoin et contaminé.

I : Echantillon Initial ; T18 : Groupe sans contamination maintenu à 18°C ; C18 : Groupe de contamination maintenu à 18°C ; T21 : Groupe sans contamination maintenu à 21°C ; C21 : Groupe de contamination maintenu à 21°C ; T24 : Groupe sans contamination maintenu à 24°C ; C24 : Groupe de contamination maintenu à 24°C ; T27 : Groupe sans contamination maintenu à 27°C ; C27 : Groupe de contamination maintenu à 27°C.

D'après le graphe de la figure (IV.24), on constate que l'élévation de la température conduit à une augmentation de l'activité SOD chez les moules témoins (max : 43,88 U/mL à 24°C). Néanmoins, les activités atteintes ne sont pas très élevées comparativement à l'activité SOD mesurée chez les moules du prélèvement initial (23,53 U/mL). Ainsi, la SOD ne paraît pas très sensible à l'augmentation de la température. Pendant la saison chaude, la température de l'eau de mer des moulières naturelles avoisine les 26°C (eaux côtières).

Par ailleurs, sous l'effet additionnel de la contamination par l'effluent réel, les activités SOD démontrent des taux d'induction très importants (182,0656 U/ml), environ sept fois plus élevés que ceux des témoins ou du prélèvement initial. La SOD est donc plus sensible à la contamination qu'à la température.

Comparativement aux activités CAT, l'activité SOD semble être plus sensible à la présence de polluants chimiques dans le milieu, qui exercent un effet inducteur très important de l'activité enzymatique via la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les xénobiotiques sont les précurseurs des ROS et exercent des effets délétères au niveau cellulaire.

❖ Discussion

Ces dernières années, plusieurs recherches ont porté sur l'impact et les effets des changements climatiques, plus particulièrement l'augmentation des températures, sur la physiologie des organismes marins [503-507].

Les résultats de cette étude révèlent que les moules *Mytilus galloprovincialis* sont particulièrement sensibles à l'élévation de la température de l'eau, des valeurs dépassant 21°C perturbant leur métabolisme normal.

En l'absence de contamination, les activités CAT mesurées chez les moules *Mytilus* dans cette étude ont montré des taux d'induction très élevés sous l'effet du gradient thermique. Comme mentionné précédemment, le système de défense antioxydant est connu pour être induit par les xénobiotiques qui interfèrent avec la chaîne de transport des électrons, générant des ROS. Ainsi, le stress thermique se manifeste de manière significative en augmentant les taux d'activité antioxydante CAT.

Outre la pollution, plusieurs paramètres physicochimiques influencent la capacité des organismes à occuper certains milieux en affectant directement l'homéostasie de leurs systèmes physiologiques, notamment la température. Les principes fondamentaux de la thermodynamique établissent un lien étroit entre le métabolisme des organismes et la température, influençant la cinétique des enzymes cruciales pour les réactions biochimiques [508-510]. Les endothermes peuvent produire leur propre chaleur corporelle, tandis que la température des ectothermes est dictée par leur environnement [511, 512].

Les ectothermes aquatiques, comme les moules *Mytilus* de la présente étude, ont du mal à faire face à une augmentation de température, modifiant leur physiologie adaptative.

L'augmentation de la température entraîne une demande énergétique accrue, principalement régulée par les mitochondries lors de la phosphorylation oxydative. Ce processus utilise l'oxygène pour produire de l'ATP, la principale source d'énergie. Les dysfonctionnements mitochondriaux jouent un rôle crucial dans la détermination des limites thermiques chez les ectothermes [513-515]. Le catabolisme des glucides, protéines et lipides fournit les électrons nécessaires à la phosphorylation oxydative, permettant ainsi la production d'ATP. Ce processus complexe dépend de l'intégrité des membranes mitochondriales et des enzymes. Une perte d'intégrité des mitochondries peut limiter la production d'énergie, particulièrement en cas d'augmentation de la température. La phosphorylation oxydative peut être entravée par des dysfonctionnements au sein de la chaîne de transport des électrons ou par des facteurs en amont affectant l'oxydation et le transport des substrats. L'activité des enzymes clés du cycle de Krebs peut compenser l'effet de la température en augmentant la production de NADH nécessaire à la phosphorylation oxydative [509, 516, 517].

En conditions idéales, le système antioxydant des cellules régule la concentration de ROS et les maintient à des niveaux optimaux compatibles avec leurs fonctions de régulation et de signalisation, limitant ainsi leurs effets néfastes [518]. Cependant, certains facteurs peuvent perturber cet équilibre en affectant directement le taux de production de ROS ou en diminuant l'efficacité des enzymes antioxydantes. Cela semble se produire lors d'un stress thermique, probablement en raison d'une perte d'intégrité des Complexes I et III, combinée à un flux élevé d'électrons dans la chaîne de transport [516, 518-520]. L'augmentation du stress oxydant est probablement liée à une perte de fonctionnalité de certaines composantes du système de transport des électrons, dont les Complexes I et III, qui sont les principales sources de ROS dans la mitochondrie.

Dans cette étude, les moules *Mytilus* ont montré que leur mécanisme de défense antioxydant est sensible à l'interaction entre la contamination et l'augmentation de la température de l'eau. Cette sensibilité s'explique en partie par leur métabolisme élevé et la grande susceptibilité de leurs enzymes aux stress oxydatifs. Toute perturbation de l'activité enzymatique peut ainsi altérer significativement les voies métaboliques, compromettant le développement et la survie des individus [356].

Il est bien établi que le stress thermique peut perturber physiologiquement les animaux, augmentant directement l'accumulation de radicaux libres (ROS) [521-523]. Les polluants et le stress thermique sont des inducteurs puissants du stress oxydatif [524-526].

Les moules, tout comme d'autres organismes, peuvent contrôler les niveaux croissants de ROS dans leurs tissus en activant un système de défense antioxydant cellulaire composé d'enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), ainsi que de protéines de liaison faible comme les métallothionéines et le glutathion, agissant comme des chélateurs [468, 527].

Combinaison d'un stress thermique et d'une exposition chimique réaliste pourrait fortement affecter les limites de tolérance et nuire au développement et à la reproduction des organismes aquatiques, notamment *Mytilus galloprovincialis*. Bien que résistantes (aucune mortalité n'a été relevée dans cette étude), les moules pourraient voir leurs capacités de peuplement des eaux côtières diminuer dans un avenir proche avec l'augmentation des concentrations de polluants et de la température de l'eau due au réchauffement climatique.

Le réchauffement climatique représente une menace croissante pour les écosystèmes mondiaux. Ce travail fournit des preuves pour mieux comprendre comment l'augmentation de la température peut avoir des effets néfastes sur le statut oxydatif des organismes marins, en particulier dans les milieux côtiers soumis aux rejets anthropiques. Nos résultats ont mis en évidence une induction précoce des antioxydants après exposition aux effluents industriels et au stress thermique. Malgré la dominance de la CAT par rapport à la SOD chez les moules, des études supplémentaires sont nécessaires pour éclaircir la réponse cellulaire à l'exposition combinée aux effluents réels et au stress thermique.

En conclusion, l'utilisation de biomarqueurs dans notre étude s'est avérée particulièrement intéressante pour la détection précoce des signaux mesurés et leur corrélation avec la contamination et les gradients de température testés. Les biomarqueurs peuvent être un complément crucial aux programmes de surveillance chimique, fournissant une évaluation du risque pour les organismes des écosystèmes aquatiques à long terme.

IV.12/- L'utilisation de l'approche passive pour la biosurveillance des eaux côtières :
Cas de la baie d'Alger et de la baie de Zemmouri

IV.12.1/- Paramètres Hydrologiques

Les résultats des mesures *in situ* de la température (T°C), de la salinité (Sal), de l'oxygène dissous (DO₂ mg/l) et du pH sont présentés dans le tableau (IV.30) ci-dessous.

Il est bien établi que les différentes activités biologiques (croissance, bioaccumulation et détoxification des polluants chimiques, réponses enzymatiques des biomarqueurs, etc.) observées chez les bivalves sont fortement influencées par les facteurs abiotiques de leur environnement [199, 201, 213-218].

Tableau IV.30 : Paramètres physicochimiques mensuels pour les deux sites de prélèvement.

Date	Site	(T°C)	(Sal)	(DO ₂ mg/l)	pH
13/02/2017	Figuier	16,20	36,51	-	8,16
	Bateau cassé	16,40	36,67	-	8,08
15/03/2017	Figuier	18,30	36,20	11,20	-
	Bateau cassé	19,10	36,70	10,13	-
25/04/2017	Figuier	19,8	36,8	11,23	8,15
	Bateau cassé	20,5	36,9	10,6	7,54
14/05/2017	Figuier	20,10	36,90	10,43	8,14
	Bateau cassé	21,80	37,00	09,06	8,28
18/06/2017	Figuier	25,90	37,00	-	8,13
	Bateau cassé	26,00	36,80	-	8,20
18/07/2017	Figuier	24,87	-	-	-
	Bateau cassé	25,32	-	-	-

D'après les résultats obtenus, nous observons que les variations de température dans les différentes localités sont presque identiques et les valeurs mesurées se situent dans les limites saisonnières.

De plus, les valeurs de salinité relevées durant la période d'étude pour les deux sites sont quasi stables et se situent dans l'intervalle de tolérance de la moule *Perna perna*. Par conséquent, la salinité mesurée n'a aucun impact sur les réponses biologiques des moules, telles que traduites par les biomarqueurs.

Dans l'évaluation du niveau de pollution, la mesure directe du taux d'oxygène dissous peut informer sur l'eutrophisation des écosystèmes aquatiques, ce phénomène pouvant conduire à l'asphyxie des eaux [109]. L'oxygène dissous est donc un indicateur sensible et pratique pour une première évaluation environnementale. Dans notre étude, les mesures d'oxygène étaient ponctuelles et en surface, ne fournissant pas d'information sur le gradient de variation sur toute la colonne d'eau, rendant la discussion de ce paramètre difficile. Néanmoins, les valeurs mesurées dans les deux sites excluent un effet néfaste de l'oxygène sur les spécimens de moules.

Le pH peut aussi être un indice de pollution. Cependant, les valeurs de pH obtenues dans les deux sites d'étude montrent des variations peu significatives. La comparaison des valeurs entre les deux localités exclut un effet gênant ou stressant du pH. Toutefois, nous notons une valeur anormale de pH (7,54 en avril) sur le site de Bateau Cassé. Cette diminution est probablement due aux effets et à la nature des rejets dans cette zone. Un mois plus tard, la valeur est revenue à la normale pour les eaux marines.

IV.12.2/- Résultats du suivi de l'azote ammoniacal

La figure (IV.25) illustre la variation de la concentration en ammonium dans les différentes localités de prélèvement au cours de la période d'étude.

D'après la figure, on observe des variations minimales de la concentration d'ammonium au niveau de la moulière du Figuier, avec des valeurs comprises entre 0,00433mg/L en février et un maximum de 0,0356mg/L enregistré en juillet. En revanche, les concentrations d'ammonium dans la moulière de Bateau Cassé sont toujours plus élevées que celles de la moulière du Figuier, avec une concentration minimale de 0,016mg/L en avril et un maximum de 0,093mg/L et 0,0956mg/L en juin et juillet respectivement. Cela suggère que le site de Bateau Cassé pourrait être pollué.

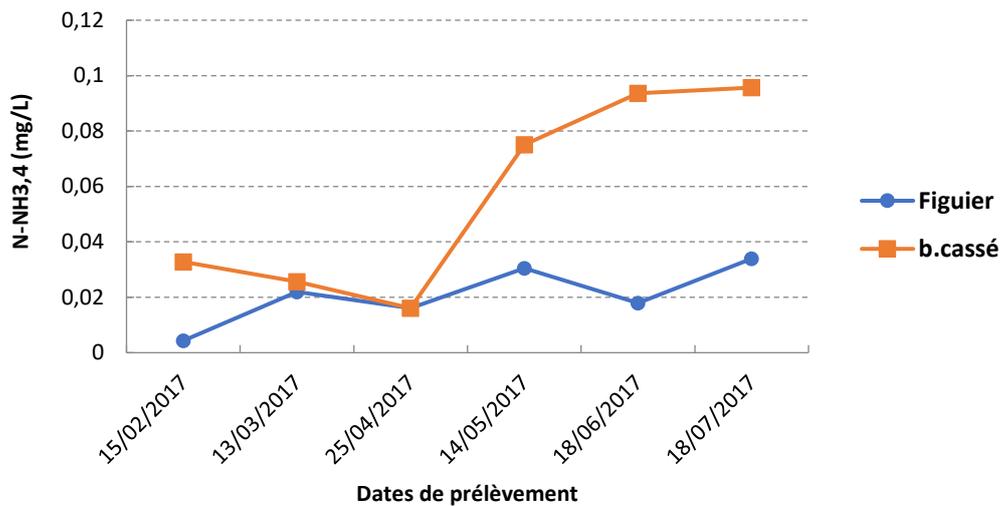


Figure IV.25 : Variation mensuelle de la concentration en ammonium dans les deux sites.

L'azote ammoniacal est présent en solution sous deux formes, l'ammoniac (NH_3) et l'ammonium (NH_4^+), dont les proportions relatives dépendent du pH, de la température et de la salinité. Dans les eaux marines et estuariennes, l'ammonium est prédominant, ce qui explique pourquoi ce terme est souvent utilisé pour désigner l'azote ammoniacal. Les concentrations varient considérablement en fonction du lieu et de la saison. Dans les eaux côtières non polluées et en milieu océanique, les concentrations sont généralement inférieures à 0,017mg/L. Cependant, à proximité des émissaires urbains, les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines, voire centaines de micromoles par litre. Dans ces conditions, l'ammonium devient un bon indicateur de la pollution urbaine [219].

IV.12.3/- Résultats du suivi des nitrites

La figure (IV.26) illustre la variation de la concentration en nitrites dans les différentes localités de prélèvement au cours de la période d'étude.

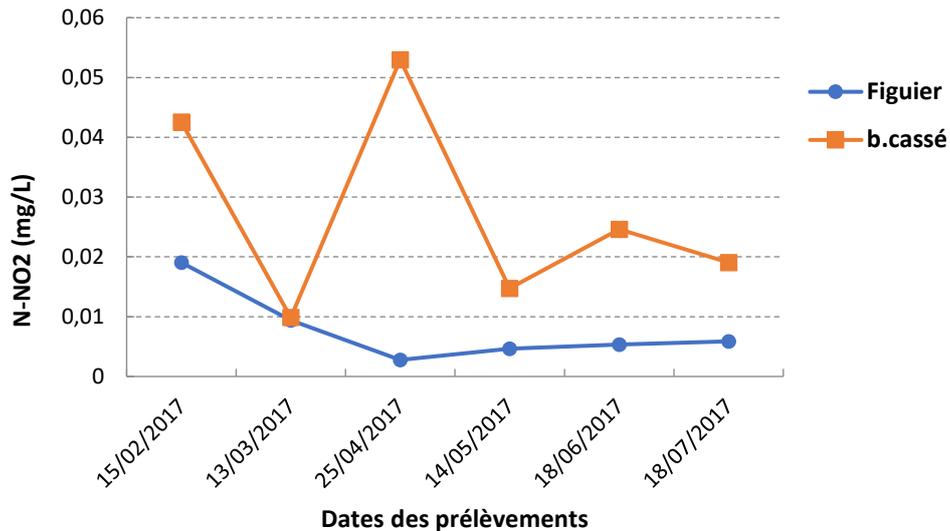


Figure IV.26 : Variation mensuelle de la concentration en nitrites dans les deux sites.

Les valeurs enregistrées au site du Figuiers sont presque nulles, avec un minimum de 0,0027mg/L en avril, un maximum de 0,019mg/L en février, et une moyenne de 0,0078 mg/L. En revanche, les valeurs au site de Bateau Cassé sont nettement supérieures, avec un maximum de 0,052mg/L en avril, un minimum de 0,0098mg/L en mars, et une moyenne de 0,027mg/L. Néanmoins, toutes les valeurs mesurées restent inférieures au seuil de 0,1mg/L, ce qui ne permet pas de conclure à une pollution probable.

IV.12.4/- Résultats du suivi des phosphates

La figure (IV.27) montre la variation des phosphores dans les différentes localités de prélèvement au cours de la période d'étude.

De février à juin, les concentrations en phosphore dans les deux sites étaient toutes inférieures à 0,1mg/L. En juin, pendant la saison chaude, les valeurs mesurées ont atteint respectivement 0,29mg/L pour le site de Bateau Cassé et 0,45mg/L pour le site du Figuiers (fig IV.27). Par la suite, une diminution notable des concentrations a été observée, atteignant une valeur moyenne de 0,013mg/L pour les deux sites.

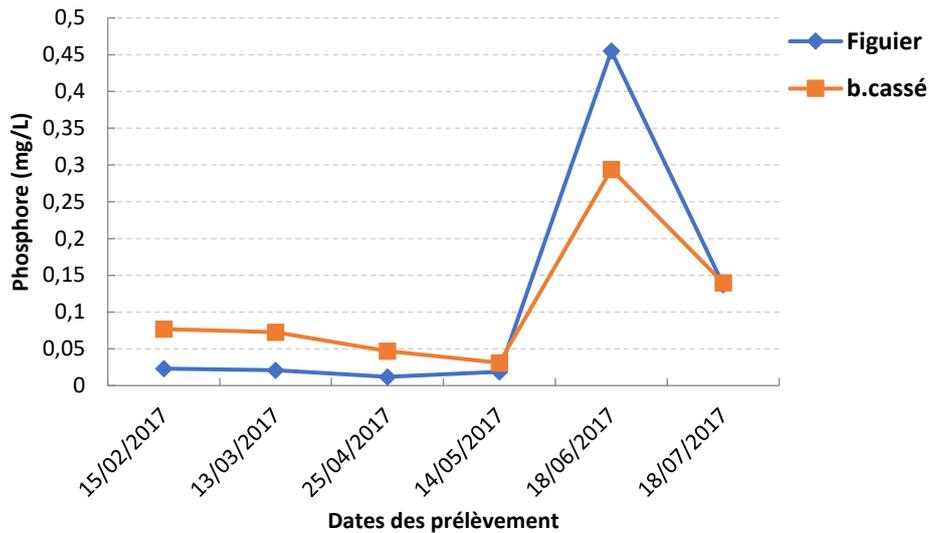


Figure IV.27 : Variation mensuelle de la concentration des phosphates dans les deux sites.

Le phosphore est introduit dans les eaux principalement par l'agriculture et les foyers domestiques [109]. Des concentrations supérieures à 0,5mg/L sont considérées comme indicatives de pollution [438]. Ainsi, les fortes concentrations mesurées en juin semblent être liées aux rejets domestiques contenant des concentrations élevées en détergents et produits de nettoyage.

IV.12.5/- Résultats du suivi des matières en suspension MES

La figure (IV.28) représente la variation des Matières en Suspension (MES) dans les deux localités de prélèvement au cours de la période d'étude.

Naturellement présentes dans les eaux littorales, les matières en suspension sont constituées de particules minérales et d'éléments d'origine organique. Ces particules proviennent des apports terrigènes tels que les bassins versants, les fleuves, les estuaires, ainsi que des déversements directs des stations d'épuration et de la remise en suspension des sédiments marins sous l'effet de la houle []. La variabilité spatiale et temporelle des MES soulève également des questions quant aux méthodes d'observation et de quantification des MES []. Les caractéristiques des MES peuvent varier en fonction d'événements tels que les tempêtes, les crues, ainsi que la variabilité saisonnière de la production primaire, modifiant potentiellement leurs propriétés de rediffusion et impactant la qualité des mesures.

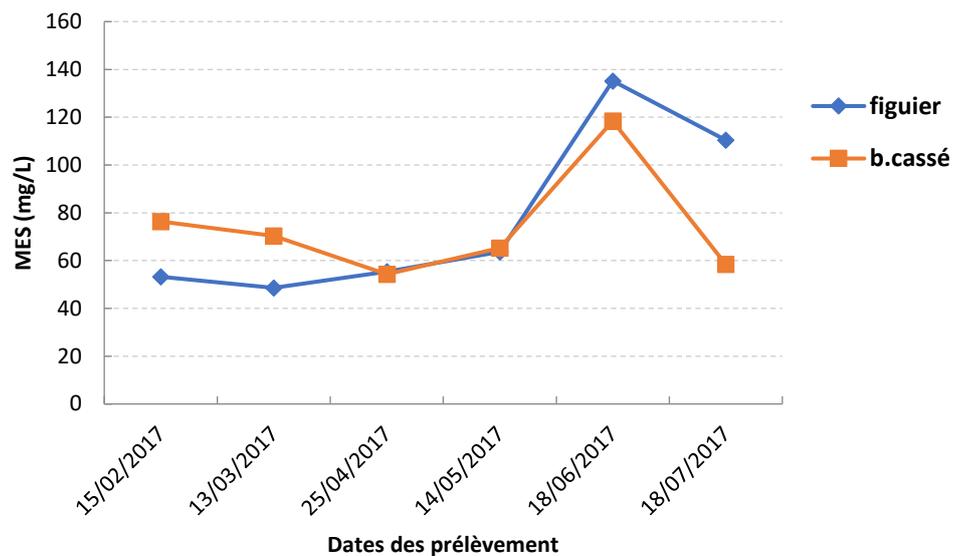


Figure IV.28 : Variation des concentrations en MES en fonction du temps et du site de prélèvement.

Nous observons également un pic de concentration élevée en MES en juin pour les deux moulières situées dans des baies différentes, comme le montre la tendance des concentrations illustrée par la figure IV.4. Malgré la difficulté d'interprétation des MES, l'influence saisonnière semble moins probable. En conclusion des résultats discutés sur les concentrations en phosphates et en azote ammoniacal, il est très probable qu'il existe un lien avec l'effet de la pollution. Cependant, la classification du degré de pollution reste complexe.

IV.12.6/- Résultats du dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP

Le tableau (IV.31) ci-dessous regroupe les pourcentages en HAP détectés dans les deux localités de la présente étude.

Tableau IV.31 : Pourcentage total en HAP dans les différentes localités de prélèvement

Dates	Figuier %		Bateau cassé %	
15/02/2017	Naphtalène	0,525	Acénaphtylène	1,345
	Acénaphtylène	2,678	Acénaphtène	4,526
	Acénaphtène	5,758	Fluorène	31,913
	Fluorène	64,391	Pyrène	36,756
	Pyrène	9,64		
13 /03 /2017	Acénaphtylène	0,279	Acénaphtylène	0,391
	Acénaphtène	0,723	Acénaphtène	1,143
	Fluoranthène	38,804	Fluorène	57,598
	Pyrène	11,934	Pyrène	16,165
25/04/2017			Naphtalène	1,128
			Acénaphtylène	5,169
			Acénaphtène	9,740
			Fluorène	32,497
			Pyrène	28,413
14/05/2017			Benzo[a]pyrène	2,575
	Naphtalène	0,583	Naphtalène	0,213
	Acénaphtylène	2,008	Acénaphtylène	2,783
	Fluorène	61,231	Acénaphtène	5,529
	Pyrène	8,589	Fluorène	33,81
			Fluoranthène	37,571
			Pyrène	13,052
		Bénzo[a]pyrène	1,438	
18/06/2017	Acénaphtylène	0,887	Naphtalène	8,369
	Acénaphtène	1,567	Acénaphtylène	25,768
	Fluorène	30,528	Fluorène	5,350
	Pyrène	14,241	Pyrène	8,674
			Benzo[a]pyrène	1,746
18/07/2017	Acénaphtylène	4,124	Acénaphtylène	0,887
	Acénaphtène	8,304	Acénaphtène	1,567
	Fluorène	58,418	Fluorène	30,528
	Fluoranthène	3,941	Fluoranthène	46,434
	Pyrène	17,783	Pyrène	14,241
	Benzo[a]pyrène	1,4		

L'analyse des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans la chair des moules a démontré la capacité biointégratrice de l'espèce *Perna perna*, facilitant ainsi le dosage de micropolluants chimiques difficiles à quantifier dans l'eau de mer.

Le tableau ci-dessus regroupe les pourcentages totaux des HAP bioaccumulés et identifiés dans la chair des moules prélevées sur les deux sites. Les chromatogrammes correspondants sont inclus en annexe, avec des tableaux récapitulant les différents HAP et leurs temps de rétention.

Les résultats obtenus révèlent la présence d'une variété de HAP. En raison de leurs sources multiples et de leur ubiquité, ces composés sont généralement présents dans l'environnement sous forme de mélanges complexes [528]. Ces résultats indiquent que la détection d'une de ces molécules soupçonne la présence d'autres, en particulier le benzo[a]pyrène, souvent utilisé comme marqueur représentatif de l'ensemble des HAP.

Il est largement documenté que les organismes aquatiques peuvent accumuler des concentrations plus élevées de HAP que celles présentes dans leur environnement [529, 530]. Cette bioaccumulation concerne principalement les organismes invertébrés, qui possèdent des capacités métaboliques limitées pour dégrader les xénobiotiques.

Les HAP étudiés sont parmi les contaminants les plus recherchés dans l'environnement, étant désignés comme substances prioritaires par l'US EPA (Environmental Protection Agency) des États-Unis [126, 531, 532], ainsi que par d'autres organismes de réglementation [533]. En raison de leur toxicité significative, même à de faibles concentrations, notamment en raison de leurs propriétés cancérigènes et/ou mutagènes, il est crucial de réglementer leurs concentrations maximales admissibles pour éviter tout risque environnemental. Les HAP sont également surveillés conformément à plusieurs directives en raison de leur persistance dans les milieux naturels et de leur faible biodégradabilité, posant ainsi des défis pour leur gestion environnementale [534].

IV.12.7/- Résultats des mesures biométriques de l'indice de condition

La figure (IV.28) montre la variation de l'indice de condition (IC) des moules dans les différentes localités de prélèvement au cours de la période d'étude.

Il est généralement difficile de distinguer une différence significative de l'indice de condition (IC) entre les moules des deux sites et de déterminer l'effet de la saison, de la pollution, ou de la reproduction (période de ponte).

L'indice de condition, indicateur de l'état physiologique des animaux, est le premier indicateur du taux de remplissage de la coquille par les tissus mous. Cet indice est généralement utilisé pour évaluer les variations saisonnières des réserves nutritives ou de la qualité des tissus, ainsi que pour surveiller les effets néfastes de divers contaminants et/ou maladies [8, 19, 535]. Bien que les indices de condition ne soient pas des biomarqueurs au sens strict, ils sont souvent mesurés en premier lieu en raison de leur simplicité, de leur faible coût, et de leur capacité à fournir des informations sur l'impact potentiel des polluants.

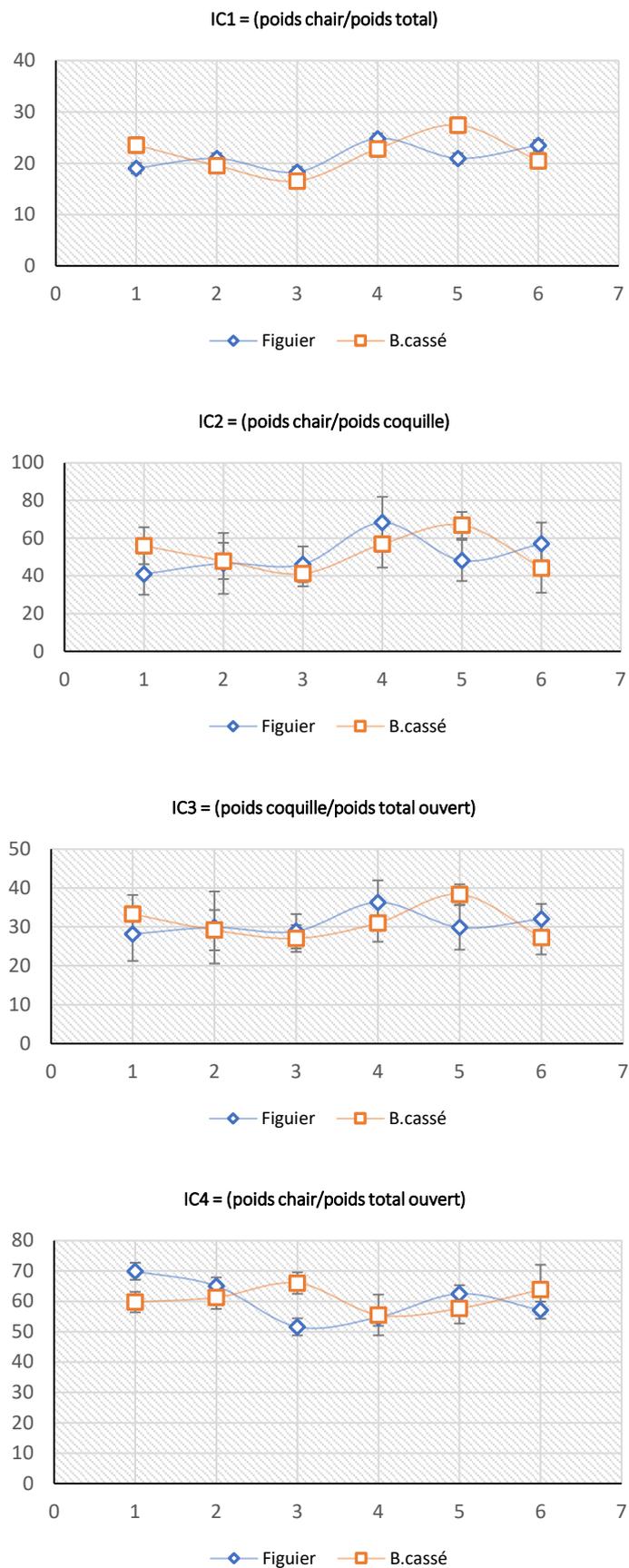


Figure IV.28 : Variation de l'indice de condition.

IV.12.8/- Variation de la Catalase CAT

Les variations spatio-temporelles de l'activité de l'enzyme de défense CAT des moules *Perna perna* provenant des deux sites d'étude sont illustrées graphiquement dans la figure (IV.29) ci-dessous.

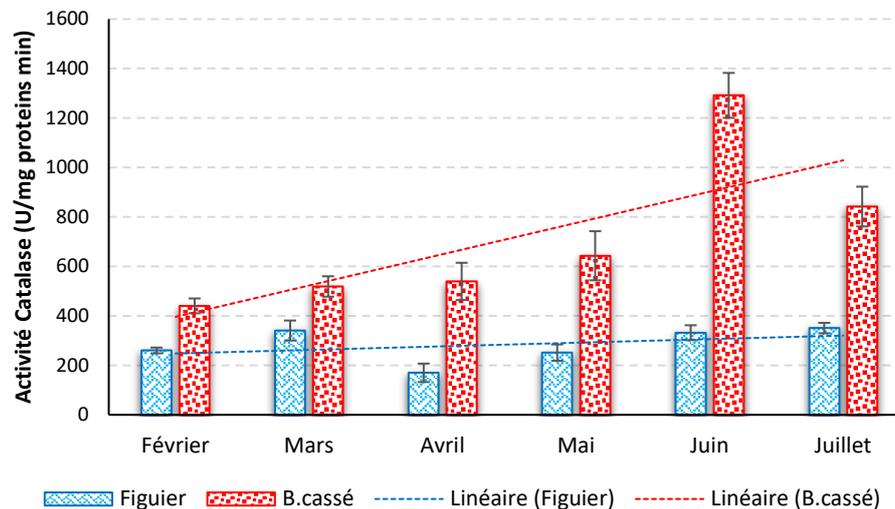


Figure IV.29 : Variation spatiotemporelles de l'activité Catalase.

Une stabilité remarquable de l'activité de l'enzyme antioxydante CAT est observée tout au long des différentes saisons chez les moules du site de Figuer. Les variations saisonnières de l'activité de CAT ne montrent pas de différences significatives. Cependant, une baisse de l'activité de CAT est enregistrée en avril (169,838115 U/mg protéines.min), ce qui représente une différence significative ($p < 0.05$) par rapport à l'activité relevée en mars (340,806932 U/mg protéines.min). Malgré cela, les différences d'activités enzymatiques entre avril (169,838115 U/mg protéines.min), mai (251,44196 U/mg protéines.min), et même juin (331,997744 U/mg protéines.min) ne sont pas significatives, indiquant une activité saisonnière relativement stable.

Les activités de l'enzyme antistress oxydatif chez les moules du site de Bateau Cassé montrent des différences non significatives de février à avril, suggérant une stabilité de l'activité de défense entre l'hiver et le printemps.

Cependant, une différence très significative ($p < 0.001$) est observée entre l'activité de février (440,496459 U/mg protéines.min) et celle de mai (643,192 U/mg protéines.min). De plus, le passage de mai à juin révèle une autre différence très significative ($p < 0.001$), atteignant l'activité CAT la plus élevée (1291,65521 U/mg protéines.min) durant la période d'étude. Bien qu'une baisse d'activité de CAT soit mesurée en juillet, elle reste supérieure à celle relevée en mai, indiquant une sensibilité saisonnière de l'enzyme de défense chez les moules du site de Bateau Cassé.

Par ailleurs, les activités de la CAT mesurées chez les moules du site de Bateau Cassé sont toujours supérieures à celles des moules du site de Figuier. De février à mars, des différences significatives ($p < 0.05$) sont observées entre les deux sites. De plus, d'avril à juillet, les différences d'activités de CAT entre les deux sites deviennent très significatives ($p < 0.001$).

IV.12.9/- Variation de l'activité de la Protéase

La figure (IV.30), ci-dessous, illustre les variations saisonnières de l'activité de la protéase, une enzyme digestive responsable de la conversion énergétique, mesurée chez les moules *Perna perna* des deux sites.

Les variations entre les sites ne sont pas significatives durant les mois de février, avril, mai et juin. En revanche, en mars et juillet, les différences d'activité de la protéase sont très significatives ($p < 0.001$). Les moules *Perna* du site de Figuier présentent des activités protéases nettement supérieures à celles des moules du site de Bateau Cassé. De plus, l'activité de la protéase est la plus élevée en hiver par rapport aux saisons du printemps et de l'été. Alors, pendant la saison chaude, l'activité de la protéase est très réduite, particulièrement chez les moules du site de Bateau Cassé, où l'on observe l'activité protéase la plus basse (Protéase = 8,498106 U/mL).

Une activité protéase printanière relativement stable est observée chez les moules du site Figuier. Les différences d'activités enzymatiques entre mars et avril, ainsi qu'entre mars et mai, ne sont pas significatives. Cependant, la différence entre avril et mai est significative ($p < 0.05$). De plus, la différence d'activité protéase entre juin et juillet n'est pas significative, indiquant une stabilité saisonnière.

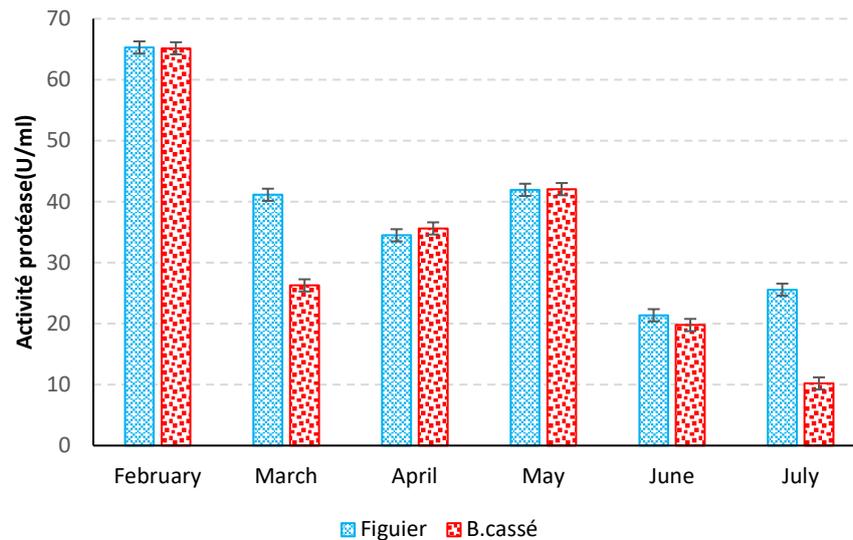


Figure IV.30 : Variation spatiotemporelle de l'activité de la protéase.

En comparaison, l'activité protéase relevée en mars montre une instabilité saisonnière de l'activité digestive chez les moules *Perna* du site Bateau Cassé. Cette instabilité métabolique est reflétée par des variations croissantes et significatives ($p < 0.01$) de l'activité protéase. Toutefois, la différence entre avril et mai n'est pas significative. En revanche, la diminution de l'activité protéase entre juin et juillet est très significative ($p < 0.01$).

❖ Résultats de l'Analyse des composantes principales (ACP)

La recherche et la force des relations binaires entre les variables (paramètres environnementaux, polluants et biomarqueurs) ont été testées à l'aide de la matrice de corrélation de *Pearson*. Le test de sphéricité de Bartlett permet de rejeter l'hypothèse nulle avec un niveau de signification α de 0,05, indiquant que les variables de la matrice de corrélation sont corrélées.

L'analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée pour discriminer les sites pour chaque mois de prélèvement (observations) en fonction de leur influence par les variables de données. L'extraction des facteurs synthétiques par ACP a été vérifiée en utilisant le test Kaiser-Meyer-Olkin (KMO). Selon Kaiser (1975), une valeur de KMO inférieure à 0,50 rend le test inacceptable.

Le test d'homogénéité de Bartlett donne une p -value $<0,0001$, ce qui montre de très fortes corrélations entre les variables. En conséquence, une analyse paramétrique via la matrice de corrélation de *Pearson* a été réalisée (Tableau IV.32).

Tableau IV.32 : Matrice de corrélation de *Pearson* des variables de données.

Variables	Temp	NH ₄	PO ₄	SPM	∑4HAPs	CI	Proteins	CAT	Protease
Temp	1	0.5993^a	0.7335^b	0.6926^a	0.1405	0.3529	-0.4410	0.5352	-0.8759^c
NH ₄		1	0.2410	0.1913	0.5848^a	0.5532	0.0928	0.8546^c	-0.5504
PO ₄			1	0.8962^c	0.1170	0.3138	-0.6790^a	0.3694	-0.5665
SPM				1	0.2121	0.5218	-0.4763	0.2972	-0.4568
∑4PAHs					1	0.6086^a	0.2802	0.6210^a	0.0336
CI						1	0.3269	0.4671	-0.1416
Proteins							1	-0.2043	0.4220
CAT								1	-0.5441
Protease									1

^a : valeurs différentes de 0 à un niveau de signification de 0.05.

^b : valeurs différentes de 0 à un niveau de signification de 0.01.

^c : valeurs différentes de 0 à un niveau de signification de 0.0005.

Les résultats du test de Pearson révèlent que la température est la variable la plus corrélée avec les autres paramètres. Des liaisons binaires ont été établies entre la température et les paramètres physicochimiques, ainsi qu'avec la protéase (une forte corrélation négative). De plus, on note de fortes corrélations positives entre la catalase et l'ammonium ($p=0.0004$) et entre les matières en suspension et les phosphates ($p<0.0001$). Les phosphates sont également corrélés positivement avec les protéines. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (PAH) sont corrélés positivement avec l'indice de condition (CI) et la catalase (CAT). Fernandez *et al.*, [536] ont trouvé des corrélations positives entre la CAT et les HAP, ainsi qu'entre l'indice de condition et les HAP dans 16 sites de moulières naturelles de la côte méditerranéenne espagnole, prélevés en mai-juin 2003.

L'extraction des facteurs synthétiques par ACP utilisant l'ensemble de données a donné un KMO de 0,49, ce qui n'est pas adéquat pour une bonne extrapolation des variables sur les plans factoriels. Un deuxième lancement de l'ACP, sans tenir compte de l'influence des protéines, a augmenté la valeur de KMO à 0,61.

L'ACP des données ainsi corrigées a permis d'extraire trois facteurs (valeurs propres supérieures à 1) avec une variance totale de 90,10%. Néanmoins, les variables ont été suffisamment chargées dans les deux facteurs F1 et F2. Le facteur 1 résume 53,97% de l'information, tandis que le facteur 2 (F2) contient 22,20 % de la variabilité des données.

La projection des variables sur le plan factoriel (F1 × F2) a permis de charger les huit variables étudiées. Sept variables sont chargées en F1, tandis que F2 est principalement représenté par la somme des quatre HAP $\Sigma 4\text{PAHs}$ (tab IV.33, fig IV.31).

Tableau IV.33 : Charges factorielles (*Factor loadings*) des variables de données.

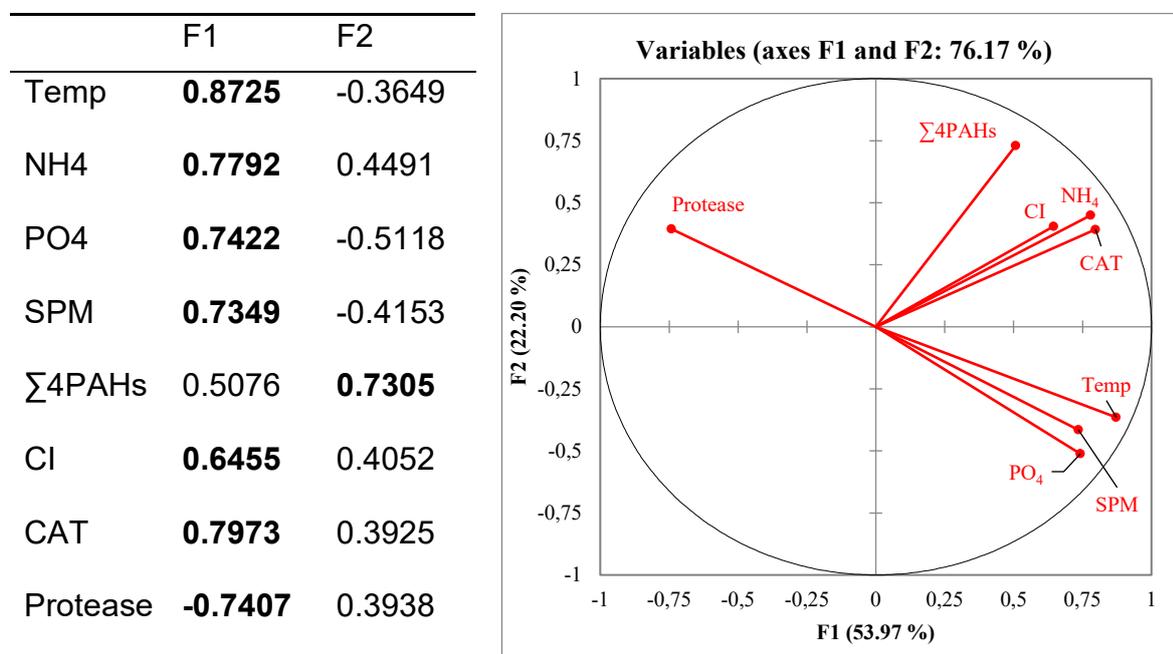


Figure IV.31 : Contribution des variables dans la formation des axes F1 et F2 en ACP.

Liu *et al.*, (2003) a proposé de classer les charges des variables sur les facteurs de la manière suivante : forte ($>0,75$), moyenne ($0,75-0,5$) et faible ($<0,5$). En conséquence, on remarque que l'axe F1 est positivement chargé avec les variables Température (forte corrélation), CAT (forte corrélation), NH₄ (forte corrélation), PO₄ (corrélation moyenne), SPM (corrélation moyenne) et Cl (corrélation moyenne). La variable Protéase est négativement corrélée en F1 avec une charge forte.

Les hydrocarbures se trouvent isolés sur l'axe F2 avec une charge moyenne. Bien que $\Sigma 4\text{PAHs}$ présente une variance maximale sur l'axe F2, sa charge sur F1 est également acceptable (corrélation positive moyenne). Cette configuration montre principalement que le stress oxydatif des moules est induit par les paramètres physicochimiques, en premier lieu la température, suivie par les nutriments, les matières en suspension puis les hydrocarbures.

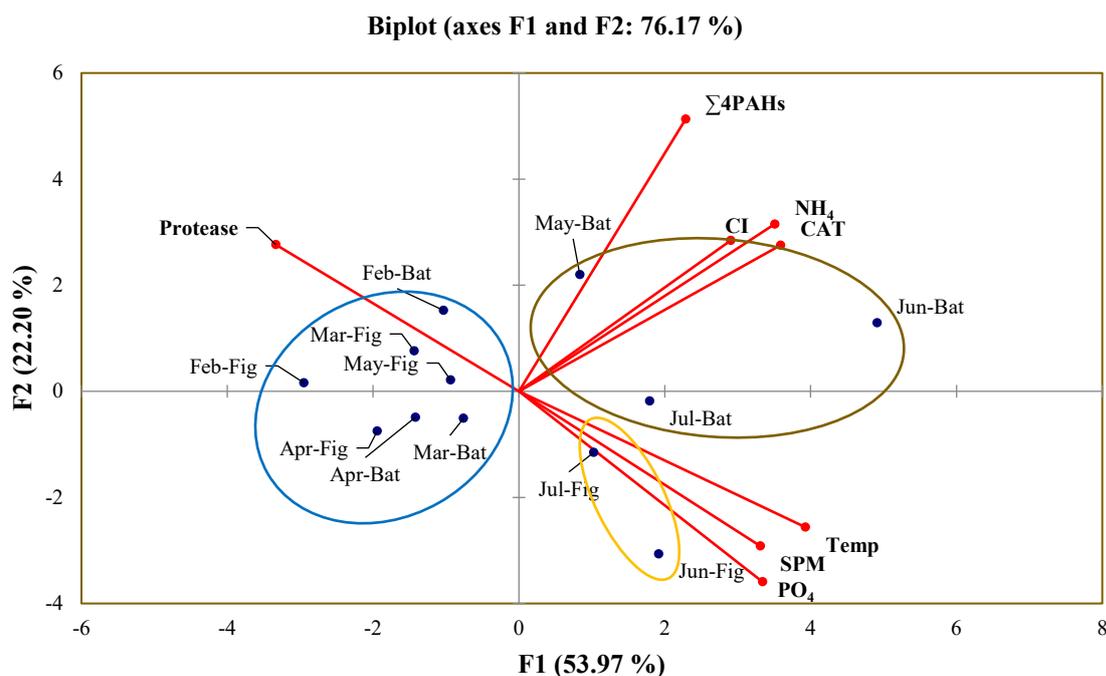


Figure IV.32 : Présentation biplot des moulières naturelles prélevées à chaque mois et des variables influençant.

La discrimination des moulières pour chaque mois de prélèvement en fonction de leur influence par les variables de données est illustrée dans la figure (IV.32) ci-dessus. Globalement, cette représentation biplot révèle que les mois de juin et juillet indiquent un enrichissement excessif en nutriments, matières en suspension, polluants PAH, un indice de condition élevé et une induction importante de la catalase pour les deux moulières naturelles. Les saisons froides et printanières enregistrent de faibles valeurs pour les paramètres physicochimiques et le biomarqueur de stress « catalase ». La sécrétion de l'enzyme protéolytique est plus prononcée en février pour les deux moulières naturelles, ce qui confirme sa forte liaison positive avec la température. Cette influence saisonnière est plus marquée pour la moulière de Figuière que pour celle de Bateau cassé.

Ainsi, la disposition des observations sur le plan factoriel ($F1 \times F2$) révèle un positionnement en progression dans le sens d'augmentation des paramètres physicochimiques, de l'indice de condition et de la catalase à chaque mois donné pour la moulière de Bateau cassé. Cela montre que cette moulière est plus influencée par les paramètres environnementaux (Température, matières en suspension SPM, nutriments et, secondairement, les hydrocarbures) par rapport à celle de Figuier, ce qui augmente le niveau de stress oxydatif ainsi que l'indice de condition.

Cet arrangement des observations (sites de prélèvement mensuels) permet de distinguer trois groupes selon leur influence par les variables de données. Le premier groupe est constitué par la moulière de Bateau cassé en juin, juillet et mai. Ce groupe, en plus d'être influencé par la température, les matières en suspension et les nutriments, est également influencé par les hydrocarbures et enregistre des valeurs élevées de l'indice de condition. Le deuxième groupe comprend la moulière de Figuier en juin et juillet. Ce groupe est caractérisé par une forte influence de la température, des matières en suspension SPM et des phosphates, avec des niveaux moins importants de la catalase et de l'indice de condition. Le troisième groupe est formé par les autres observations et affiche les plus faibles concentrations de la catalase, de l'indice de condition, des nutriments, des matières en suspension et des hydrocarbures, ainsi que des niveaux élevés de la protéase.

Dans une perspective de synthèse des résultats des mesures biochimiques des biomarqueurs catalase et protéase, on peut dire que l'augmentation des dépenses énergétiques allouées à la défense, traduite par l'induction de l'enzyme antioxydante CAT, ainsi que la perturbation de l'enzyme digestive protéase discutée précédemment, pourraient être à l'origine de l'altération de la biométrie et du métabolisme bioénergétique suite à l'exposition aux xénobiotiques. Ainsi, une forte pertinence est accordée à ces deux biomarqueurs comme signaux précoces de la dégradation de l'état de santé des organismes indicateurs, fournissant aux gestionnaires de l'environnement une information sur l'urgence des mesures à prendre pour améliorer la qualité des écosystèmes, protéger la biodiversité et préserver l'intégrité des milieux avant que les effets ne soient perceptibles à des niveaux supérieurs, aboutissant finalement à une dégradation de la qualité écologique d'un écosystème dans son ensemble.

En conclusion, les systèmes de défense antioxydants (comme CAT) sont des biomarqueurs capables d'établir un diagnostic individuel des effets des dommages dus au stress oxydant et constituent des signaux d'alarme précoces d'éventuels dommages au niveau de l'écosystème. Cependant, pour les utiliser comme éléments prédictifs des effets aux niveaux des populations et des communautés, il est nécessaire d'établir le lien entre les défenses antioxydantes et les indicateurs de l'état de santé des individus (croissance, réserves énergétiques, fonctions métaboliques etc.). En effet, une très forte pertinence est accordée à l'intégration des biomarqueurs CAT et protéase pour définir leur capacité à prédire d'éventuels effets au niveau populationnel.

❖ **Synthèse globale**

Les effluents urbains et industriels sont souvent les principaux responsables du déséquilibre écologique des écosystèmes côtiers [5, 201, 456]. Dans notre étude, nous avons réalisé plusieurs séries de tests d'écotoxicité de courte durée et chroniques pour examiner l'effet de différents xénobiotiques (ETM, phénol, colorants, rejets réels) sur les réponses métaboliques reflétant l'état de santé des espèces sentinelles de moules *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna*.

L'effet du cuivre, en tant qu'élément essentiel, a montré un impact considérable sur les taux d'induction de la CAT. Les mécanismes d'action responsables de cet effet diffèrent de ceux des éléments non essentiels comme le Cd et le Pb, qui, bien que différents entre eux, conduisent finalement à l'induction de l'activité catalase justement pour contrer le stress oxydatif enduré par les éléments métalliques. Autant, L'étude de la spéciation a permis de quantifier les différentes entités chimiques de chaque métal. Le cuivre a montré la plus large distribution, confirmant sa forte toxicité comparativement au plomb et au cadmium, dont la spéciation était très réduite avec des complexes chlorures prédominants mais surtout l'absence d'ions libres. Cette spéciation est cruciale pour comprendre les phénomènes de toxicité vis-à-vis des organismes modèles de cette étude.

Toutefois, il est important de souligner que l'application des calculs de spéciation est très délicate. En effet, ils reposent sur l'hypothèse d'un équilibre thermodynamique (égalité des vitesses de formation et de dissociation des complexes), ce qui implique des conditions physico-chimiques stables. Cependant, ces conditions sont rarement rencontrées en milieu naturel.

Par ailleurs, l'examen d'un cycle de détoxification du cuivre a permis de qualifier la réversibilité des états de stress, montrant des retours plus ou moins significatifs à l'homéostasie initiale. Cependant, la détoxification des moules en ce qui concerne les polluants organiques s'est avérée insuffisante en termes de durée. En effet, les xénobiotiques qui s'accumulent selon une cinétique linéaire sont détoxifiés par des mécanismes consommateurs d'énergie, tels que la synthèse de structures lysosomales de séquestration (granules) et de ligands cytosoliques.

Ces mécanismes constituent certainement une voie de déviation de l'énergie assimilée par rapport à sa destination essentielle qui est la croissance. En milieu naturel, ce déficit énergétique affectera probablement la population, compromettant ainsi le maintien des générations futures.

Nous avons discuté la capacité de l'enzyme antioxydante CAT à réagir face aux polluants organiques (phénol et colorants), et avons conclu sur la toxicité relative de chaque contaminant. Nous avons également constaté l'aspect non spécifique de la réponse enzymatique de la CAT aux différents types de contaminants, ce qui constitue un avantage considérable pour ce biomarqueur dans le diagnostic des situations de pollution mixte en milieu naturel. Les tests d'exposition aux effluents réels ont effectivement mis en évidence la précocité de la réponse de la CAT face au stress subi.

Par ailleurs, la cinétique de réponse de la protéase n'était pas aussi rapide que celle de la CAT. Toutefois, l'intégration des réponses des deux enzymes nous a permis de tirer des conclusions sur la stratégie des organismes marins pour surmonter les situations de stress. La balance énergétique est primordiale pour contrer les différentes agressions, la dépense prioritaire en défense étant souvent une mesure d'adaptation physiologique et/ou une indication de dommages cellulaires avancés que l'organisme ne peut plus réparer, menant ainsi à la mort de l'individu.

Ce phénomène a été particulièrement observé sous l'effet du colorant Vert Malachite (VM) et des rejets de la station de dessalement (SDE).

L'aptitude des moules à accumuler les polluants chimiques à des concentrations bien supérieures à celles de leur environnement est bien établie. Les études de terrain et de laboratoire montrent une corrélation entre les concentrations corporelles et celles du milieu, faisant des bivalves un choix de prédilection pour la surveillance de la contamination environnementale [243, 450, 476, 537]. Dans notre étude, en adoptant une stratégie de biosurveillance passive, nous avons pu établir un lien entre les niveaux de polluants bioaccumulés (HAP) par l'espèce biointégratrice *Perna perna* et les réponses enzymatiques de la catalase et de la protéase. La démarche s'est avérée pertinente en intégrant les réponses des deux biomarqueurs ; alors l'effet de la pollution se distingue clairement de celui des variations saisonnières. Par ailleurs, les répercussions de ces effets sur les niveaux supérieurs (population) se sont avérées inévitables.

Comme nous l'avons discuté auparavant, la moule, en tant qu'espèce sédentaire incapable de fuir la pollution, adopte souvent des réponses adaptatives de nature physiologique. Les mollusques bivalves peuvent fermer hermétiquement leur coquille ou leur siphon exhalant, arrêtant ainsi toute filtration en réponse à un stress environnemental. Cela réduit l'activité de filtration pour limiter la pénétration des xénobiotiques au niveau cellulaire. Nonobstant, la fermeture des valves et le recours au métabolisme anaérobie entraînent également une production excessive de ROS [538-541]. La tolérance à de faibles niveaux d'oxygène est généralement associée à une diminution de la synthèse des protéines, à la suppression des enzymes du cycle de Krebs et à un taux de production d'adénosine triphosphate (ATP) inférieur [542, 543]. Ainsi, malgré des niveaux d'oxygène réduits et des taux de renouvellement d'ATP inférieurs, une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) mitochondriales est une réponse courante à l'hypoxie [540, 544, 545]. Par conséquent, les conditions hypoxiques sont généralement associées à une augmentation des dommages cellulaires et à une perte de la fonction cellulaire [541, 542, 546].

Par ailleurs, les réponses biologiques sont fortement influencées par des facteurs intrinsèques (taille, âge, sexe, état reproducteur, etc.) et extrinsèques (facteurs abiotiques tels que la température, la salinité, etc.). L'augmentation des activités de la catalase (CAT) à des températures élevées résulte très probablement d'une augmentation des taux de filtration [257, 547, 548], ce qui conduit les moules à accumuler plus de contaminants à des températures élevées. Ainsi, la simulation des changements climatiques dans notre étude a mis en évidence des effets significatifs de la synergie entre l'augmentation de la température et la pollution par l'effluent industriel. L'étude a permis de conclure que les scénarios futurs pourraient gravement compromettre la vie des organismes marins, en particulier ceux des eaux côtières, qui sont fortement exposés aux effets anthropiques de la pollution. Par conséquent, les répercussions sur toute la chaîne trophique sont inévitables.

En outre, la reproduction représente un investissement énergétique considérable chez les bivalves. Des ajustements hormonaux et des redistributions énergétiques significatives se produisent tout au long du cycle reproducteur, avec un transfert de réserves du soma vers les gonades. Ces processus sont principalement régulés par les variations de température environnementale et par la disponibilité saisonnière de la nourriture, et ils peuvent modifier la physiologie globale d'un individu au fil des mois [549-551]. Par conséquent, il est plausible que les systèmes de détoxification ainsi que d'autres systèmes de défense soient également affectés par cet investissement reproductif, influençant ainsi la réponse des biomarqueurs.

Le statut reproducteur des bivalves peut être évalué en suivant les variations saisonnières de l'indice de condition. Après un pic de remplissage maximal des moules, la gamétogenèse entraîne une diminution notable du taux de remplissage de la coquille. Ainsi, dans cette étude, déterminer précisément la période de ponte chez l'espèce *Perna* s'est révélé difficile. Cependant, en observant l'indice de condition IC4, il est très probable qu'une ponte hivernale soit observable après février, suivie d'une autre après juin pour les moules du site de Figuiet.

En comparaison, les moules du site de Bateau Cassé montrent un décalage d'environ un mois par rapport à celles de Figuiers. En général, le cycle de reproduction des moules varie non seulement d'une région à l'autre mais aussi d'une année à l'autre, influencé par des facteurs biotiques et abiotiques qui interagissent tout au long de chaque saison. La ponte peut notamment être déclenchée par des fluctuations dans la disponibilité des nutriments dans l'eau ou par des changements brutaux de la température de l'eau [547, 550, 552].

En revanche, l'indice de condition (IC) reste parmi les indicateurs les plus fiables pour évaluer l'état global des organismes dans le cadre des études environnementales [553]. Il est souvent corrélé aux niveaux de bioaccumulation des contaminants organiques et des métaux traces. Des études ont montré qu'il existe une relation inversement proportionnelle linéaire entre le facteur de concentration des métaux traces et l'indice de condition [554].

Dans notre étude, les réponses biologiques varient considérablement d'une classe de taille de moules à l'autre, alors nous préconisons d'utiliser la classe de taille moyenne de jaunes moules dans les programmes de surveillance environnementale, qu'ils soient actifs ou passifs. En termes de maintien des générations, cette classe moyenne tend à croître avec un mécanisme de défense réduit, tandis que les premiers stades de vie sont particulièrement sensibles pour assurer la stabilité de la croissance au sein de la population. De plus, la physiologie de l'excrétion semble être spécifique à chaque espèce, ce qui implique que les stratégies d'adaptation au stress varient entre les moules *Mytilus* et *Perna*. Ces variations sont probablement influencées par les caractéristiques génétiques propres à chaque espèce.

Il est à noter que l'état de la mer peut influencer grandement la physiologie des organismes vivant dans les zones intertidales. Bien que les moules préfèrent le balancement des vagues pour augmenter leur capture de nourriture, les vagues intenses peuvent provoquer un stress, entraînant parfois une fermeture prolongée des valves. Dans les zones où les moules sont constamment submergées, les conditions environnementales sévères, telles que les vagues générées par des vents violents, induisent la production de MDA et de catalase [555].

Lors des marées basses, les moules doivent faire face à l'hypoxie voire à l'anoxie, ce qui les oblige à recourir au métabolisme anaérobie. Ces conditions peuvent parfois dépasser la capacité d'adaptation des moules.

Après une période d'hypoxie ou d'anoxie, le retour à des niveaux d'oxygène normaux entraîne généralement une augmentation significative de la production de ROS et du stress oxydatif [546, 556]. De nombreuses études ont démontré une augmentation des défenses antioxydantes chez les invertébrés marins en réponse à des périodes d'hypoxie courte, incluant les polychètes, les gastéropodes, ainsi que les bivalves comme les huîtres et les moules [541, 557-559]. Cette pré-activation du système antioxydant au début de l'hypoxie est considérée comme une réponse d'adaptation ou d'anticipation à la réoxygénation, visant à prévenir l'accumulation de dommages oxydatifs [546, 560, 561]. Ces observations soulignent l'importance de considérer ces mécanismes dans le cadre des programmes de biosurveillance passive, notamment en ce qui concerne la représentativité des échantillons ciblant les individus dans les zones supérieures des bancs naturels de moules.

Chaque approche présente ses avantages et ses limites. Les moules, en tant qu'espèces bioaccumulatrices de micropolluants, sont largement utilisées pour évaluer le niveau de contamination des sites. Cependant, il est établi que les réponses biologiques et les capacités de bioaccumulation varient selon les espèces.

Nous recommandons particulièrement l'utilisation de *Mytilus galloprovincialis*, qui s'est avérée plus résistante que *Perna perna*. Cependant, dans les programmes de surveillance environnementale, il est souvent difficile d'obtenir un approvisionnement constant en spécimens. Cela peut conduire les chercheurs, en fonction du pays, de la localisation et de la disponibilité des espèces, à travailler avec des espèces encore sensibles confrontées à divers stress externes. Cette situation peut limiter la collecte de données sur les différentes réponses mesurées chez des espèces sensibles, voire même réduire la durée d'acquisition de données en raison de la mortalité parfois élevée des individus indicateurs.

La compréhension des réponses aux stress reste cruciale pour évaluer l'impact de chaque type de polluant, car les biomarqueurs réagissent différemment en fonction de leur nature spécifique. La catalase démontre une réactivité rapide et sensible face aux divers stress, tandis que la protéase montre une sensibilité moindre aux contaminations initiales, probablement pour optimiser la demande énergétique accrue liée aux mécanismes de défense. Cependant, la réponse au sein d'un même mécanisme de défense varie selon l'enzyme considérée.

La superoxyde dismutase (SOD), souvent considérée comme la première ligne de défense antioxydante, montre dans cette étude une sensibilité plus marquée à la contamination qu'à l'effet de la température. De notre côté, nous soutenons le rôle central de la catalase comme première ligne de défense antioxydante en raison de son rôle crucial dans la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), précurseur d'autres espèces réactives de l'oxygène, notamment le radical hydroxyle (OH°). Cette réaction représente une stratégie clé des organismes marins pour prévenir les réactions complexes qui pourraient conduire à la peroxydation des lipides membranaires, perturbant ainsi la fonction cellulaire normale [4, 562].

L'étude du stress oxydatif présente une complexité due aux mécanismes impliqués et à la diversité des protocoles expérimentaux nécessitant une expertise biochimique approfondie. Il est important de noter que l'activité antioxydante peut revenir à son niveau initial après une exposition continue à un agent stressant, ce qui peut indiquer une adaptation de l'organisme. Cependant, une diminution de cette activité après une période d'induction intense peut aussi refléter un état de santé précaire de l'organisme étudié.

De plus, l'induction spécifique d'une activité antioxydante peut être compensatoire en cas de déficit d'une autre activité antioxydante, assurant ainsi le maintien du métabolisme. Cette induction peut résulter de phénomènes physiologiques normaux tels que la reproduction ou de facteurs environnementaux naturels. Par conséquent, l'utilisation d'indicateurs antioxydants requiert une connaissance approfondie des variations normales propres à l'espèce étudiée [555].

Dans notre étude, l'utilisation de modèles statistiques pour analyser les réponses biologiques s'est avérée être un ajout pertinent à la compréhension des réactions induites par l'exposition aux contaminants. Cependant, la modélisation mathématique présente plusieurs limitations à considérer.

Est-ce que notre théorie, exprimée à travers des équations mathématiques, est suffisante pour décrire fidèlement le phénomène observé dans la réalité ? Le compromis entre la complexité et la représentation fidèle du modèle est crucial dans toute tentative de modélisation. Bien que les modèles complexes puissent être très réalistes, ils peuvent inclure des paramètres inconnus qui rendent leur validation impossible. Ces modèles offrent une certaine compréhension du processus étudié, mais ne permettent pas d'augmenter la confiance en une théorie. Souvent, ils se heurtent à des lacunes de connaissances concernant les processus biologiques fondamentaux et leurs mécanismes, qui ne peuvent être remplacés par des techniques mathématiques.

Ainsi, le dilemme en modélisation réside dans la tentative de décrire autant de processus que possible sans compromettre le réalisme et l'applicabilité du modèle.

CONCLUSION

L'objectif principal de ce travail était de mettre au point et de montrer l'intérêt d'utiliser des outils biologiques (bioindicateurs, biomarqueurs) dans le cadre du suivi de l'environnement et de la santé des écosystèmes aquatiques lors d'expériences *in vivo* et *in situ*.

A ce propos, les séries de tests d'écotoxicité à courte durée visaient d'abord à examiner l'effet du cuivre (métal essentiel), du plomb et du cadmium (métaux non essentiels) sur les réponses métaboliques des moules *Mytilus* et *Perna*. Concernant le statut des mécanismes de défense contre le stress oxydatif, le cuivre s'est révélé plus toxique que le plomb et le cadmium, avec des mécanismes d'action dépendant du métal. La moule *Perna* a montré une sensibilité accrue à la contamination par rapport à la moule *Mytilus*. Ainsi, une attention particulière doit être accordée à la toxicité des éléments essentiels, notamment le cuivre, tandis qu'il est préférable d'utiliser la moule *Mytilus* comme espèce indicatrice de l'état de contamination des milieux aquatiques.

Pour les faibles concentrations d'exposition au cuivre, la durée de détoxication se révèle suffisante pour que les moules retrouvent leur homéostasie initiale grâce à l'activité synergique de la CAT, qui neutralise les ROS, et de la protéase, qui satisfait les besoins énergétiques au profit du mécanisme de défense. Cependant, les contaminants organiques, en particulier le vert de malachite, se révèlent très toxiques, inhibant fortement l'induction de la CAT et provoquant des atteintes cellulaires sévères, voire la mortalité des moules lors du cycle de détoxication. Ainsi, les atteintes cellulaires chez les moules dépendent à la fois de la concentration et du type de contaminant.

En milieu naturel, les polluants sont présents en mélange et la matrice est si complexe que les organismes marins, en particulier ceux des zones côtières, sont exposés à une multitude de stressseurs. Les moules de taille moyenne, *Mytilus* et *Perna*, montrent une plus grande résistance à la contamination par les rejets industriels, avec un métabolisme plus stable, comparativement aux grandes moules, qui ont un mécanisme de défense affaibli, et aux petites moules, qui présentent une hyperactivité métabolique pour contrer le stress oxydatif.

Ces effets ont des répercussions très négatives sur la population, compromettant la survie des générations futures en cas d'exposition prolongée aux effluents réels. En effet, les moules de taille moyenne se sont révélées incapables de surmonter la contamination lors d'une exposition aux rejets de la station de dessalement, montrant des mortalités très élevées après seulement 96 heures d'exposition.

Par ailleurs, la combinaison synergique de l'exposition aux rejets et de l'élévation du gradient thermique compromet la survie des organismes aquatiques. La catalase se montre très sensible à l'effet de ces deux facteurs, s'avérant ainsi un biomarqueur plus pertinent que la SOD, qui s'est trouvée principalement sensible à la contamination.

Par ailleurs, la démarche adoptée pour la surveillance des eaux côtières par l'approche passive c'est révélé très pertinente en intégrant les deux biomarqueurs CAT et protéase. Les effets de la saison sont clairement distingués de ceux de la pollution et le site de bateau cassé se manifeste plus contaminé avec des taux très marqués de la catalase. Par sa capacité biointégratrice la moule *Perna* nous a facilité l'identification de plusieurs type d'HAP et voir même la quantification de quatre d'entre eux.

Pour finaliser, les modèles statistiques établis pour décrire les réponses enzymatiques et les teneurs protéiques mesurée chez les moules sont très satisfaisant en termes d'explication de la variation des réponses biologique encore plus prédictifs en décrivant les réponses de la catalase. Ils nous ont facilité la compréhension des relation doses-durée/effet plus particulièrement. Nonobstant, la modélisation est vaste et complexe, surtout dans le contexte des phénomènes biologiques, alors l'applicabilité mathématique doit donc être abordée avec une grande prudence.

Il est important de noter que l'utilisation des biomarqueurs présente de nombreux inconvénients et limitations. Bien qu'ils soient capables d'évaluer les risques écotoxicologiques en identifiant la signature biologique de l'impact ou de la présence d'un contaminant dans un organisme vivant, il n'existe pas de biomarqueur parfait et universel. La pertinence d'un biomarqueur varie en fonction de divers paramètres, rendant impossible toute généralisation de son efficacité dans toutes les situations clairement définies.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. Akaishi, F.M., et al., *Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (Mytilus edulis) exposed to treated and untreated municipal wastewater*. 2007. **82**(1): p. 1-14.
2. Borgia, V.F., et al., *Effects of effluent from electroplating industry on the immune response in the freshwater fish, Cyprinus carpio*. 2018. **79**: p. 86-92.
3. Kopecka, J., et al., *Measurements of biomarker levels in flounder (Platichthys flesus) and blue mussel (Mytilus trossulus) from the Gulf of Gdańsk (southern Baltic)*. 2006. **53**(8-9): p. 406-421.
4. Perić, L., et al., *Variations of biomarkers response in mussels Mytilus galloprovincialis to low, moderate and high concentrations of organic chemicals and metals*. 2017. **174**: p. 554-562.
5. Sparks, C., et al., *Baseline levels of antioxidant activities in Mytilus galloprovincialis along the coast of Cape Town, South Africa*. 2019. **140**: p. 287-293.
6. Flammarion, P., A. Devaux, and J. Garric, *Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Exemples d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire*. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture, 2001(357-360): p. 209-226.
7. Lagadic, L., T. Caquet, and J. Amiard, *Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions (introduction)*. Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux., 1997.
8. Lagadic, L., et al., *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. 1998: Lavoisier, Technique et Documentation.
9. Green, N., et al., *Coordinated Environmental Monitoring Programme (CEMP). Levels, trends and effects of hazardous substances in fjords and coastal waters-2007*. 2008.
10. Taleb, Z.M., et al., *Biomonitoring of environmental pollution on the Algerian west coast using caged mussels Mytilus galloprovincialis*. 2009. **51**(1): p. 63-84.
11. Viarengo, A., et al., *Networking and expert-system analysis: next frontier in biomonitoring*. 2000. **49**(5): p. 483-486.
12. Viarengo, A., et al., *Critical evaluation of an intercalibration exercise undertaken in the framework of the MED POL biomonitoring program*. 2000. **49**(1): p. 1-18.
13. Barillet, S., *Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (Danio rerio)*. 2007, Université de Metz.
14. Casas, S., *Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, Mytilus galloprovincialis, en milieu méditerranéen*. 2005, Université du Sud Toulon Var.
15. Nakhle, K., *Le mercure, le cadmium et le plomb dans les eaux littorales libanaises: apports et suivi au moyen de bioindicateurs quantitatifs (éponges, bivalves et gastéropodes)*. 2003, Université Paris 7.
16. Brooks, S.J., et al., *Differences in copper bioaccumulation and biological responses in three Mytilus species*. 2015. **160**: p. 1-12.

17. Casas, S. and C.J.J.o.s.R. Bacher, *Modelling trace metal (Hg and Pb) bioaccumulation in the Mediterranean mussel, Mytilus galloprovincialis, applied to environmental monitoring*. 2006. **56**(2): p. 168-181.
18. Mejdoub, Z., et al., *Oxidative stress responses of the mussel Mytilus galloprovincialis exposed to emissary's pollution in coastal areas of Casablanca*. *Ocean & coastal management*, 2017. **136**: p. 95-103.
19. Amiard, J.-C. and C. Amiard-Triquet, *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Vol. 375. 2008: Lavoisier Paris.
20. Aslan, E., et al., *An investigation on the seasonal variations of the biomarkers of oxidative stress response and their correlations to Polonium-210 in mussel (Mytilus galloprovincialis) and common sole (Solea solea) from İzmir Bay, Turkey*. 2018. **189**: p. 103-108.
21. Bessi, H. and M.J.L.t.d.l. El Alami, *Les bio-essais dans l'évaluation d'impact des polluants sur les écosystèmes dulçaquicoles*. 2009. **4**(15).
22. Forbes, V.E., et al., *The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology*. 2006. **25**(1): p. 272-280.
23. Fossi, M., et al., *Use of nondestructive biomarkers and residue analysis to assess the health status of endangered species of pinnipeds in the south-west Atlantic*. 1997. **34**(3): p. 157-162.
24. Orbea, A., et al., *Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay)*. 2002. **58**(1-2): p. 75-98.
25. Ruiz, P., et al., *Responses of conventional and molecular biomarkers in turbot *Scophthalmus maximus* exposed to heavy fuel oil no. 6 and styrene*. 2012. **116**: p. 116-128.
26. Van der Oost, R., J. Beyer, and N.P. Vermeulen, *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2003. **13**(2): p. 57-149.
27. Balbi, T., et al., *Impact of bisphenol A (BPA) on early embryo development in the marine mussel Mytilus galloprovincialis: effects on gene transcription*. 2016. **218**: p. 996-1004.
28. Barut, I.F., E. Meric, and M.B.J.O. Yokeş, *Assessment of recent and chalcolithic period environmental pollution using Mytilus galloprovincialis Lamarck, 1819 from Yarimburgaz Cave, the northern Marmara Sea and Bosphorus coasts*. 2016. **58**(2): p. 135-149.
29. Danellakis, D., et al., *Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: alterations of stress indices in tissues of mussel Mytilus galloprovincialis*. 2011. **101**(2): p. 358-366.
30. Giandomenico, S., et al., *Chlorinated compounds and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in mussels (Mytilus galloprovincialis) collected from Apulia Region coasts*. 2013. **73**(1): p. 243-251.
31. Torre, A., F. Trischitta, and C.J.T.i.V. Faggio, *Effect of CdCl₂ on regulatory volume decrease (RVD) in Mytilus galloprovincialis digestive cells*. 2013. **27**(4): p. 1260-1266.

32. Vidal-Liñán, L., et al., *Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, Mytilus galloprovincialis, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain)*. 2010. **78**(3): p. 265-272.
33. Fatima, B., *LA POLLUTION MARINE: CADRE JURIDIQUE ET INSTITUTIONNEL*. 2014.
34. Kamel, N., *Effets combinés des facteurs environnementaux et des polluants chimiques chez la moule Mytilus galloprovincialis: harmonisation des biomarqueurs d'exposition suivant les recommandations OSPAR et MEDPOL*. 2014, Nantes.
35. LA MEDITERRANEE, P.D.A.P., *PROGRAMME D'AMENAGEMENT COTIER (PAC) DE LA «ZONE COTIERE ALGEROISE» RAPPORT FINAL INTEGRE*. 2006.
36. Pörtner, H.-O., et al., *Ocean systems, in Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. Part A: global and sectoral aspects. contribution of working group II to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. 2014, Cambridge University Press. p. 411-484.
37. Burke, L., et al., *Coastal Zone: Extent and Change*. Coastal Ecosystems, 2001.
38. Kennedy, V.S., et al., *Coastal and marine ecosystems & global climate change*. 2002, Pew Center on Global Climate Change.
39. Meng, L., C.D. Orphanides, and J. Christopher Powell, *Use of a fish index to assess habitat quality in Narragansett Bay, Rhode Island*. Transactions of the American Fisheries Society, 2002. **131**(4): p. 731-742.
40. Franco, A., P. Franzoi, and P. Torricelli, *Structure and functioning of Mediterranean lagoon fish assemblages: A key for the identification of water body types*. Estuarine, coastal and shelf science, 2008. **79**(3): p. 549-558.
41. Elliott, M., et al., *The guild approach to categorizing estuarine fish assemblages: a global review*. Fish and fisheries, 2007. **8**(3): p. 241-268.
42. Bowen, R.E. and M.H. Depledge, *Rapid assessment of marine pollution (RAMP)*. Marine Pollution Bulletin, 2006. **53**(10-12): p. 631-639.
43. Falardeau, J., *Les effets des changements climatiques sur la zone littorale du sud-est de la mer de Beaufort, bassin Herschel, Canada, à partir d'enregistrements micropaléontologiques*. 2023.
44. Petitgas, P., et al., *Conséquences du changement climatique sur les écosystèmes marins exploités par la pêche et la conchyliculture*. Etudes Marines, 2020(18): p. 40-53.
45. Schulte, P.M., *Responses to environmental stressors in an estuarine fish: Interacting stressors and the impacts of local adaptation*. Journal of Thermal Biology, 2007. **32**(3): p. 152-161.
46. Sinane, K., et al., *Fragilisation et modification des formations littorales meubles sur l'île d'Anjouan (Comores): Quand l'érosion d'origine anthropique se conjugue au changement climatique*. VertigO-la revue électronique en sciences de l'environnement, 2011. **10**(3).
47. Cazenave, A., et al. *Changements Environnementaux Côtiers: Impact de la hausse du niveau de la mer*. in *Faire face aux changements climatiques/Les apports de la recherche collaborative sur projets*. 2015.
48. Harley, C.D., et al., *The impacts of climate change in coastal marine systems*. Ecology letters, 2006. **9**(2): p. 228-241.

49. Trombetta, T., *Initiation des efflorescences phytoplanctoniques en zone côtière: le rôle de la température et des interactions biologiques*. 2019, Université Montpellier.
50. Benoît, S., *Influence de la variabilité climatique sur les communautés zooplanctoniques des zones côtières: importance des suivis à long terme*. 2019, Bordeaux.
51. Boudry, P., et al., *Rapport annuel 2017 de l'unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins (PFOM)*. 2018.
52. Brierley, A.S. and M.J. Kingsford, *Impacts of climate change on marine organisms and ecosystems*. *Current biology*, 2009. **19**(14): p. R602-R614.
53. Le Roux, F., et al., *Rapport d'activité 2021. UNITE RBE/PFOM. Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins*. 2022.
54. Boudry, P., et al., *Rapport d'activité 2015-Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins*. 2016.
55. Przeslawski, R., et al., *Beyond corals and fish: the effects of climate change on noncoral benthic invertebrates of tropical reefs*. *Global Change Biology*, 2008. **14**(12): p. 2773-2795.
56. Pham, D., *Les capacités osmorégulatrices chez la crevette bleue *Litopenaeus stylirostris*, au cours de l'ontogenèse*. 2011, Université de la Polynésie Française.
57. Lassoued, J., *Étude des sécrétions coquillière et byssale de la moule *Mytilus galloprovincialis*: Influence de l'augmentation de la température et de l'acidification de l'eau et possibilités de valorisation*. 2021.
58. Bergouignan, C.D., *Futur démographique et enjeux environnementaux dans les pays riverains de la Méditerranée*. 2021.
59. Chalghmi, H., *Etude de la pollution marine par les hydrocarbures et caractérisation de leurs effets biochimiques et moléculaires sur la palourde de *Ruditapes* sp.* 2015, Université de Bordeaux; Université de Monastir (Tunisie).
60. Pedone, E.A., *LE TRANSPORT MARITIME ET LA PROTECTION DE LA BIODIVERSITÉ*. 2021.
61. Albakjaji, M., *La pollution de la mer Méditerranée par les hydrocarbures liée au trafic maritime*. 2010, Université Paris-Est.
62. Duschesne, T., *La protection de l'environnement en Méditerranée*. *Revue Défense Nationale*, 2019(7): p. 33-38.
63. Burger, J., et al., *Metal levels in flathead sole (*Hippoglossoides elassodon*) and great sculpin (*Myoxocephalus polyacanthocephalus*) from Adak Island, Alaska: potential risk to predators and fishermen*. *Environmental Research*, 2007. **103**(1): p. 62-69.
64. Desjardins, K., *Comportement de métaux traces dans des milieux aquatiques perturbés: approches cellulaires et biogéochimiques*. 2024.
65. El Idrissi, L., *CYTOTOXICITÉ DU CADMfUM, DU PLOMB ET DU MERCURE ET CARACTÉRISATION DU TRANSPORT MEMBRANAIRE DE CADMfUM DANS LES CELLULES ALVÉOLAIRES (A549)*. 2009.
66. Bendjama, A., et al., *CARACTERISATION DES MATERIAUX BIOLOGIQUES ISSUS D'UNECOSYSTEME NATUREL «PNEK» SITUE AU NORD-EST DE L'ALGERIE*. *journal de la société algérienne de chimie*, 2011. **21**(JSAC): p. 45-58.

67. Zebracki, M., *Devenir des polluants métalliques associés aux sédiments contaminés dans un cours d'eau en relation avec la dynamique sédimentaire*. Université Paris-Sud XI, France, 2008.
68. BELABED, B.-e., *La pollution par les métaux lourds dans la région d'annaba*. 2010, Université de Annaba-Badji Mokhtar.
69. Djeddi, H., et al., *Teneurs des éléments traces métalliques Cu, Zn et Pb des sédiments du barrage Béni Haroun (Nord-Est de l'Algérie)*. European Scientific Journal, 2018. **15**(15): p. 269.
70. ATHMANI, H., *ETUDE GEOCHIMIQUE DES METAUX TRACES DANS LES MILIEUX MARINS ET LACUSTRES*. 2022, Faculté des Sciences et de la technologie.
71. Taleb, M. and Z. Boutiba, *La moule Mytilus galloprovincialis: bioindicateur de pollution marine-Cas du port d'Oran*. Sciences & Technologie. C, Biotechnologies, 2007: p. 59-64.
72. Vranken, I., *Pollution et contamination des sols aux métaux lourds dues à l'industrie métallurgique à Lubumbashi: Empreinte écologique, impact paysager, pistes de gestion*. Université Libre de Bruxelles, 2010. **118**.
73. KANE, P.A., *PROGRAMME D'ACTION MONDIALE POUR LA PROTECTION DU MILIEU MARIN CONTRE LA POLLUTION DUE AUX ACTIVITES TERRESTRES: LE CAS DU SENEGAL*. Département de Géographie Université Cheikh Anta DIOP de Dakar, 2014.
74. Leonardo, T., *Mécanismes d'accumulation et impact biologique de l'argent et du cobalt chez la micro-algue Coccomyxa actinabiotis*. 2014, Grenoble.
75. Miquel, G., *Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé*. 2001: Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.
76. Louis, Y., *Mise au point d'une systématique de caractérisation des interactions Matière Organique Naturelle Dissoute (MOND)–Contaminants métalliques*. 2008, Université du Sud Toulon Var.
77. MARLIERE, M.B.E.B.-M. and D.O. GENESTE, *EXPERTS AYANT PARTICIPÉ A LA RÉDACTION*. 2019.
78. Lespagnol, G., *Lixiviation du Chrome, du Cuivre et de l'Arsenic (CCA) à partir de sols contaminés sur des sites de traitement du bois*. 2003, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.
79. Pichard, A., et al., *Cuivre et ses dérivés*. Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques¹ INERIS PDREC-02-25590-02DF54, 2005.
80. Stern, B.R., et al., *Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 2007. **10**(3): p. 157-222.
81. Viala, A., A. Botta, and C. Bismuth, *Toxicologie*. 2005.
82. Badassan, T., *Evaluation de la contamination des éléments traces dans les eaux et sédiments de la lagune de Lomé et bioaccumulation chez deux espèces de poisson*. 2021, Institut National Polytechnique de Toulouse-INPT; Université de Lomé (Togo).
83. BOUDEHANE, A., et al., *Validation d'une méthode analytique de dosage du cuivre urinaire par Spectrométrie d'Absorption Atomique Flamme*. 2020.

84. Métivier, C., *Développement d'une approche théranostique utilisant le cuivre-64 dans un modèle murin de myélome multiple*. 2023, Nantes Université.
85. Metsu, D., S. Caspar-Bauguil, and A. Galinier, *Carences et excès en micronutriments*. Nutrition Clinique et Métabolisme, 2023.
86. PEREZ, M.G., *AGENTS BIOACTIFS À BASE DE CUIVRE AVEC DES APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES ET BIOMÉDICALES*. 2024.
87. Janova, A., et al., *New insights into mechanisms of copper nanoparticle toxicity in freshwater algae Chlamydomonas reinhardtii: Effects on the pathways of secondary metabolites*. Algal Research, 2021. **60**: p. 102476.
88. Flemming, C. and J. Trevors, *Copper toxicity and chemistry in the environment: a review*. Water, air, and soil pollution, 1989. **44**: p. 143-158.
89. Gilbin, R., *Caractérisation de l'exposition des écosystèmes aquatiques à des produits phytosanitaires: spéciation, biodisponibilité et toxicité. Exemple du cuivre dans les eaux de ruissellement de parcelles viticoles (Roujan, Hérault, France)*. 2001, Université Montpellier I; University of Geneva.
90. Naddy, R.B., et al., *The effect of calcium and magnesium ratios on the toxicity of copper to five aquatic species in freshwater*. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 2002. **21**(2): p. 347-352.
91. Malhotra, N., et al., *Review of copper and copper nanoparticle toxicity in fish*. Nanomaterials, 2020. **10**(6): p. 1126.
92. Poëy, J. and C. Philibert, *Toxicité des métaux*. Revue Française des Laboratoires, 2000. **2000**(323): p. 35-43.
93. Pichard, A., et al., *Cadmium et ses dérivés*. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS, Verneuil-en-Halatte, 2005.
94. Andujar, P., L. Bensefa-Colas, and A. Descatha, *Intoxication aiguë et chronique au cadmium*. La Revue de médecine interne, 2010. **31**(2): p. 107-115.
95. El Makhfouk, M., A. Souissi, and M. El Meray, *Analyse de la fraction labile du zinc, cadmium, plomb et du cuivre dissous en milieu marin côtier par la redissolution anodique à impulsions différentielles*. Comptes rendus. Chimie, 2003. **6**(7): p. 689-693.
96. Bohic, S., et al., *Biological roles of trace elements in the brain with special focus on Zn and Fe*. Revue Neurologique, 2010. **167**(4): p. 269-279.
97. Apostoli, P., *Elemental speciation in human health risk assessment*. Vol. 234. 2006: World Health Organization.
98. Moustaid, K., et al., *Évaluation comparée de la toxicité des moules (Mytilus galloprovincialis) de deux sites du littoral atlantique marocain sur des souris*. Comptes Rendus Biologies, 2005. **328**(3): p. 281-289.
99. Swynghedauw, B. and J.-L. Wemeau, *Rapport 20-07. Conséquences du changement climatique sur la santé humaine et animale*. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 2021. **205**(3): p. 219-226.
100. GUEDENON, P., et al., *Détermination in vitro de la concentration létale médiane du cadmium sur le poisson de l'espèce Clarias gariepinus*. Int. J. Biol. Chem. Sci, 2011. **5**(6): p. 2497-2501.

101. CHOUAHDA, S. and N. SOLTANI, *TOXICITÉ AIGUË ET CHRONIQUE DU CADMIUM CHEZ UN POISSON CULICIPHAGE: GAMBUSIA AFFINIS*. Bull. Soc. zool. Fr, 2013. **138**(1-4): p. 115-126.
102. Fraser, M., *Effets des métaux sur le système sérotonine de la moule (Mytilus edulis) et du trophoblaste placentaire humain*. 2016, Institut National de la Recherche Scientifique (Canada).
103. Desenfant, F., *Tracage des circulations atmosphériques et océaniques en Atlantique Nord Subtropical à partir d'enregistrements géochimiques (Isotopes du Plomb et de l'oxygène) contenus dans le squelette des coraux massifs*. 2004, Université de droit, d'économie et des sciences-Aix-Marseille III.
104. Boutron, C., et al., *L'archivage des activités humaines par les neiges et glaces polaires: le cas du plomb*. Comptes Rendus Geoscience, 2004. **336**(10): p. 847-867.
105. Garnier, R., *Toxicité du plomb et de ses dérivés*. EMC-Toxicologie-pathologie, 2005. **2**(2): p. 67-88.
106. Laperche, V., et al., *Guide méthodologique du plomb, appliqué à la gestion des sites et sols pollués*. Orléans, France: BRGM, 2004.
107. Le Gal, Y., *Biochimie marine*. 1988: Masson Paris.
108. Chanel, O., et al., *Plomb dans l'environnement: quels risques pour la santé?* 1999, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM).
109. Sigg, L., P. Behra, and W. Stumm, *Chimie des milieux aquatiques*. 2001: Dunod Paris, France.
110. Pétré, M., *Etude de la spéciation des métaux traces dissous en Seine*. Relation avec le, 2008.
111. Pelletier, É. and P.G. Campbell, *L'écotoxicologie aquatique-comparaison entre Les micropolluants organiques et Les métaux: constats actuels et défis pour L'avenir*. Revue des sciences de l'eau, 2008. **21**(2): p. 173-197.
112. Rollemberg, M. and M.S. Gonçalves, *Kinetics of uptake of cadmium by Chlorella marina in different media*. Bioelectrochemistry, 2000. **52**(1): p. 57-62.
113. Vasconcelos, M.T.S. and M.F.C. Leal, *Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae*. Marine Chemistry, 2001. **74**(1): p. 65-85.
114. Wildgust, M. and M. Jones, *Salinity change and the toxicity of the free cadmium ion [Cd²⁺ (aq)] to Neomysis integer (Crustacea: Mysidacea)*. Aquatic Toxicology, 1998. **41**(3): p. 187-192.
115. Le Goff, F. and V. Bonnomet, *Devenir et comportement des métaux dans l'eau: biodisponibilité et modèles BLM*. INERIS, PARIS, 2004.
116. Mackay, D. and A. Fraser, *Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models*. Environmental pollution, 2000. **110**(3): p. 375-391.
117. Veltman, K., et al., *Accumulation of organochlorines and brominated flame retardants in estuarine and marine food chains: field measurements and model calculations*. Marine Pollution Bulletin, 2005. **50**(10): p. 1085-1102.
118. de Vos, M.G., et al., *Accumulation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in the food chain of the Western Scheldt estuary: Comparing field measurements with kinetic modeling*. Chemosphere, 2008. **70**(10): p. 1766-1773.

119. Deudero, S., et al., *Organic compounds temporal trends at some invertebrate species from the Balearics, Western Mediterranean*. Chemosphere, 2007. **68**(9): p. 1650-1659.
120. Kumar, S., et al., *Fuzzy filtering for robust bioconcentration factor modelling*. Environmental Modelling & Software, 2009. **24**(1): p. 44-53.
121. Lai, K., M. Scrimshaw, and J. Lester, *Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems*. Science of the Total Environment, 2002. **289**(1-3): p. 159-168.
122. Chou, B.Y.-H., et al., *Toxicokinetics/toxicodynamics of arsenic for farmed juvenile milkfish *Chanos chanos* and human consumption risk in BFD-endemic area of Taiwan*. Environment international, 2006. **32**(4): p. 545-553.
123. Cowan-Ellsberry, C.E., et al., *Approach for extrapolating in vitro metabolism data to refine bioconcentration factor estimates*. Chemosphere, 2008. **70**(10): p. 1804-1817.
124. Nichols, J.W., I.R. Schultz, and P.N. Fitzsimmons, *In vitro–in vivo extrapolation of quantitative hepatic biotransformation data for fish: I. A review of methods, and strategies for incorporating intrinsic clearance estimates into chemical kinetic models*. Aquatic Toxicology, 2006. **78**(1): p. 74-90.
125. Geffard, A., *Reponses du biota a la contamination polymetallique d'un milieu estuarien, la gironde, fr: exposition, impregnation, induction d'une proteine de detoxication, la metallothioneine, impact au niveau individuel et populationnel.(doctorat ecotoxicologie)*. 2001, Nantes.
126. Gourlay, C., *Biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les écosystèmes aquatiques: influence de la matière organique naturelle et anthropique*. 2004, ENGREF (AgroParisTech).
127. Worms, I., et al., *Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake*. Biochimie, 2006. **88**(11): p. 1721-1731.
128. Geffard, O., *Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés: évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires*. 2001, Bordeaux 1.
129. Baykan, U., G. Atli, and M. Canli, *The effects of temperature and metal exposures on the profiles of metallothionein-like proteins in *Oreochromis niloticus**. Environmental toxicology and pharmacology, 2007. **23**(1): p. 33-38.
130. Mauffret, A., et al., *Évaluation du descripteur 8 «Contaminants dans le milieu marin» en France métropolitaine. Rapport scientifique pour l'évaluation cycle 3 au titre de la DCSMM*. 2023.
131. Hylland, K., *Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2006. **69**(1-2): p. 109-123.
132. Vignet, C., *Altération de la physiologie des poissons exposés à des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP): comportement et reproduction*. 2014, Université de La Rochelle.
133. Mojiri, A., et al., *Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments*. Science of the Total Environment, 2019. **696**: p. 133971.

134. Tobiszewski, M. and J. Namieśnik, *PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources*. Environmental pollution, 2012. **162**: p. 110-119.
135. Authority, E.F.S., *Polycyclic aromatic hydrocarbons in food-scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain*. EFSA journal, 2008. **6**(8): p. 724.
136. Barhoumi, B., *Biosurveillance de la pollution de la lagune de Bizerte (Tunisie) par l'analyse comparée des niveaux de contamination et de l'écotoxicité des sédiments et du biote*. 2014, Bordeaux.
137. Pichaud, N., *Effets biologiques d'une exposition par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sur une espèce bioindicatrice, Mya Arenaria*. 2005, Université du Québec à Rimouski.
138. Dû-Lacoste, L., *Etude des phénomènes de biotransformation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons): relation exposition-génotoxicité*. 2008, Bordeaux 1.
139. Honda, M. and N. Suzuki, *Toxicities of polycyclic aromatic hydrocarbons for aquatic animals*. International journal of environmental research and public health, 2020. **17**(4): p. 1363.
140. Hillenweck, A., et al., *Characterization of biliary metabolites of fluoranthene in the common sole (Solea solea)*. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 2008. **27**(12): p. 2575-2581.
141. Vethaak, A.D., et al., *Decadal trends in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination assessed by 1-hydroxypyrene in fish bile fluid in the Netherlands: Declining in marine waters but still a concern in estuaries*. Frontiers in Marine Science, 2016. **3**: p. 215.
142. Wessel, N., et al., *Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (Solea solea)*. Marine Environmental Research, 2010. **69**: p. S71-S73.
143. Chermat, M., Z. Kermiche, and M. Mme Zamouche, *Utilisation de charbon actif en poudre dans un procédé d'adsorption du phénol en milieu aqueux*. 2018.
144. Ehtash, M., *Purification des eaux polluées par du phénol dans un pertracteur à disques tournants*. 2011, INSA de Rouen.
145. Vignes, J., G. André, and F. Kapala, *Données industrielles, économiques, géographiques sur les principaux produits chimiques, métaux et matériaux*. Chrome, Société chimique de France, 2013. **2014**.
146. ATSDR, U., *CERCLA priority list of hazardous substances*. <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>, 2007.
147. Hecini, L. and S. Achour, *Coagulation-floculation au sulfate d'aluminium de composés organiques phénoliques et effet de sels de calcium et de magnésium*. Revue des sciences de l'eau, 2014. **27**(3): p. 271-280.
148. Crawford, J., et al., *Toxicological profile for phenol*. 2008.
149. Bisson, M., et al., *Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques*. Zinc et ses dérivées, 2005. **69**.
150. Adak, A. and A. Pal, *Removal of phenol from aquatic environment by SDS-modified alumina: Batch and fixed bed studies*. Separation and Purification Technology, 2006. **50**(2): p. 256-262.

151. Mohanty, K., D. Das, and M. Biswas, *Adsorption of phenol from aqueous solutions using activated carbons prepared from Tectona grandis sawdust by ZnCl₂ activation*. Chemical Engineering Journal, 2005. **115**(1-2): p. 121-131.
152. Barrios-Martinez, A., et al., *Degradation of synthetic phenol-containing wastewaters by MBR*. Journal of Membrane Science, 2006. **281**(1-2): p. 288-296.
153. Jiang, H., et al., *Studies on the extraction of phenol in wastewater*. Journal of Hazardous Materials, 2003. **101**(2): p. 179-190.
154. Vasu, A.E., *Removal of phenol and o-cresol by adsorption onto activated carbon*. Journal of Chemistry, 2008. **5**(2): p. 224-232.
155. Huang, J., et al., *Removal of phenol from aqueous solution by adsorption onto OTMAC-modified attapulgite*. Journal of environmental management, 2007. **84**(2): p. 229-236.
156. Mansour, H.B., et al., *Les colorants textiles sources de contamination de l'eau: CRIBLAGE de la toxicité et des méthodes de traitement*. Revue des sciences de l'eau, 2011. **24**(3): p. 209-238.
157. Chebli, D., *Traitement des eaux usées industrielles: Dégradation des colorants azoïques par un procédé intégré couplant un procédé d'oxydation avancée et un traitement biologique*. 2018.
158. Lemlikchi, W., *Elimination de la pollution des eaux industrielles par différents procédés d'oxydation et de co-précipitation*. 2012, Université Mouloud Mammeri.
159. AMRANI, S., A. FOUGER, and H. AGUEDAL, *Optimisation du processus d'adsorption à l'aide d'un plan d'expérience*. 2023, UNIVERSITE AHMED DRAIA-ADRAR.
160. DAHOU, A., N. HALA, and L. OUAZINE, *Modélisation par la méthode du plan d'expériences de la capacité d'adsorption des colorants par des microsphères préparées par la méthode de pulvérisation séchage*. 2021, UNIVERSITE AHMED DRAIA-ADRAR.
161. Zamouche, M. and M. Bencheikh Lehocine, *Etude et caractérisation de certains matériaux comme adsorbants*. 2016, Université Constantine 3 Salah Boubnider, Faculté de génie des procédés
162. BELBACHIR, I., *Modification de la Bentonite de Maghnia et Applications dans l'adsorption de colorants textiles et de métaux lourds*. 2018, 23-10-2018.
163. BENZANA, K., *Synthèse et caractérisation de nouveau gel à base d'alginate pour la dépollution des eaux*. 2018, université ibn khaldoun-tiaret.
164. Hammami, S., *Étude de dégradation des colorants de textile par les procédés d'oxydation avancée. Application à la dépollution des rejets industriels*. 2008, Université de Marne la Vallée.
165. Dubreil-Cheneau, E., *Résidus marqueurs de colorants dans les poissons d'aquaculture: étude du métabolisme des colorants chez le poisson par des modèles in vitro et in vivo*. 2020, Université de Rennes 1.
166. Kovacic, P. and R. Somanathan, *Toxicity of imine–iminium dyes and pigments: electron transfer, radicals, oxidative stress and other physiological effects*. Journal of Applied Toxicology, 2014. **34**(8): p. 825-834.
167. Priac, A., *Lactuca sativa L.: Evaluation écotoxicologique de rejets industriels complexes et de solutions synthétiques*. 2014, Université de Franche-Comté.

168. Lecomte, V., et al., *Contamination des milieux aquatiques par les résidus de médicaments: exposition, risques écotoxicologiques, antibiorésistance et leviers d'actions*. Environnement, Risques & Santé, 2023. **22**(5): p. 359-375.
169. Hayzoun, H., *Caractérisation et quantification de la charge polluante anthropique et industrielle dans le bassin du Sebou*. 2014, Université de Toulon; Université Sidi Mohamed ben Abdellah (Fès, Maroc
170. Hazourli, S., L. Boudiba, and M. Ziati, *Caractérisation de la pollution des eaux résiduaires de la zone industrielle d'El-Hadjjar, Annaba*. LARHYSS Journal P-ISSN 1112-3680/E-ISSN 2521-9782, 2007(6).
171. Gosset, A., *Evaluation de l'écotoxicité des rejets urbains par temps de pluie: Développement d'une batterie de bioessais et application à la conception de biocapteurs*. 2018, Université de Lyon.
172. Pandard, P., *Utilisation d'une approche multicritère pour la sélection d'essais d'écotoxicité*. Rapport Scientifique INERIS, 2010. **2009**: p. 57-59.
173. Emmanuel, E., *Évaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers*. 2004, Insa Lyon.
174. Devier, M.-H., *Étude intégrée sur l'impact des différentes classes de contaminants (composés organostanniques, métaux, HAP, PCB) sur les moules: bioaccumulation et réponses biochimiques*. 2003, Bordeaux 1.
175. VANDAMME, A.B.-M.D.-L., *Utilisation d'une technique de biosurveillance pour évaluer les retombées de métaux lourds*. 2004.
176. Arzul, G., et al., *Stratégies pour la surveillance des produits phytosanitaires en milieu marin côtier*. 2004: Ifremer.
177. Andral, B., *Guide méthodologique*. Le Réseau Intégrateurs Biologiques (RINBIO) en Méditerranée. Evaluation de la contamination chimique basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules. Ifremer, France. 21p, 2002.
178. Yavaşoğlu, A., et al., *Histopathological and apoptotic changes on marine mussels *Mytilus galloprovincialis* (Lamark, 1819) following exposure to environmental pollutants*. Marine Pollution Bulletin, 2016. **109**(1): p. 184-191.
179. Sureda, A., et al., *Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain)*. Aquatic Toxicology, 2011. **101**(3-4): p. 540-549.
180. Mejdoub, Z., et al., *Oxidative stress responses of the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to emmissary's pollution in coastal areas of Casablanca*. 2017. **136**: p. 95-103.
181. Santiago, S., et al., *Guide pour l'utilisation des tests écotoxicologiques avec les daphnies, les bactéries luminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement*. 2002.
182. Clement, B., *Apports des essais en microcosmes aquatiques lenticules de laboratoire à l'évaluation écotoxicologique des polluants*. 2006, INSA de Lyon; Université Claude Bernard-Lyon I.
183. Blandin, P.J.B.d.é., *Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques*. 1986. **17**(4): p. 215-307.
184. DUVAL, A., *Retours d'expérience des mesures de restauration écologique en estuaire de Seine*. 2021.

185. Damiens, G., et al., *Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels*. 2007. **66**(3): p. 574-583.
186. Schmidt, W., E. Power, and B.J.M.p.b. Quinn, *Seasonal variations of biomarker responses in the marine blue mussel (Mytilus spp.)*. 2013. **74**(1): p. 50-55.
187. Cabane, F., *Lexique d'écologie, d'environnement et d'aménagement du littoral, Version 12*. 2007, Ifremer.
188. Moilleron, R., et al., *Caractérisation du potentiel toxique des eaux urbaines par bioessais—Cas de l'agglomération parisienne*. 2020(12): p. 175-194.
189. den Besten, P.J., *Risk assessment approaches in European countries*, in *Sustainable Management of Sediment Resources*. 2007, Elsevier. p. 153-205.
190. Nielsen, A.F., et al., *Critical review of the OSPAR risk-based approach for offshore-produced water discharges*. 2023. **19**(5): p. 1172-1187.
191. Vindimian, E. and J. Garric, *Bio essais et bio indicateurs de toxicité dans le milieu naturel*. 1993.
192. Péry, A. and J. Garric, *Les effets écotoxicologiques: De la molécule à la population*. Vol. 1. 2017: ISTE Group.
193. Almeida, J., et al., *The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) exposed to in vivo cadmium contamination*. 2002. **27**(8): p. 673-679.
194. Linde-Arias, A.R., et al., *Biomarkers in an invasive fish species, Oreochromis niloticus, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River*. 2008. **399**(1-3): p. 186-192.
195. Organization, W.H., *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. 1993: World Health Organization.
196. Dagnino, S., et al., *Identification of biomarkers of exposure to FTOHs and PAPs in humans using a targeted and nontargeted analysis approach*. 2016. **50**(18): p. 10216-10225.
197. Deviller, G., *Traitement par lagunage à haut rendement algal (LHRA) des effluents piscicoles marins recyclés: Evaluation chimique et écotoxicologique*. 2003, Université de Montpellier I.
198. Gueye, P.M., *Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge*. 2007, Université Louis Pasteur (Strasbourg)(1971-2008).
199. Verlecar, X., et al., *Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel Perna viridis from Arabian Sea*. 2008. **76**(4): p. 745-752.
200. PELLERIN, J., et al., *Stress physiologique et perturbation endocrinienne chez les bivalves marins*. 2004: p. 350-400.
201. Vlahogianni, T., et al., *Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels Mytilus galloprovincialis for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece*. 2007. **54**(9): p. 1361-1371.

202. Fournier, E., *Bioaccumulation du sélénium et effets biologiques induits chez le bivalve filtreur corbicula fluminea. Prise en compte de l'activité ventilatoire, de la spéciation du sélénium et de la voie de contamination.* 2005, Université de Bordeaux.
203. Atli, G., et al., *Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish Oreochromis niloticus.* 2006. **143**(2): p. 218-224.
204. Jing, G., et al., *Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (Pinctada fucata) exposed to copper.* 2006. **144**(2): p. 184-190.
205. Blaise, C., et al., *Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay Fjord with the soft-shell clam, Mya arenaria.* 2002. **17**(3): p. 170-186.
206. Galloway, T.S., et al., *A multibiomarker approach to environmental assessment.* 2004. **38**(6): p. 1723-1731.
207. Guerlet, E., *Utilisation de biomarqueurs cellulaires chez plusieurs espèces d'invertébrés pour l'évaluation de la contamination des milieux dulçaquicoles.* 2007, Université de Metz.
208. PONT, D., J.J.S.E. GARRIC, and Territoires, *L'évaluation du risque toxique dans les milieux aquatiques—Avant-propos.* 2010(1): p. 3-3.
209. Gagné, F., et al., *Études de biomarqueurs chez la mye commune (Mya arenaria) du fjord du Saguenay: bilan de recherches (1997 à 2006).* 2009. **22**(2): p. 253-269.
210. Mauffret, A., et al., *Campagne dédiée à l'évaluation des effets biologiques induits par la contamination chimique en baie de Seine. SELISEINE 2018.* 2021.
211. Gourlay France, C., et al., *Le risque écotoxicologique dans le bassin de la Seine. Comprendre et diagnostiquer l'impact de la contamination sur les organismes.* 2011.
212. Brown, R., et al., *Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers.* 2004. **66**(3): p. 267-278.
213. Schintu, M., et al., *Measurement of environmental trace-metal levels in Mediterranean coastal areas with transplanted mussels and DGT techniques.* 2008. **57**(6-12): p. 832-837.
214. Bocchetti, R., et al., *Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, Tapes philippinarum, and mussels, Mytilus galloprovincialis, from Adriatic sea.* 2008. **66**(1): p. 24-26.
215. Gorbi, S., et al., *An ecotoxicological protocol with caged mussels, Mytilus galloprovincialis, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea.* 2008. **65**(1): p. 34-49.
216. Petes, L.E., et al., *Environmental stress decreases survival, growth, and reproduction in New Zealand mussels.* 2007. **351**(1-2): p. 83-91.
217. Damiens, G., et al., *Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions.* 2004. **138**(2): p. 121-128.
218. Fattorini, D., et al., *Seasonal, spatial and inter-annual variations of trace metals in mussels from the Adriatic sea: a regional gradient for arsenic and implications for monitoring the impact of off-shore activities.* 2008. **72**(10): p. 1524-1533.
219. Aminot, A. and M. Chaussepied, *Manuel des analyses chimiques en milieu marin.* 1983.

220. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. 1951. **193**(1): p. 265-275.
221. de Almeida, E.A., et al., *Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage*. 2007. **146**(4): p. 588-600.
222. Dellali, M., M. Romeo, and P.J.O.a. Aissa, *Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte*. 2001. **24**(3): p. 263-271.
223. Dellali, M., et al., *A multivariate data analysis of the clam Ruditapes decussatus as sentinel organism of the Bizerta lagoon (Tunisia)*. 2004. **156**: p. 131-144.
224. Cheikh, Y.B., *Mécanismes de défense hémosteiques chez Mytilus edulis: interactions avec Vibrio Splendidus sp. et modulation du phénotype MXR par les contaminants environnementaux*. 2017, Normandie Université.
225. Lassudrie, M., *Effets combinés des dinoflagellés toxiques du genre Alexandrium et d'agents pathogènes sur la physiologie des bivalves*. 2014, Université de Bretagne occidentale-Brest.
226. Zitoun, R., et al., *Copper toxicity to blue mussel embryos (Mytilus galloprovincialis): The effect of natural dissolved organic matter on copper toxicity in estuarine waters*. 2019. **653**: p. 300-314.
227. Zhou, L., et al., *Biochemical and metabolic responses of the deep-sea mussel Bathymodiolus platifrons to cadmium and copper exposure*. 2021. **236**: p. 105845.
228. Le, T.Y., et al., *Modelling chronic toxicokinetics and toxicodynamics of copper in mussels considering ionoregulatory homeostasis and oxidative stress*. 2021. **287**: p. 117645.
229. Le, T.Y., et al., *Modelling copper toxicokinetics in the zebra mussel, Dreissena polymorpha, under chronic exposures at various pH and sodium concentrations*. 2021. **267**: p. 129278.
230. Defraigne, J.-O. and J.J.R.m.d.L. Pincemail, *Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités*. 2008. **63**.
231. Kumar, A., et al., *Managing reactive oxygen species—Some learnings from high altitude extremophytes*. 2021. **189**: p. 104525.
232. Ericson, J., et al., *Chronic heat stress as a predisposing factor in summer mortality of mussels, Perna canaliculus*. 2023. **564**: p. 738986.
233. Provenza, F., et al., *Mussel watch program for microplastics in the Mediterranean Sea: Identification of biomarkers of exposure using Mytilus galloprovincialis*. 2022. **142**: p. 109212.
234. Figueiredo-Fernandes, A., et al., *Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia Oreochromis niloticus exposed to paraquat*. 2006. **85**(2): p. 97-103.
235. Atli, G., et al., *Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish Oreochromis niloticus*. 2007. **145**(2): p. 282-287.
236. Sanchez, W., et al., *Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels*. 2005. **19**(1): p. 177-183.
237. Harrison, M.D., et al., *Intracellular copper routing: the role of copper chaperones*. 2000. **25**(1): p. 29-32.

238. Eskici, G.z. and P.H.J.B. Axelsen, *Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. 2012. **51**(32): p. 6289-6311.
239. Gomes, T., et al., *Proteomic response of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to CuO NPs and Cu²⁺: An exploratory biomarker discovery*. 2014. **155**: p. 327-336.
240. Nzengue, Y., *Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc: place des métallothionéines et de p53*. 2008, Université Joseph-Fourier-Grenoble I.
241. Gutowski, M. and S.J.A.B.P. Kowalczyk, *A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance*. 2013. **60**(1): p. 1-16.
242. Augusto, O. and S.J.P.o.f.r.b. Miyamoto, *Oxygen radicals and related species*. 2011. **1**: p. 19-42.
243. Box, A., et al., *Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis**. 2007. **146**(4): p. 531-539.
244. Akcha, F., et al., *Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo [a] pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis**. 2000. **49**(4): p. 269-287.
245. González-Soto, N., et al., *Fate and effects of graphene oxide alone and with sorbed benzo (a) pyrene in mussels *Mytilus galloprovincialis**. 2023. **452**: p. 131280.
246. Gumpu, M.B., et al., *A review on detection of heavy metal ions in water—an electrochemical approach*. 2015. **213**: p. 515-533.
247. Letelier, M.E., et al., *Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity*. 2005. **151**(2): p. 71-82.
248. Chowdhury, M.J., M. Girgis, and C.M.J.A.T. Wood, *Revisiting the mechanisms of copper toxicity to rainbow trout: Time course, influence of calcium, unidirectional Na⁺ fluxes, and branchial Na⁺, K⁺ ATPase and V-type H⁺ ATPase activities*. 2016. **177**: p. 51-62.
249. Fabbri, R., et al., *Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis**. 2014. **99**: p. 1-8.
250. Prato, E. and F.J.E.t. Biandolino, *Combined toxicity of mercury, copper and cadmium on embryogenesis and early larval stages of the *Mytilus galloprovincialis**. 2007. **28**(8): p. 915-920.
251. Zhen, Y., et al., *Oxygen consumption, ammonia excretion, and filtration rate of the marine bivalve *Mytilus edulis* exposed to methamidophos and omethoate*. 2010. **43**(4): p. 243-255.
252. Thomsen, J., et al., *Ammonia excretion in mytilid mussels is facilitated by ciliary beating*. 2016. **219**(15): p. 2300-2310.
253. Conroy, J.D., et al., *Soluble nitrogen and phosphorus excretion of exotic freshwater mussels (*Dreissena* spp.): potential impacts for nutrient remineralisation in western Lake Erie*. 2005. **50**(7): p. 1146-1162.
254. Tantanararit, C., et al., *Influence of size and density on filtration rate modeling and nutrient uptake by green mussel (*Perna viridis*)*. 2013. **68**(1-2): p. 38-45.
255. MASILAMONI, J.G., et al., *Excretory products of green mussel *Perna viridis* L. and their implications on power plant operation*. 2001. **25**(2): p. 117-125.

256. Tang, B., H.U.J.J.o.O. Riisgård, and Limnology, *Relationship between oxygen concentration, respiration and filtration rate in blue mussel Mytilus edulis*. 2018. **36**(2): p. 395-404.
257. Riisgård, H.U., P. Funch, and P.S.J.A.Z. Larsen, *The mussel filter–pump–present understanding, with a re-examination of gill preparations*. 2015. **96**(3): p. 273-282.
258. Creswell, R.L. and A.A.J.E.b.m.p.f.a. McNevin, *Better management practices for bivalve molluscan aquaculture*. 2008: p. 427-486.
259. Fernández, M., S. Shumway, and J.J.M.o.H.M.M.U.P. Blanco, Paris, *Management of shellfish resources*. 2003: p. 657-692.
260. Schuster, R., et al., *Exposure to dissolved TNT causes multilevel biological effects in Baltic mussels (Mytilus spp.)*. 2021. **167**: p. 105264.
261. Abidli, S., et al., *Impact of polyethylene microplastics on the clam Ruditapes decussatus (Mollusca: Bivalvia): examination of filtration rate, growth, and immunomodulation*. 2023. **32**(6): p. 746-755.
262. El-Shenawy, N.S.J.E.T.A.I.J., *Heavy-metal and microbial depuration of the clam Ruditapes decussatus and its effect on bivalve behavior and physiology*. 2004. **19**(2): p. 143-153.
263. Pourmozaffar, S., et al., *The role of salinity in physiological responses of bivalves*. 2020. **12**(3): p. 1548-1566.
264. Vosloo, D., J. Sara, and A.J.A.t. Vosloo, *Acute responses of brown mussel (Perna perna) exposed to sub-lethal copper levels: Integration of physiological and cellular responses*. 2012. **106**: p. 1-8.
265. Mouabad, A., *Toxicité comportementale et physiologique (filtration, respiration) des métaux lourds (Cu, Zn, Hg, Cd et Pb) chez la moule d'eau douce Dreissena polymorpha pallas: proposition d'un protocole d'essai pour l'évaluation de la toxicité par la réponse comportementale de Dreissena*. 1991, Université Paul Verlaine-Metz.
266. Pillai, B.R. and A.J.J.o.C.B. Diwan, *Effects of acute salinity stress on oxygen consumption and ammonia excretion rates of the marine shrimp Metapenaeus monoceros*. 2002. **22**(1): p. 45-52.
267. Mosleh, Y.Y., et al., *Effects of chitosan on oxidative stress and metallothioneins in aquatic worm Tubifex tubifex (Oligochaeta, Tubificidae)*. 2007. **67**(1): p. 167-175.
268. French, A.D., et al., *Balancing essential and non-essential metal bioavailability during hatchery rearing of Greenshell mussel (Perna canaliculus) larvae*. 2021. **216**: p. 112194.
269. Giltrap, M., et al., *Application of a weight of evidence approach utilising biological effects, histopathology and contaminant levels to assess the health and pollution status of Irish blue mussels (Mytilus edulis)*. 2016. **122**: p. 33-45.
270. He, L., et al., *Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species*. 2017. **44**(2): p. 532-553.
271. Davies, K.J.J.I.I., *Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems*. 2000. **50**(4-5): p. 279-289.
272. Prousek, J.J.P. and a. chemistry, *Fenton chemistry in biology and medicine*. 2007. **79**(12): p. 2325-2338.

273. Rajkumar, J. and M.J. Milton, *Biochemical changes induced by cadmium, copper, lead and zinc exposure to perna viridis under longterm toxicity test*. 2011.
274. Lesser, M.P.J.A.R.P., *Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology*. 2006. **68**: p. 253-278.
275. González, P.M., G. Malanga, and S.J.T.O.M.B.J. Puntarulo, *Cellular oxidant/antioxidant network: update on the environmental effects over marine organisms*. 2015. **9**(1).
276. Chandurvelan, R., et al., *Biochemical biomarker responses of green-lipped mussel, Perna canaliculus, to acute and subchronic waterborne cadmium toxicity*. 2013. **140**: p. 303-313.
277. Kourdali, S., et al., *An ecotoxicological approach for assessing marine pollution: Comparative study of multi-responses of marine mussels, Mytilus galloprovincialis and Perna perna, exposed to pollutant heavy metals (copper and lead)*. 2022. **52**: p. 102334.
278. Dailianis, S.J.F. and S. Immunology, *Production of superoxides and nitric oxide generation in haemocytes of mussel Mytilus galloprovincialis (Lmk.) after exposure to cadmium: a possible involvement of Na⁺/H⁺ exchanger in the induction of cadmium toxic effects*. 2009. **27**(3): p. 446-453.
279. Cuypers, A., et al., *Cadmium stress: an oxidative challenge*. 2010. **23**: p. 927-940.
280. Leonard, S.S., et al., *Metal-induced oxidative stress and signal transduction*. 2004. **37**(12): p. 1921-1942.
281. Wang, Y., et al., *Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species*. 2004. **36**(11): p. 1434-1443.
282. Bouki, E., et al., *Antioxidant and pro-oxidant challenge of tannic acid in mussel hemocytes exposed to cadmium*. 2013. **85**: p. 13-20.
283. Chandurvelan, R., et al., *Waterborne cadmium impacts immunocytotoxic and cytogenotoxic endpoints in green-lipped mussel, Perna canaliculus*. 2013. **142**: p. 283-293.
284. Filipič, M., et al., *Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity*. 2006. **25**(2): p. 67-77.
285. Hartwig, A.J.A. and R. Signaling, *Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function*. 2001. **3**(4): p. 625-634.
286. Huang, M., et al., *Zn-, Cd-, and Pb-transcription factor IIIA: properties, DNA binding, and comparison with TFIIIA-finger 3 metal complexes*. 2004. **98**(5): p. 775-785.
287. Morris, J.J., A.L. Rose, and Z.J.R.B. Lu, *Reactive oxygen species in the world ocean and their impacts on marine ecosystems*. 2022. **52**: p. 102285.
288. Hoseinifar, S.H., et al., *Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics*. 2020. **29**(2): p. 198-217.
289. Adli, D., et al., *Effets prophylactiques de l'huile essentielle de Syzygium aromaticum chez les rats wistar en développement coexposés au plomb et au manganèse*. 2017. **10**.
290. Rouabhi, Y., *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. 2020, Thèse de doctorat, Université de Mons.

291. Freitas, R., et al., *The influence of temperature and salinity on the impacts of lead in Mytilus galloprovincialis*. 2019. **235**: p. 403-412.
292. Brahma, N., A.J.E. Gupta, and E. Safety, *Acute toxicity of lead in fresh water bivalves Lamellidens jenkinsianus obesa and Parreysia (Parreysia) corrugata with evaluation of sublethal effects on acetylcholinesterase and catalase activity, lipid peroxidation, and behavior*. 2020. **189**: p. 109939.
293. Freitas, R., et al., *Venerupis decussata under environmentally relevant lead concentrations: bioconcentration, tolerance, and biochemical alterations*. 2014. **33**(12): p. 2786-2794.
294. Neethu, B., et al., *Profiles of hemolymph antioxidant system in apparently healthy marine bivalve, Perna viridis (Linnaeus, 1758) residing in a normoxic coastal ecosystem*. 2021. **262**: p. 107599.
295. Boudjema, K., et al., *Catalase activity in brown mussels (Perna perna) under acute cadmium, lead, and copper exposure and depuration tests*. 2014. **2014**(1): p. 830657.
296. de Almeida, E.A., et al., *Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels Perna perna exposed to different metals*. 2004. **49**(5-6): p. 386-392.
297. Amiard, J., et al., *Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms*. 1987. **106**(1): p. 73-89.
298. Cossa, D., et al., *Le plomb en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie*. 1993(3).
299. Waykar, B., G.J.B.o.e.c. Deshmukh, and toxicology, *Evaluation of bivalves as bioindicators of metal pollution in freshwater*. 2012. **88**: p. 48-53.
300. Salánki, J., et al., *Molluscs in biological monitoring of water quality*. 2003. **140**: p. 403-410.
301. Chinni, S., et al., *Acute toxicity of lead on tolerance, oxygen consumption, ammonia-N excretion, and metal accumulation in Penaeus indicus postlarvae*. 2002. **51**(2): p. 79-84.
302. Benyahia, M., *Etude de la contamination du bivalve d'eau douce Dreissena polymorpha par le plomb: bioaccumulation, distribution tissulaire et élimination du métal: incidence de paramètres biotiques et abiotiques*. 1991, Université Paul Verlaine-Metz.
303. Cheung, S. and R.Y.J.M.P.B. Cheung, *Effects of heavy metals on oxygen consumption and ammonia excretion in green-lipped mussels (Perna viridis)*. 1995. **31**(4-12): p. 381-386.
304. Stadmark, J. and D.J.M.p.b. Conley, *Mussel farming as a nutrient reduction measure in the Baltic Sea: consideration of nutrient biogeochemical cycles*. 2011. **62**(7): p. 1385-1388.
305. Maloubier, M., *Spéciation et bioaccumulation dans un organisme modèle de U, Np et Am en milieu marin*. 2015, Université Nice Sophia Antipolis.
306. Flouty, R., G. Khalaf, and E.J.L.S.J. Najjar, *DU PLOMB PAR L'ALGUE VERTE UNICELLULAIRE CHLAMYDOMONAS*. 2014. **15**(2): p. 97.

307. Moore, J.W. and S. Ramamoorthy, *Heavy metals in natural waters: applied monitoring and impact assessment*. 2012: Springer Science & Business Media.
308. de Paiva Magalhães, D., et al., *Metal bioavailability and toxicity in freshwaters*. 2015. **13**(1): p. 69-87.
309. Tepavitcharova, S., et al., *Chemical speciation in natural and brine sea waters*. 2011. **180**(1): p. 217-227.
310. Vinot, I., *Impact des rejets de cuivre et zinc en milieu aquatique: Circulation, Spéciation, Biodisponibilité, Bioaccumulation, Transfert et Toxicité*. 2004, Université Paul Verlaine-Metz.
311. Series, J.T.U.J.-B.S., توزع بعض العناصر المعدنية الثقيلة في المياه البحرية للشاطئ السوري في الشكلين (3) العضوي و اللاعضوي. 2010. **32**.
312. Layglon, N., et al., *Speciation of Cu, Cd, Pb and Zn in a contaminated harbor and comparison to environmental quality standards*. 2022. **317**: p. 115375.
313. Morar, F., et al. *STUDY ON HEAVY METAL CONTENT OF DRINKING WATER AND GROUNDWATER POLLUTED INDUSTRIAL AREAS*. in *The International Conference Interdisciplinarity in Engineering INTER-ENG*. 2012. Elsevier Limited.
314. Rasmussen, A.D. and O. Andersen, *Cadmium transfer between water and sediments studied in laboratory experiments and with a computer model*. 1999.
315. Cullen, J.T. and M.T.J.C.f.t.t.e. Maldonado, *Biogeochemistry of cadmium and its release to the environment*. 2012: p. 31-62.
316. Woosley, R.J. and F.J.J.M.c. Millero, *Pitzer model for the speciation of lead chloride and carbonate complexes in natural waters*. 2013. **149**: p. 1-7.
317. Leonardo, T., et al., *Silver accumulation in the green microalga coccomyxa actinabiotis: toxicity, in situ speciation, and localization investigated using synchrotron XAS, XRD, and TEM*. 2016. **50**(1): p. 359-367.
318. Chaguer, M., *Analyse et Spéciation des Métaux dans un Oued en zone Minière Cas de l'Oued Essouk*. 2013, Thèse de doctorat. Université Constantine I (in French).
319. Muse, J., et al., *A link between lead and cadmium kinetic speciation in seawater and accumulation by the green alga Ulva lactuca*. 2006. **141**(1): p. 126-130.
320. Tallec, K., et al., *Tire rubber chemicals reduce juvenile oyster (*Crassostrea gigas*) filtration and respiration under experimental conditions*. 2022. **181**: p. 113936.
321. Nicholson, S. and P.J.E.I. Lam, *Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia)*. 2005. **31**(1): p. 121-132.
322. Smolders, R., et al., *Transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as active biomonitors in an effluent-dominated river*. 2002. **21**(9): p. 1889-1896.
323. Stankovic, S., et al., *Heavy metals in seafood mussels. Risks for human health*. 2012: p. 311-373.
324. Xu, K., et al., *Effects of low concentrations copper on antioxidant responses, DNA damage and genotoxicity in thick shell mussel *Mytilus coruscus**. 2018. **82**: p. 77-83.
325. Scherz-Shouval, R. and Z.J.T.i.c.b. Elazar, *ROS, mitochondria and the regulation of autophagy*. 2007. **17**(9): p. 422-427.

326. Fandy, T.E., et al., *Decitabine induces delayed reactive oxygen species (ROS) accumulation in leukemia cells and induces the expression of ROS generating enzymes*. 2014. **20**(5): p. 1249-1258.
327. Arnold, W.R., et al., *A comparison of the copper sensitivity of six invertebrate species in ambient salt water of varying dissolved organic matter concentrations*. 2010. **29**(2): p. 311-319.
328. Santovito, G., et al., *Metal and metallothionein distribution in different tissues of the Mediterranean clam *Venerupis philippinarum* during copper treatment and detoxification*. 2015. **174**: p. 46-53.
329. Elie, P. and P.J.C.B. Girard, Cemagref, ONEMA, *Effets des micropolluants et des organismes pathogènes chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla* L. 1758*. 2009. **121**.
330. Al-Subiai, S.N., et al., *A multiple biomarker approach to investigate the effects of copper on the marine bivalve mollusc, *Mytilus edulis**. 2011. **74**(7): p. 1913-1920.
331. Di Giulio, R.T., C. Habig, and E.P.J.A.t. Gallagher, *Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish*. 1993. **26**(1-2): p. 1-22.
332. Khoury, J.N., et al., *Relating disparity in competitive foraging behavior between two populations of fiddler crabs to the subcellular partitioning of metals*. 2009. **56**: p. 489-499.
333. Baltas, H., et al., *Experimental study on copper uptake capacity in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*)*. 2016. **23**: p. 10983-10989.
334. Dos Santos, F.S., et al., *How does the brown mussel *Perna perna* respond to environmental pollution? A review on pollution biomarkers*. 2022. **111**: p. 412-428.
335. Mlouka, R., et al., *Compared responses to copper and increased temperatures of hybrid and pure offspring of two mussel species*. 2019. **685**: p. 795-805.
336. Boukadida, K., et al., *Early and efficient induction of antioxidant defense system in *Mytilus galloprovincialis* embryos exposed to metals and heat stress*. 2017. **138**: p. 105-112.
337. Bao, M., et al., *A novel biomarker for marine environmental pollution of CAT from *Mytilus coruscus**. 2018. **127**: p. 717-725.
338. Palais, F., et al., *One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*)*. 2012. **21**: p. 888-905.
339. Raftopoulou, E. and V.J.C. Dimitriadis, *Comparative study of the accumulation and detoxification of Cu (essential metal) and Hg (nonessential metal) in the digestive gland and gills of mussels *Mytilus galloprovincialis*, using analytical and histochemical techniques*. 2011. **83**(8): p. 1155-1165.
340. Dedourge-Geffard, O., et al., *Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: an in situ experiment*. 2009. **77**(11): p. 1569-1576.
341. Wu, H., et al., *Effects of cadmium exposure on digestive enzymes, antioxidant enzymes, and lipid peroxidation in the freshwater crab *Sinopotamon henanense**. 2013. **20**: p. 4085-4092.
342. Chen, Z., et al., *Inhibition of digestive enzyme activities by copper in the guts of various marine benthic invertebrates*. 2002. **21**(6): p. 1243-1248.

343. Li, E., et al., *Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, Litopenaeus vannamei, at various salinities*. 2008. **274**(1): p. 80-86.
344. Boldina-Cosqueric, I., et al., *Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve Scrobicularia plana as tools for the assessment of estuarine sediment quality*. 2010. **73**(7): p. 1733-1741.
345. Bourgeault, A., et al., *Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: an integrated ecotoxicological assessment*. 2010. **25**(5): p. 468-478.
346. Nicholson, S.J.J.o.E.M.B. and Ecology, *Cardiac and branchial physiology associated with copper accumulation and detoxication in the mytilid mussel Perna viridis (L.)*. 2003. **295**(2): p. 157-171.
347. Marigómez, I. and L.J.A.T. Baybay-Villacorta, *Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals*. 2003. **64**(3): p. 235-257.
348. Etxeberria, M., et al., *Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd, and Zn) in mussels collected from a zinc-polluted site*. 1994. **27**: p. 338-345.
349. Burgos-Aceves, M.A., C.J.F. Faggio, and s. immunology, *An approach to the study of the immunity functions of bivalve haemocytes: physiology and molecular aspects*. 2017. **67**: p. 513-517.
350. Jimeno-Romero, A., et al., *Digestive cell lysosomes as main targets for Ag accumulation and toxicity in marine mussels, Mytilus galloprovincialis, exposed to maltose-stabilised Ag nanoparticles of different sizes*. 2017. **11**(2): p. 168-183.
351. Essawy, A.E., et al., *Immune responses, DNA damage and ultrastructural alterations of gills in the marine mussel Lithophaga lithophaga exposed to CuO nanoparticles*. 2021: p. 1-16.
352. Barfield, M.L., et al., *Biomarker and bioaccumulation responses of Asian clams exposed to aqueous cadmium*. 2001. **63**(7): p. 495-510.
353. Voets, J., et al., *Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (Dreissena polymorpha) from clean and contaminated surface waters*. 2006. **79**(3): p. 213-225.
354. Cao, R., et al., *Exacerbation of copper pollution toxicity from ocean acidification: A comparative analysis of two bivalve species with distinct sensitivities*. 2022. **293**: p. 118525.
355. Machado, A.A.d.S., et al., *Responses of biomarkers in wild freshwater mussels chronically exposed to complex contaminant mixtures*. 2014. **23**: p. 1345-1358.
356. Fitzpatrick, J., et al., *The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (Mytilus trossulus)*. 2008. **147**(4): p. 441-449.
357. Anandraj, A., et al., *Metal accumulation, filtration and O₂ uptake rates in the mussel Perna perna (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺*. 2002. **132**(3): p. 355-363.
358. Wang, W.-X., et al., *Significance of metallothioneins in metal accumulation kinetics in marine animals*. 2010. **152**(1): p. 1-8.

359. Hauser-Davis, R.A., et al., *Biochemical metal accumulation effects and metalloprotein metal detoxification in environmentally exposed tropical Perna perna mussels*. 2021. **208**: p. 111589.
360. Nguyen, T.V., et al., *Copper-induced immunomodulation in mussel (Perna canaliculus) haemocytes*. 2018. **10**(7): p. 965-978.
361. Stéphane, T., *Data mining et statistique décisionnelle: l'intelligence des données*. 2012: Editions Technip.
362. CHARIF, I.E., *ELABORATION DES CORRELATIONS QUANTITATIVES STRUCTURE-ACIDITE DES ACIDES CARBONES. ETUDE THEORIQUE DES EFFETS DE SOLVANT SUR LES EQUILIBRES CETO-ENOLIQUES DES COMPOSES β -DICARBONYLES CYCLIQUES ET DE LEURS ANALOGUES A CHAINES OUVERTES*. 2011, Citeseer.
363. Rakotomalala, R.J.D.e.s.d.v., *Pratique de la régression linéaire multiple*. 2011.
364. Creighton, L., *Introduction Aux Plans D'expériences*. 2006: Dunod.
365. Sereshti, H., Y.E. Heravi, and S.J.T. Samadi, *Optimized ultrasound-assisted emulsification microextraction for simultaneous trace multielement determination of heavy metals in real water samples by ICP-OES*. 2012. **97**: p. 235-241.
366. Triola, M. and M. Triola, *Biostatistique pour les sciences de la vie et de la santé: édition revue et corrigée*. 2012: Pearson Education France.
367. Roussouly, N., F. Petitjean, and M. Salaün. *Analyse de la fiabilité d'une structure satellite*. in *10e colloque national en calcul des structures*. 2011.
368. Roussouly, N., et al., *Application des surfaces de réponse pour l'analyse fiabiliste d'une structure spatiale*. 2010.
369. Besse, P.J.T.I., *Apprentissage statistique & data mining*. 2009.
370. Cornillon, P.-A. and É. Matzner-Løber, *Régression: théorie et applications*. 2007: Springer.
371. Robles, B., *Etude de la pertinence des paramètres stochastiques sur des modèles de Markov cachés*. 2013, Université d'Orléans.
372. Kouassi, A.M., et al., *Modélisation statistique des pluies maximales annuelles dans le district d'Abidjan (sud de la Côte d'Ivoire)*. 2018. **31**(2): p. 147-160.
373. Meddi, M., A.S.B.J.N. Abbes, and Technology, *Analyse statistique et prévision des débits de crues dans le bassin versant de l'Oued Mekerra (Ouest de l'Algérie)*. 2014(10): p. 21.
374. Chibane, H., *Contribution à l'optimisation multi-objectif des paramètres de coupe en usinage et apport de l'analyse vibratoire: application aux matériaux métalliques et composites*. 2013, Tours.
375. KESKES, S. and S. HANINI, *Etude du séchage des poudres pharmaceutiques*. 2020.
376. Fortuné, A., *Techniques de Modélisation Moléculaire appliquées à l'Etude et à l'Optimisation de Molécules Immunogènes et de Modulateurs de la Chimiorésistance*. 2006, Université Joseph-Fourier-Grenoble I.
377. Gourault, M., *Etude des déterminants climatiques et environnementaux impliqués dans la variabilité de la reproduction et du recrutement des principales espèces de bivalves exploités en Bretagne*. 2018, Université de Bretagne occidentale-Brest.

378. Barron, M., C. Lilavois, and T.J.A.T. Martin, *MOAtox: A comprehensive mode of action and acute aquatic toxicity database for predictive model development*. 2015. **161**: p. 102-107.
379. Bauer, F., *Une meilleure caractérisation des mécanismes d'action toxique à partir de la structure moléculaire*. 2017, Université de Haute Alsace-Mulhouse.
380. Thomas, P., et al., *Application of the activity framework for assessing aquatic ecotoxicology data for organic chemicals*. 2015. **49**(20): p. 12289-12296.
381. Liang, R., et al., *Antioxidant defenses and metabolic responses of blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to various concentrations of erythromycin*. 2020. **698**: p. 134221.
382. Dobal, V., et al., *Activity of antioxidant enzymes in *Mytilus galloprovincialis* exposed to tar: Integrated response of different organs as pollution biomarker in aquaculture areas*. 2022. **548**: p. 737638.
383. Fernández, B., et al., *Assessment of the mechanisms of detoxification of chemical compounds and antioxidant enzymes in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Mediterranean coastal sites*. 2012. **87**(11): p. 1235-1245.
384. Sharma, P. and P.J.S.j.o.b.s. Chadha, *Bisphenol A induced toxicity in blood cells of freshwater fish *Channa punctatus* after acute exposure*. 2021. **28**(8): p. 4738-4750.
385. Ďurovcová, I., et al., *Genotoxic potential of bisphenol A: A review*. 2022. **306**: p. 119346.
386. Abd Elkader, H.-T.A.E., et al., *Microanatomy and behaviour of the date mussel's adductor and foot muscles after chronic exposure to bisphenol A, with inhibition of ATPase enzyme activities and DNA damage*. 2023. **271**: p. 109684.
387. Kankaanpää, H., et al., *Accumulation and depuration of cyanobacterial toxin nodularin and biomarker responses in the mussel *Mytilus edulis**. 2007. **68**(7): p. 1210-1217.
388. Bolton, J.L., et al., *Role of quinones in toxicology*. 2000. **13**(3): p. 135-160.
389. Magara, G., et al., *First insights into oxidative stress and theoretical environmental risk of Bronopol and Detarox® AP, two biocides claimed to be ecofriendly for a sustainable aquaculture*. 2021. **778**: p. 146375.
390. Halliwell, B.J.B.s.t., *Biochemistry of oxidative stress*. 2007. **35**(5): p. 1147-1150.
391. Guéraud, F., et al., *Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products*. 2010. **44**(10): p. 1098-1124.
392. Ayala, A., et al., *Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal*. 2014. **2014**(1): p. 360438.
393. Gnatyshyna, L., et al., *Biochemical responses of freshwater mussel *Unio tumidus* to titanium oxide nanoparticles, Bisphenol A, and their combination*. 2019. **28**(8): p. 923-937.
394. Wu, N.C. and F.J.G.c.b. Seebacher, *Effect of the plastic pollutant bisphenol A on the biology of aquatic organisms: A meta-analysis*. 2020. **26**(7): p. 3821-3833.
395. Han, Y., et al., *Microplastics and bisphenol A hamper gonadal development of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by interfering with metabolism and disrupting hormone regulation*. 2022. **810**: p. 152354.

396. Zhang, W., et al., *Microplastics boost the accumulation of tetrabromobisphenol A in a commercial clam and elevate corresponding food safety risks*. 2022. **292**: p. 133499.
397. Kittner, C. and H.U.J.M.E.P.S. Riisgård, *Effect of temperature on filtration rate in the mussel *Mytilus edulis*: no evidence for temperature compensation*. 2005. **305**: p. 147-152.
398. Salanki, J.J.A.B.H., *Invertebrates in neurotoxicology*. 2000. **51**: p. 287-307.
399. Miserazzi, A., et al., *Proteome changes in muscles, ganglia, and gills in *Corbicula fluminea* clams exposed to crude oil: Relationship with behavioural disturbances*. 2020. **223**: p. 105482.
400. Nagai, K., et al., *Detecting the shellfish killer *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) by measuring bivalve valve activity with a Hall element sensor*. 2006. **255**(1-4): p. 395-401.
401. Tang, B. and H.U.J.O.J.o.M.S. Riisgård, *Physiological regulation of valve-opening degree enables mussels *Mytilus edulis* to overcome starvation periods by reducing the oxygen uptake*. 2016. **6**(3): p. 341-352.
402. GÜNER, U.J.T.J.o.B., *Heavy metal effects on P, Ca, Mg, and total protein contents in embryonic pleopodal eggs and stage-1 juveniles of freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823)*. 2010. **34**(4): p. 405-412.
403. Inyang, I., E. Daka, and E.J.C.r.j.o.b.s. Ogamba, *Effects of sub-lethal concentrations of diazinon on total protein and transaminase activities in *Clarias gariepinus**. 2010. **2**(6): p. 390-395.
404. Peteiro, L.G., et al., *Variability in biochemical components of the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) cultured after Prestige oil spill*. 2007. **145**(4): p. 588-594.
405. Lardy-Fontan, S., *Les substances émergentes dans les écosystèmes aquatiques français: une application aux alkylphénol-polyéthoxylés et aux substances pharmaceutiques*. 2008, Bordeaux 1.
406. Zhao, H., H. Ruan, and H.J.C.s.b. Li, *Progress in the research of GSH in cells*. 2011. **56**: p. 3057-3063.
407. Curpan, A.-S., et al., **Mytilus galloprovincialis*: An essential, low-cost model organism for the impact of xenobiotics on oxidative stress and public health*. 2022. **256**: p. 109302.
408. Vašková, J., et al., *Glutathione-related enzymes and proteins: a review*. 2023. **28**(3): p. 1447.
409. Frenzilli, G., et al., *Time-course evaluation of ROS-mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment*. 2004. **58**(2-5): p. 609-613.
410. Pampanin, D.M., et al., *Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy)*. 2005. **50**(12): p. 1548-1557.
411. Vlahogianni, T., A.J.C. Valavanidis, and Ecology, *Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant defence enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis**. 2007. **23**(5): p. 361-371.
412. Da Poian, A.T., et al., *Energy Conservation in Metabolism: The Mechanisms of ATP Synthesis*. 2021: p. 301-362.

413. Berg, J., J. Tymoczko, and L.J.B. Stryer, WH Freedman, Section, *A proton gradient powers the synthesis of ATP*. 2002. **18**.
414. Fabbri, E., P. Valbonesi, and S.J.I.S.J. Franzellitti, *HSP expression in bivalves*. 2008. **5**(2): p. 135-161.
415. Hofmann, G.E. and A.E.J.A.r.o.p. Todgham, *Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment*. 2010. **72**(1): p. 127-145.
416. Harvey, B.P., et al., *Evolution of marine organisms under climate change at different levels of biological organisation*. 2014. **6**(11): p. 3545-3574.
417. Lockwood, B.L., K.M. Connor, and A.Y.J.T.J.o.E.B. Gracey, *The environmentally tuned transcriptomes of Mytilus mussels*. 2015. **218**(12): p. 1822-1833.
418. Pes, K., et al., *Biochemical and molecular responses of the Mediterranean mussel (Mytilus galloprovincialis) to short-term exposure to three commonly prescribed drugs*. 2021. **168**: p. 105309.
419. Belivermiş, M., et al., *Physiological and gene expression responses of the mussel Mytilus galloprovincialis to low pH and low dissolved oxygen*. 2023. **187**: p. 114602.
420. Reid, N.M., et al., *The genomic landscape of rapid repeated evolutionary adaptation to toxic pollution in wild fish*. 2016. **354**(6317): p. 1305-1308.
421. Saaristo, M., et al., *Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife*. 2018. **285**(1885): p. 20181297.
422. Dehghan, G., et al., *Synergistic inhibition of catalase activity by food colorants sunset yellow and curcumin: An experimental and MLSD simulation approach*. 2019. **311**: p. 108746.
423. Oladoye, P.O., et al., *Toxicity and decontamination strategies of Congo red dye*. 2022. **19**: p. 100844.
424. Trawczyńska, I., M.J.B. Wójcik, and B. Equipment, *Optimization of permeabilization process of yeast cells for catalase activity using response surface methodology*. 2015. **29**(1): p. 72-77.
425. Domingue Gauthier, V., *Inhibition du pathogène des salmonidés Saprolegnia parasitica par des bactéries aquatiques*. 2013.
426. Verdon, E., et al., *The monitoring of triphenylmethane dyes in aquaculture products through the European union network of official control laboratories*. 2015. **98**(3): p. 649-657.
427. Sinha, R., R.J.E. Jindal, and S. Indicators, *Elucidation of malachite green induced behavioural, biochemical, and histo-architectural defects in Cyprinus carpio, as piscine model*. 2020. **8**: p. 100055.
428. Kovacic, P. and R.J.J.o.A.T. Somanathan, *Toxicity of imine–iminium dyes and pigments: electron transfer, radicals, oxidative stress and other physiological effects*. 2014. **34**(8): p. 825-834.
429. Eldem, Y., I.J.D. Özer, and pigments, *Electrophilic reactivity of cationic triarylmethane dyes towards proteins and protein-related nucleophiles*. 2004. **60**(1): p. 49-54.
430. Tacal, Ö., I.J.J.o.B. Özer, and M. Toxicology, *Adduct-forming tendencies of cationic triarylmethane dyes with proteins: metabolic and toxicological implications*. 2004. **18**(5): p. 253-256.

431. Srivastava, S., R. Sinha, and D.J.A.t. Roy, *Toxicological effects of malachite green*. 2004. **66**(3): p. 319-329.
432. Arroyo, D., et al., *Determination and identification, according to European Union Decision 2002/657/EC, of malachite green and its metabolite in fish by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using an optimized extraction procedure and three-way calibration*. 2009. **1216**(29): p. 5472-5482.
433. Jiang, Y., P. Xie, and G.J.A. Liang, *Distribution and depuration of the potentially carcinogenic malachite green in tissues of three freshwater farmed Chinese fish with different food habits*. 2009. **288**(1-2): p. 1-6.
434. Schuetze, A., T. Heberer, and S.J.C. Juergensen, *Occurrence of residues of the veterinary drug malachite green in eels caught downstream from municipal sewage treatment plants*. 2008. **72**(11): p. 1664-1670.
435. Yadav, A., et al., *Fertilizer industry effluent induced biochemical changes in fresh water teleost, *Channa striatus* (Bloch)*. 2007. **79**: p. 588-595.
436. Oliveira, P., et al., *Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration*. 2018. **164**: p. 155-163.
437. Coppola, F., et al., *Biochemical impacts of Hg in *Mytilus galloprovincialis* under present and predicted warming scenarios*. 2017. **601**: p. 1129-1138.
438. Rodier, J., et al., *L'analyse de l'eau: Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer, 9ème Edition Dunod*. 2009.
439. Hazourli, S., L. Boudiba, and M.J.L.J.P.-I.-E.-I.-. Ziati, *Caractérisation de la pollution des eaux résiduaires de la zone industrielle d'El-Hadjar, Annaba*. 2007(6).
440. Dongo, K.R., et al., *Impacts des effluents liquides industriels sur l'environnement urbain d'Abidjan-Côte D'Ivoire*. 2013. **7**(1): p. 404-420.
441. Bawa, M.L., G. Djaneye-Boundjou, and Y.J.A.S.R.I.d.S.e.T. Boukari, *Caractérisation de deux effluents industriels au Togo: étude d'impact sur l'environnement*. 2006. **2**(1).
442. Ayah, M., et al., *Qualité et pollution des eaux d'un hydrosystème littoral tropical: cas du système lagunaire de Lomé, Togo*. 2015. **11**(15).
443. Boucheseiche, C., et al., *Bassin Rhône-Méditerranée-Corse*. 2002(7).
444. Salim, B., A.T.J.J.o.E.P. Driss, and H. Health, *Bio-monitoring of Trace Mercury Using Seabirds' Dejections from Arzew Gulf: A Potential Risk for Human Health*. 2014. **2**(1): p. 7-11.
445. Nadella, S.R., et al., *Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon*. 2009. **149**(3): p. 340-348.
446. Roccheri, M.C., et al., *Cadmium induces the expression of specific stress proteins in sea urchin embryos*. 2004. **321**(1): p. 80-87.
447. Boukadida, K., et al., *High sensitivity of embryo-larval stage of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* to metal pollution in combination with temperature increase*. 2016. **122**: p. 59-66.
448. Coppola, F., et al., *Biochemical responses and accumulation patterns of *Mytilus galloprovincialis* exposed to thermal stress and Arsenic contamination*. 2018. **147**: p. 954-962.

449. Annamaria, V.G., et al., *Mytilus galloprovincialis* as bioindicator in embryotoxicity testing to evaluate sediment quality in the lagoon of Venice (Italy). 2005. **21**(6): p. 455-463.
450. Arienzo, M., et al., *Contaminants bioaccumulation and pathological assessment in Mytilus galloprovincialis in coastal waters facing the brownfield site of Bagnoli, Italy*. 2019. **140**: p. 341-352.
451. Boukadida, K., et al., *Moderate temperature elevation increase susceptibility of early-life stage of the Mediterranean mussel, Mytilus galloprovincialis to metal-induced genotoxicity*. 2019. **663**: p. 351-360.
452. Zorita, I., et al., *Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms*. 2008. **153**(1): p. 157-168.
453. Pellerin, J., et al., *Comparison of bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in two marine bivalves (Mytilus edulis and Mya arenaria)*. 2009. **150**(2): p. 186-195.
454. Al-Fanharawi, A.A., et al., *Biochemical and molecular alterations in freshwater mollusks as biomarkers for petroleum product, domestic heating oil*. 2018. **158**: p. 69-77.
455. Barillet, S., et al., *Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (Danio rerio) after a depleted uranium waterborne exposure*. 2011. **159**(2): p. 495-502.
456. Cappello, T., et al., *Impact of environmental pollution on caged mussels Mytilus galloprovincialis using NMR-based metabolomics*. 2013. **77**(1-2): p. 132-139.
457. Teixeira, M., et al., *Toxic effects of the antihistamine cetirizine in mussel Mytilus galloprovincialis*. 2017. **114**: p. 316-326.
458. Amiard, J.-C., T. Caquet, and L. Lagadic, *Use of biomarkers for environmental quality assessment*. 2021: Crc Press.
459. Ducrot, V., *Compréhension et modélisation des relations entre les caractéristiques biologiques et écologiques et la sensibilité aux contaminants des communautés d'invertébrés benthiques: perspectives pour l'évaluation des effets des substances chimiques*. 2005, Université Paul Verlaine-Metz.
460. Almeida, J., et al., *Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, Oreochromis niloticus*. 2001. **114**(2): p. 169-175.
461. Roche, H., A. Buet, and F.J.R.d.é. Ramade, *Caractéristiques écophysiologiques d'une population d'anguilles de Camargue exposée à une pollution clandestine par des polluants organiques persistants*. 2003. **58**(1): p. 103-126.
462. Geffard, A., et al., *Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (Crassostrea gigas) from a clean and a metal-rich site*. 2001. **6**(2): p. 91-107.
463. Woo, S., et al., *Expressions of oxidative stress-related genes and antioxidant enzyme activities in Mytilus galloprovincialis (Bivalvia, Mollusca) exposed to hypoxia*. 2013. **52**: p. 1-8.
464. Almeida, Â., et al., *Chronic toxicity of the antiepileptic carbamazepine on the clam Ruditapes philippinarum*. 2015. **172**: p. 26-35.
465. Gomes, T., et al., *Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of Mytilus galloprovincialis*. 2012. **118**: p. 72-79.

466. Gravato, C., et al., *Oxidative stress and genotoxic responses to resin acids in Mediterranean mussels*. 2005. **61**(2): p. 221-229.
467. Lima, I., et al., *Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal*. 2007. **66**(7): p. 1230-1242.
468. Livingstone, D.J.M.p.b., *Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms*. 2001. **42**(8): p. 656-666.
469. Gorbi, S., et al., *Effects of harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* exposure on immunological, histological and oxidative responses of mussels *Mytilus galloprovincialis**. 2013. **35**(3): p. 941-950.
470. Prego-Faraldo, M., et al., *Transcriptional and biochemical analysis of antioxidant enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* during experimental exposures to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima**. 2017. **129**: p. 304-315.
471. Richir, J. and S.J.E.I. Gobert, *The effect of size, weight, body compartment, sex and reproductive status on the bioaccumulation of 19 trace elements in rope-grown *Mytilus galloprovincialis**. 2014. **36**: p. 33-47.
472. Dauvin, J.-C., S. Grimes, and A.J.J.o.n.h. Bakalem, *Marine biodiversity on the Algerian continental shelf (Mediterranean Sea)*. 2013. **47**(25-28): p. 1745-1765.
473. Sun, Y., et al., *Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure*. 2006. **63**(8): p. 1319-1327.
474. Peixoto, F., et al., *Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus**. 2006. **85**(2): p. 91-96.
475. Koutsogiannaki, S., et al., *Oxidative stress parameters induced by exposure to either cadmium or 17 β -estradiol on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. The role of signaling molecules*. 2014. **146**: p. 186-195.
476. Aouini, F., et al., *Assessing lead toxicity in the clam *Ruditapes philippinarum*: bioaccumulation and biochemical responses*. 2018. **158**: p. 193-203.
477. Benali, I., et al., *Spatial distribution and biological effects of trace metals (Cu, Zn, Pb, Cd) and organic micropollutants (PCBs, PAHs) in mussels *Mytilus galloprovincialis* along the Algerian west coast*. 2017. **115**(1-2): p. 539-550.
478. e Silva, C.A.R., B.D. Smith, and P.S.J.M.E.R. Rainbow, *Comparative biomonitoring of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil)*. 2006. **61**(4): p. 439-455.
479. Lemaire, N., et al., *Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *Mytilus spp.* from farm sites of eastern Quebec*. 2006. **261**(2): p. 729-751.
480. Hamer, B., et al., *Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment*. 2008. **89**(3): p. 137-151.
481. Bussell, J.A., et al., *Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress*. 2008. **358**(1): p. 78-85.
482. Wang, Y., et al., *The combined effects of oxygen availability and salinity on physiological responses and scope for growth in the green-lipped mussel *Perna viridis**. 2011. **63**(5-12): p. 255-261.

483. Bakhmet, I., et al., *The effect of salinity change on the heart rate of Mytilus edulis specimens from different ecological zones*. 2005. **318**(2): p. 121-126.
484. Freitas, R., et al., *Effects of seawater acidification and salinity alterations on metabolic, osmoregulation and oxidative stress markers in Mytilus galloprovincialis*. 2017. **79**: p. 54-62.
485. Fernández-Torquemada, Y., et al., *Dispersion of brine discharge from seawater reverse osmosis desalination plants*. 2009. **5**(1-3): p. 137-145.
486. Kress, N., Y. Gertner, and E.J.W.r. Shoham-Frider, *Seawater quality at the brine discharge site from two mega size seawater reverse osmosis desalination plants in Israel (Eastern Mediterranean)*. 2020. **171**: p. 115402.
487. Katal, R., et al., *An overview on the treatment and management of the desalination brine solution*. 2020: p. 28.
488. Pol, J., *Environment programme mediterranean action plan*. 2015.
489. Murray, J.B. and G.L. Wingard, *Salinity and temperature tolerance experiments on selected Florida Bay mollusks*. 2006.
490. Wiltshire, K.H., et al., *Helgoland roads, North Sea: 45 years of change*. 2010. **33**: p. 295-310.
491. Fernández-Torquemada, Y., J.L. Sánchez-Lizaso, and J.M.J.D. González-Correa, *Preliminary results of the monitoring of the brine discharge produced by the SWRO desalination plant of Alicante (SE Spain)*. 2005. **182**(1-3): p. 395-402.
492. Ruíz, J.M., L. Marín-Guirao, and J.M. Sandoval-Gil, *Responses of the Mediterranean seagrass Posidonia oceanica to in situ simulated salinity increase*. 2009.
493. Sandoval-Gil, J.M., L. Marín-Guirao, and J.M.J.M.B. Ruiz, *Tolerance of Mediterranean seagrasses (Posidonia oceanica and Cymodocea nodosa) to hypersaline stress: water relations and osmolyte concentrations*. 2012. **159**: p. 1129-1141.
494. Marín-Guirao, L., et al., *Responses of the Mediterranean seagrass Posidonia oceanica to hypersaline stress duration and recovery*. 2013. **84**: p. 60-75.
495. Fernández-Torquemada, Y. and J.L.J.H. Sánchez-Lizaso, *Responses of two Mediterranean seagrasses to experimental changes in salinity*. 2011. **669**: p. 21-33.
496. Koch, M., et al., *Tropical seagrass species tolerance to hypersalinity stress*. 2007. **86**(1): p. 14-24.
497. Sánchez-Lizaso, J.L., et al., *Salinity tolerance of the Mediterranean seagrass Posidonia oceanica: recommendations to minimize the impact of brine discharges from desalination plants*. 2008. **221**(1-3): p. 602-607.
498. Del-Pilar-Ruso, Y., et al., *Effects of a brine discharge over soft bottom Polychaeta assemblage*. 2008. **156**(2): p. 240-250.
499. de-la-Ossa-Carretero, J.A., et al., *Response of amphipod assemblages to desalination brine discharge: impact and recovery*. 2016. **172**: p. 13-23.
500. Kassouar, S., et al., *CONSEQUENCES OF BRINE DISCHARGES FROM SEAWATER DESALINATION ON THE MARINE ECOSYSTEM, CASE STUDY OF THE KAHRAMA STATION IN THE NORTH WEST OF ALGERIA*. 2024. **22**(2).
501. Fernández-Torquemada, Y., et al., *Echinoderms as indicators of brine discharge impacts*. 2013. **51**(1-3): p. 567-573.

502. Sharifinia, M., et al., *Prevention is better than cure: Persian Gulf biodiversity vulnerability to the impacts of desalination plants*. 2019. **25**(12): p. 4022-4033.
503. Poloczanska, E.S., et al., *Responses of marine organisms to climate change across oceans*. 2016. **3**: p. 62.
504. Alfonso, S., M. Gesto, and B.J.J.o.F.B. Sadoul, *Temperature increase and its effects on fish stress physiology in the context of global warming*. 2021. **98**(6): p. 1496-1508.
505. Philippart, C.J., et al., *Impacts of climate change on European marine ecosystems: observations, expectations and indicators*. 2011. **400**(1-2): p. 52-69.
506. Wernberg, T., et al., *Impacts of climate change in a global hotspot for temperate marine biodiversity and ocean warming*. 2011. **400**(1-2): p. 7-16.
507. Occhipinti-Ambrogi, A.J.M.p.b., *Global change and marine communities: alien species and climate change*. 2007. **55**(7-9): p. 342-352.
508. Qian, H. and D.A.J.B.c. Beard, *Thermodynamics of stoichiometric biochemical networks in living systems far from equilibrium*. 2005. **114**(2-3): p. 213-220.
509. Chouinard-Boisvert, S., *Fonctions mitochondriales et profils lipidiques cardiaques chez l'épinoche à trois épines: un aperçu des limites physiologiques associées à la tolérance thermique*. 2023, Université du Québec à Rimouski.
510. Clarke, A. and K.J.F.e. Fraser, *Why does metabolism scale with temperature?* 2004. **18**(2): p. 243-251.
511. Pinsky, M.L., et al., *Greater vulnerability to warming of marine versus terrestrial ectotherms*. 2019. **569**(7754): p. 108-111.
512. Seebacher, F.J.C.B., P.P.B. Biochemistry, and M. Biology, *The evolution of metabolic regulation in animals*. 2018. **224**: p. 195-203.
513. Hilton, Z., K.D. Clements, and A.J.J.J.o.C.P.B. Hickey, *Temperature sensitivity of cardiac mitochondria in intertidal and subtidal triplefin fishes*. 2010. **180**: p. 979-990.
514. Iftikar, F.I. and A.J.J.P.O. Hickey, *Do mitochondria limit hot fish hearts? Understanding the role of mitochondrial function with heat stress in *Notolabrus celidotus**. 2013. **8**(5): p. e64120.
515. Iftikar, F.I., et al., *Could thermal sensitivity of mitochondria determine species distribution in a changing climate?* 2014. **217**(13): p. 2348-2357.
516. Blier, P.U., H. Lemieux, and N.J.C.J.o.Z. Pichaud, *Holding our breath in our modern world: will mitochondria keep the pace with climate changes?* 2014. **92**(7): p. 591-601.
517. Chung, D.J. and P.M.J.J.o.E.B. Schulte, *Mitochondria and the thermal limits of ectotherms*. 2020. **223**(20): p. jeb227801.
518. Belhadj Slimen, I., et al., *Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review*. 2014. **30**(7): p. 513-523.
519. Banh, S., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species production by fish muscle mitochondria: potential role in acute heat-induced oxidative stress*. 2016. **191**: p. 99-107.
520. Gerber, L., et al., *Improved mitochondrial function in salmon (*Salmo salar*) following high temperature acclimation suggests that there are cracks in the proverbial 'ceiling'*. 2020. **10**(1): p. 21636.

521. Abele, D., et al., *Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam Mya arenaria*. 2002. **205**(13): p. 1831-1841.
522. Rajagopal, S., et al., *Thermal tolerance of the invasive oyster Crassostrea gigas: Feasibility of heat treatment as an antifouling option*. 2005. **39**(18): p. 4335-4342.
523. Verlecar, X., K. Jena, and G.J.C.-b.i. Chainy, *Biochemical markers of oxidative stress in Perna viridis exposed to mercury and temperature*. 2007. **167**(3): p. 219-226.
524. Gomes, E.C., V. Stone, and G.J.E.j.o.a.p. Florida-James, *Impact of heat and pollution on oxidative stress and CC16 secretion after 8 km run*. 2011. **111**(9): p. 2089-2097.
525. Negri, A., et al., *Transcriptional response of the mussel Mytilus galloprovincialis (Lam.) following exposure to heat stress and copper*. 2013. **8**(6): p. e66802.
526. Pytharopoulou, S., et al., *Translational responses and oxidative stress of mussels experimentally exposed to Hg, Cu and Cd: one pattern does not fit at all*. 2011. **105**(1-2): p. 157-165.
527. Dondero, F., et al., *Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation*. 2005. **345**(2): p. 259-270.
528. Burgess, R.M., M.J. Ahrens, and C.W.J.P.a.e.p. Hickey, *Geochemistry of PAHs in aquatic environments: source, persistence and distribution*. 2003: p. 35-45.
529. Andral, B., et al., *Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging*. 2004. **49**(9-10): p. 704-712.
530. Bachelot, M., *Contamination de moules (Mytilus sp.) en milieu marin par des substances pharmaceutiques et produits de soin*. 2010, Montpellier 1.
531. Perraudin, E., H. Budzinski, and E.J.A.E. Villenave, *Kinetic study of the reactions of NO₂ with polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on silica particles*. 2005. **39**(35): p. 6557-6567.
532. Pena, T., et al., *Optimization of a microwave-assisted extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from fish samples*. 2006. **1121**(2): p. 163-169.
533. Rababah, A. and S.J.C. Matsuzawa, *Treatment system for solid matrix contaminated with fluoranthene. II—Recirculating photodegradation technique*. 2002. **46**(1): p. 49-57.
534. Dina, B.M., *Pollution de l'environnement marin et santé humaine: mesure, évaluation et Impact des contaminants chimiques et biologiques dans les produits de la pêche au niveau du littoral marocain*. 2012.
535. Kupe, L., et al., *Accumulation of heavy metals in water, biota and sediment in some Albanian rivers*. 2010.
536. Fernández, B., et al., *Antioxidant responses in gills of mussel (Mytilus galloprovincialis) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast*. 2010. **99**(2): p. 186-197.
537. Maanan, M.J.E.P., *Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region*. 2008. **153**(1): p. 176-183.
538. Sokolova, I.J.I. and C. Biology, *Mitochondrial adaptations to variable environments and their role in animals' stress tolerance*. 2018. **58**(3): p. 519-531.

539. Solaini, G., et al., *Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism*. 2010. **1797**(6-7): p. 1171-1177.
540. Hernansanz-Agustín, P., et al., *Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells*. 2014. **71**: p. 146-156.
541. Nogueira, L., et al., *Hypoxia effects on oxidative stress and immunocompetence biomarkers in the mussel *Perna perna* (Mytilidae, Bivalvia)*. 2017. **126**: p. 109-115.
542. Sokolova, I.M., et al., *Mitochondrial mechanisms underlying tolerance to fluctuating oxygen conditions: lessons from hypoxia-tolerant organisms*. 2019. **59**(4): p. 938-952.
543. Hermes-Lima, M., et al., *Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress*. 2002. **133**(4): p. 537-556.
544. Aragonés, J., et al., *Oxygen sensors at the crossroad of metabolism*. 2009. **9**(1): p. 11-22.
545. Chandel, N.S., et al., *Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing*. 2000. **275**(33): p. 25130-25138.
546. Hermes-Lima, M., et al., *Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later*. 2015. **89**: p. 1122-1143.
547. Zippay, M.L. and B.J.I.Z. Helmut, *Effects of temperature change on mussel, *Mytilus**. 2012. **7**(3): p. 312-327.
548. Minier, C., et al., *A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*)*. 2006. **25**(1): p. 112-119.
549. Da Silva, C.F., et al., *Growth, mortality, and reproduction of *Tagelus plebeius* (Bivalvia: Solecurtidae) in Southeast Brazil*. 2015. **69**: p. 1-12.
550. Saxby, S.A., *A review of food availability, sea water characteristics and bivalve growth performance at coastal culture sites in temperate and warm temperate regions of the world*. 2002.
551. Doinsing, J.W., J.J.E.J.o.A.B. Ransangan, and Fisheries, *An overview of the life cycle, reproduction and factors influencing recruitment success of tropical oysters*. 2022. **26**(3): p. 1-29.
552. Banni, M., et al., *Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle*. 2011. **6**(5): p. e18904.
553. Hyötyläinen, T., A. Karels, and A.J.W.R. Oikari, *Assessment of bioavailability and effects of chemicals due to remediation actions with caging mussels (*Anodonta anatina*) at a creosote-contaminated lake sediment site*. 2002. **36**(18): p. 4497-4504.
554. Andral, B., F. Galgani, and C.J.R.C.I.p.I.s.d.I.M.M. Blottiere, Monaco, *MYTILOS and MYTIMED projects monitoring chemical contamination in the Mediterranean Sea*. 2007. **38**: p. 227.
555. Picard, R., *Étude des indicateurs de stress et de vitalité chez les mollusques bivalves comme outils diagnostiques en conchyliculture*. 2009, Université du Québec à Rimouski.
556. Garbarino, V.R., et al., *Mechanisms of oxidative stress resistance in the brain: lessons learned from hypoxia tolerant extremophilic vertebrates*. 2015. **576**: p. 8-16.

557. Almeida, E.A., et al., *Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (Perna perna) exposed to air and re-submersed*. 2005. **318**(1): p. 21-30.
558. Ferreira, M.V., A.C. Alencastro, and M.J.C.j.o.z. Hermes-Lima, *Role of antioxidant defenses during estivation and anoxia exposure in the freshwater snail Biomphalaria tenagophila (Orbigny, 1835)*. 2003. **81**(7): p. 1239-1248.
559. David, E., et al., *Response of the Pacific oyster Crassostrea gigas to hypoxia exposure under experimental conditions*. 2005. **272**(21): p. 5635-5652.
560. Gorr, T., et al., *Hypoxia tolerance in animals: biology and application*. 2010. **83**(5): p. 733-752.
561. Moreira, D.C., et al., *How widespread is preparation for oxidative stress in the animal kingdom?* 2016. **200**: p. 64-78.
562. Regoli, F. and M.E.J.M.e.r. Giuliani, *Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms*. 2014. **93**: p. 106-117.

ANNEXE

CHOIX DU MATERIEL BIOLOGIQUE TEST

1/- Choix du matériel biologique

La moule est un mollusque bivalve sessile fixé aux substrats solides dans les anfractuosités des rochers battus et éclairés de l'étage médiolittoral qui sont favorables à l'installation de moulières naturelles. Elle s'accroche en grappes et se fixe grâce à sa capacité de sécréter un faisceau de filaments soyeux que l'on appelle « byssus », on la trouve dans les mers du monde entier quoi qu'elle préfère les eaux froides. Elle est capable de supporter une longue immersion grâce à une réserve d'eau entre les deux valves, elle se nourrit de phytobenthos (diatomées) de phytoplancton et de débris organiques. La moule utilise son appareil branchial comme un filtre qui joue le rôle d'un tamis, en effet elle filtre jusqu'à 100L eau/jour.

De même, La moule est un bivalve filtreur accumulateur des micropolluants présents dans son environnement, c'est la raison pour laquelle elle a été choisie comme espèce bioindicatrice dans un grand nombre de programme de surveillance de la qualité du milieu marin [1, 2-7].

2/- Avantage du modèle moule

En effet, ces bivalves présentent des caractéristiques qui en font d'eux de bons bioindicateurs [8, 9] en raison de :

- Leur faculté d'accumuler des contaminants (chimiques : ETM, HAP etc. ; biologiques : Bactéries, Algues toxiques) présents dans l'environnement dans un facteur de concentration de l'ordre 10^3 10^5 par rapport à l'eau environnante sans subir d'effets létaux [10, 11, 12] ;
- Leur large répartition géographique comme espèce répandue [8, 13] ;
- Leur mode de vie sessile et euryhalin, ce qui leur permet de filtrer la nourriture et peut accumuler un niveau haut de contaminants [11, 13] ;
- Leur tolérance à différents stress ;
- Leur consommation peut présenter des risques pour la santé humaine [9] ;
- La possibilité de les transplanter [14] ;

- La possibilité de travailler sur différentes classes d'âge car il y a apparition des jeunes individus de 1 à 10mm durant toute l'année car la reproduction est continue ;
- Faciles à échantillonner et importants du point de vue économique et écologique [8, 11] ;
- En effet, ils sont exposés aux fluctuations physicochimiques de l'environnement (température, salinité, contaminants chimiques, etc.) Sans possibilité de fuite [14] ;
- L'augmentation des connaissances sur la biochimie et la physiologie de certains invertébrés et celle des bivalves en particulier, permet maintenant d'interpréter raisonnablement les réponses des biomarqueurs afin d'estimer les menaces sur des organismes. De ce fait, les bivalves répondent à tous les critères d'un indicateur quantitatif biologique.

3/- Modèle biologique « la moule méditerranéenne : *Mytilus galloprovincialis* »

3.1/- Systématique

La moule *Mytilus galloprovincialis* est classée comme suit :

Règne : Animal

Sous règne : Métazoaire

Phylum : Mollusques

Classe : *Bivalvia*

Sous-classe : *Lamellibranchia*

Ordre : *Mytiloidale*

Superfamille : *Mytilacae*

Famille : *Mytilidae*

Sous-famille : *Mytilinae*

Genre : *Mytilus*

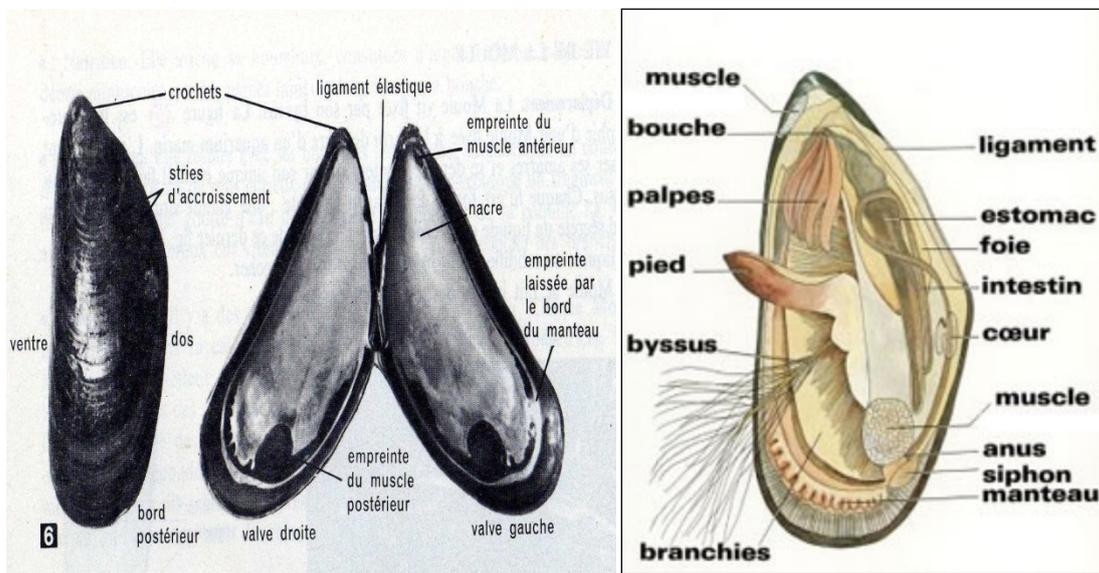
Espèce : *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819).

3.2/- Description de *Mytilus galloprovincialis*

Les figure 1 et 2, ci-dessous, illustre la description de la moule *Mytilus galloprovincialis*.



Figure 1 : La moule *Mytilus galloprovincialis*.



(A)

(B)

Figure 2 : Corps et morphologie de la moule *Mytilus galloprovincialis* :

(A)- Face externe et interne de la coquille, (B)- Face ventrale.

Le corps de la moule est protégé par une coquille formée de deux valves égales (équivalve), qui s'ouvrent lorsque l'animal meurt, le corps, entièrement mou et non segmenté, est enveloppé dans un manteau que l'on peut décoller de la coquille, le manteau qu'est formé de deux lames, délimite une cavité palléale qu'est remplie d'eau de mer.

La moule est aussi constituée de pied, de byssus, muscle adducteur postérieur et antérieur qui assurent le rapprochement des deux valves. La moule ne possède pas de tête distincte, mais la bouche permet de reconnaître la partie antérieure de l'animal. Le cœur visible par transparence indique la région dorsale.

La coquille qui est de nature calcaire (carbonate de chaux) est d'une couleur noirâtre avec des reflets bleutés, elle représente des courbes régulières : les stries d'accroissement qui sont les témoins des étapes successives de la croissance. Le corps est enveloppé par deux lobes du manteau qui secrète la coquille. Les lobes sont séparés l'un de l'autre et laissant sortir le pied ainsi que le byssus, ils délimitent une cavité remplie de l'eau de mer : c'est la cavité palléale. De cette dernière sort le pied et la touffe de filaments du byssus eux-mêmes sortent de l'orifice de la glande du byssus. Dans la face ventrale se trouve la masse viscérale de la moule, de part et d'autre de cette dernière se disposent quatre lames fines et striées transversalement : ce sont les branchies qui baignent dans la cavité palléale.

3.3/- Répartition géographique

L'espèce *M. galloprovincialis* se rencontre sur les côtes Atlantiques du sud de l'Irlande et la Cornouaille, sur les côtes Atlantiques de l'Europe et de l'Afrique du Nord, sur le littoral de la Méditerranée à l'exception du sud de la Méditerranée orientale et sur les côtes de l'Adriatique et de mer noire. Leur biotope s'étend de la limite haute de l'étage médiolittoral supérieur jusqu'à des profondeurs de 6 à 9 m avec possibilité d'atteindre 30 à 40 m dans certaines régions comme la mer baltique [14].

4/- La moule *Perna perna*

4.1/- Systématique

Règne : Animal

Sous-règne : Métazoaires

Phylum : Mollusques

Classe : *Bivalves*

Sous-classe : *Ptériomorphes*

Ordre : *Mytiloidés*

Famille : *Mytilidés*

Genre : *Perna*

Espèce : *Perna perna* (Lamarck, 1758)

4.2/- Description de *Perna perna*



Figure 3 : La moule *Perna perna*

La moule africaine *Perna perna* (Lamarck, 1758) est un mollusque bivalve de forme allongée qui possède une charnière munie d'une ou deux dents ; fréquemment une dans la valve gauche et 2 dans la valve droite (fig III.3). Les muscles rétracteurs du pied et muscles rétracteurs du byssus forment une empreinte médiodorsale sur la coquille, le muscle rétracteur postérieur du byssus a une empreinte bien visible et adjacente à celle de l'adducteur postérieur, l'intérieur des valves est nacré, blanc rosé. En méditerranée la taille maximale des moules est de 90mm, avec une taille moyenne de 50 à 60mm. Elle peut atteindre une longueur maximale de 18cm. La couleur du manteau permet de distinguer les deux sexes en effet, elle est blanchâtre chez les mâles et rose saumon à orange chez les femelles [15].

4.3/- Répartition géographique

On la rencontre sur les substrats durs de l'étage infralittoral et jusqu'à 100m de profondeur. *Perna perna* est une espèce largement répandue dans le monde puisqu'on la rencontre sur les côtes Est et Ouest de l'Atlantique tropical et subtropical, en Amérique du Sud et sur les bords de la Méditerranée (Afrique du Nord : Algérie, Tunisie, Maroc), elle vit en mélange avec *Mytilus galloprovincialis* et se distingue de cette dernière par la coloration verte, mélangé de brun, de la face externe de ses valves (au lieu de brun foncé), par la coloration blanc jaunâtre de la face interne des valves (au lieu de bleuté à presque noir), par la séparation d'une des trois empreintes musculaires (au lieu que les trois empreintes soient contiguës), et enfin par sa charnière à une seule dent sur chaque valve (au lieu de trois dents sur chaque valve) [15].

4.4/- Ecologie de la moule

Les moules sont des espèces sessiles qui vivent fixées sur substrats durs dans la zone médiolittorale (zone intertidale), elles résistent aux courants, aux chocs des vagues et à l'arrachement grâce aux solides filaments du byssus qui sont soudés au rocher [16].

Les moules recouvrent des rochers battus par les vagues, mais peuvent proliférer dans les estuaires où l'eau est moins salée, moins claire et moins agitée. On les retrouve aussi dans les ports. La nourriture des moules est très diverse elle est à base de diatomées, dinoflagellés, bactéries, flagellés, protozoaires, diverses spores, fragments d'algues et de débris inorganiques. La nutrition est un paramètre important dans la répartition des moules qui prolifèrent généralement dans les zones riches en phytoplancton, en matières organiques dissoutes ou en suspension et en bactéries. L'eau contenant ces éléments est filtrée à travers les branchies (deux paires de feuillets hémibranchiaux) qui grâce aux battements de leurs cils, acheminent ainsi les particules englobées de mucus vers les palpes labiaux qui les prennent en charge vers la bouche et le tube digestif [16].

Les moules sont des espèces caractérisées par une forte tolérance vis-à-vis des conditions du milieu, ainsi elles supportent des températures de 13°C en hiver et entre 27 et 28°C en été et des salinités comprise entre 7 et 40 ‰.

4.5/- Physiologie de la moule

Les principales fonctions physiologiques de la moule sont celles qui traitent à l'activité respiratoire et circulatoire contrôlées par le système nerveux [17].

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 (respiration réalisée par certains organismes en l'absence d'oxygène).

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 de l'organisme 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 ensuite les reins, où elle est purifiée, avant de pénétrer dans les branchies. Dans ces organes, elle s'enrichit alors en oxygène (O₂) et se décharge en gaz carbonique (CO₂). Une fois oxygénée, l'hémolymphe rejoint les oreillettes du cœur.

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 central des mytilidés est principalement constitué de ganglions cérébroïdaux, pédieux et viscéraux. Ce système nerveux diffus possède la capacité de sécréter des neurohormones, notamment de nature peptidique.

Références :

1. Torre, A., F. Trischitta, and C.J.T.i.V. Faggio, *Effect of CdCl₂ on regulatory volume decrease (RVD) in Mytilus galloprovincialis digestive cells*. 2013. **27**(4): p. 1260-1266.
2. Yavaşoğlu, A., et al., *Histopathological and apoptotic changes on marine mussels Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819) following exposure to environmental pollutants*. 2016. **109**(1): p. 184-191.
3. Balbi, T., et al., *Responses of Mytilus galloprovincialis to challenge with the emerging marine pathogen Vibrio coralliilyticus*. 2019. **84**: p. 352-360.
4. Bocchetti, R., et al., *Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, Tapes philippinarum, and mussels, Mytilus galloprovincialis, from Adriatic sea*. 2008. **66**(1): p. 24-26.
5. Maanan, M.J.E.P., *Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region*. 2008. **153**(1): p. 176-183.
6. Donnini, F., et al., *A biological and geochemical integrated approach to assess the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy)*. 2007. **33**(7): p. 919-928.
7. Besada, V., et al., *Statistical comparison of trace metal concentrations in wild mussels (Mytilus galloprovincialis) in selected sites of Galicia and Gulf of Biscay (Spain)*. 2008. **72**(1-4): p. 320-331.
8. Rossi, F., et al., *Evaluation of tissue morphology and gene expression as biomarkers of pollution in mussel Mytilus galloprovincialis caging experiment*. 2016. **181**: p. 57-66.

9. Çayır, A., et al., *Evaluation of metal concentrations in mussel M. galloprovincialis in the Dardanelles Strait, Turkey in regard of safe human consumption*. 2012. **89**: p. 91-95.
10. Casas, S., *Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, Mytilus galloprovincialis, en milieu méditerranéen*. 2005, Université du Sud Toulon Var.
11. Arrighetti, F., et al., *Multiple-biomarker approach in the assessment of the health status of a novel sentinel mussel Brachidontes rodriguezii in a harbor area*. 2019. **140**: p. 451-461.
12. Rouane-Hacene, O., et al., *Seasonal assessment of biological indices, bioaccumulation and bioavailability of heavy metals in mussels Mytilus galloprovincialis from Algerian west coast, applied to environmental monitoring*. 2015. **57**(4): p. 362-374.
13. Nogueira, L., et al., *Biochemical responses in mussels Perna perna exposed to diesel B5*. 2015. **134**: p. 210-216.
14. Barhoumi, B., *Biosurveillance de la pollution de la lagune de Bizerte (Tunisie) par l'analyse comparée des niveaux de contamination et de l'écotoxicité des sédiments et du biote*. 2014, Bordeaux.
15. Lbadaoui, K., *Evaluation et perspectives de valorisation des ressources génétiques des eaux continentales et littorales du Maroc-les modèles: Truite fario (Salmo trutta macrostigma) et moule africaine Perna perna*. 2012.
16. Bachelot, M., *Contamination de moules (Mytilus sp.) en milieu marin par des substances pharmaceutiques et produits de soin*. 2010, Montpellier 1.
17. Kamel, N., *Effets combinés des facteurs environnementaux et des polluants chimiques chez la moule Mytilus galloprovincialis: harmonisation des biomarqueurs d'exposition suivant les recommandations OSPAR et MEDPOL*. 2014, Nantes.

ANNEXE

Réactifs et solutions chimiques

Dosage de l'azote ammoniacal

Réactif (A) : Solution de phénol-Nitroprussiate de sodium (eau distillée, 35g de phénol, 400mg de Nitroprussiate de sodium pour 1litre) ;

Réactif (B) : Solution alcaline d'hypochlorite (280g de citrate trisodique, 22g de soude, solution d'hypochlorite de sodium correspondant à 1,4g de chlore soit 44ml d'une solution à 10° de chlore).

Dosage des nitrites

Réactif (C) : Solution de Sulfanilamide (eau distillée, 5g de Sulfanilamide, 50ml d'acide chlorhydrique d=1,18 pour 500ml).

Réactif (D) : Solution de N-Naphthyléthylène-diamine (eau distillée, 0,5g dichlorohydrate de N-Naphthyléthylène-diamine

Dosages des protéines par la méthode de Lowry

1- Réactif de Lowry A

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Na}_2\text{CO}_3 \dots\dots\dots 1\text{g} \\ \text{NaOH (0.1N)} \dots\dots\dots 50\text{ml} \end{array} \right.$$

2- Réactif de Lowry B

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O} \dots\dots\dots 5\text{g} \\ \text{Tartrate de Na et K} \dots\dots\dots 10\text{g} \end{array} \right. \quad \text{Le tout dans 1litre}$$

3- Réactif de Lowry :

Mélanger le jour de la manipulation

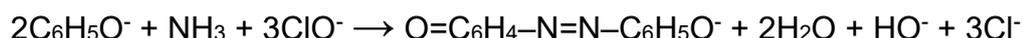
$$\left\{ \begin{array}{l} 50\text{ml Lowry A} \\ 1\text{ml Lowry B} \end{array} \right.$$

Procédures des analyses des sels nutritifs (traitement au laboratoire)

A/- Dosage de l'azote ammoniacal par la méthode au bleu d'indophénol

❖ Principe

La méthode décrite mesure la totalité de l'azote ammoniacal, soit N-NH₃ + N-NH₄, symbolisé par N-NH_{3,4}. Il s'agit de la méthode de Koroleff (1969) qui est simple et qui offre une bonne précision ainsi qu'une bonne sensibilité.



Dans un premier temps, l'ammoniac forme une monochloramine avec l'hypochlorite en milieu légèrement basique. Cette dernière réagit avec le phénol en présence d'un excès d'hypochlorite pour former le bleu d'indophénol absorbant à 630 nm.

❖ Mode opératoire

03mL du réactif (A), solution de phénol-nitroprussiate « voir annexe (C) », sont additionnés à 100mL du filtrat récupéré (eau de mer). Directement après homogénéisation, 03mL du réactif (B) solution alcaline d'hypochlorite « voir annexe (C) » sont ajoutés au mélange.

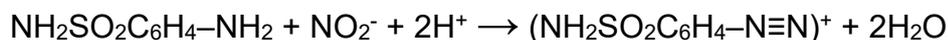
L'échantillon final homogénéisé est placé à l'obscurité pendant une nuit à température ambiante. Ainsi l'absorbance est mesurée à 630nm.

Dans le blanc l'eau distillée remplace les 100mL du filtrat.

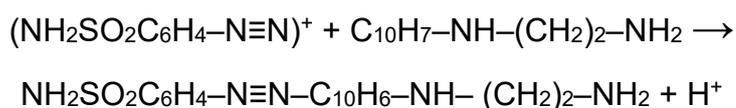
B/- Dosage de l'azote nitreux

❖ Principe

Les ions nitrites forment un diazoïque avec la sulfanilamide en milieu acide (pH<2) selon la réaction :



Puis le diazoïque réagit avec le N-naphtyl-éthylènediamine pour former le colorant :



Le colorant rose absorbe à la longueur d'onde de 543nm.

❖ Mode opératoire

01mL de réactif (C), solution de sulfanilamide « voir annexe (C) », est ajouté à 50mL de filtrat. Après homogénéisation, on laisse reposer 02 à 08 minutes et on ajoute 01mL de réactif (D) solution de n-naphtyl-éthylènediamine « voir annexe (C) » au mélange. Après au moins 10 minutes (sans dépasser les 02h) de repos la lecture de l'absorbance des échantillons est faite à 543nm.

C/- Dosage de l'azote nitrique

❖ Principe

La méthode retenue quasi universellement est celle fondée sur le dosage des ions NO_2^- obtenus par réduction quantitative (>95%) des ions NO_3^- . On mesure donc en réalité la somme des concentrations des ions NO_2^- et NO_3^- . Par déduction de la concentration en nitrites, déterminée sans réduction, on obtient la concentration en nitrates.

La réduction est effectuée par passage de l'échantillon sur une colonne de cadmium traité au cuivre.

❖ Mode opératoire

02mL de la solution concentrée de chlorure d'ammonium « voir annexe (C) » est additionné à 100mL de filtrat, le tout est versé dans une colonne réductrice en cadmium traité par le cuivre. Les premiers 50mL sont rejetés et le reste est récupéré afin de le traité de la même façon que le cas des nitrites.

D/- Dosage du phosphore

❖ Principe

Les ions phosphates réagissent avec le molybdate d'ammonium, en présence d'antimoine (III), pour former un complexe que l'on réduit par l'acide ascorbique ; cette forme réduite, de coloration bleue, a un maximum d'absorption à 885 nm. Ce composé bleu contient le phosphore. Les polyphosphates et le phosphore organique ne sont pas dosés par cette méthode.

❖ Mode opératoire

10mL du mélange-réactif phosphore « voir annexe (C) », préparé à chaque série d'analyses, sont ajoutés à 100mL de filtrat et on homogénéise aussitôt. Après 05minutes de repos la lecture de l'absorbance des échantillons est faite à 885nm.

Dans le blanc l'eau distillée remplace les 100mL du filtrat.

E/- Dosage de la chlorophylle a

La détermination quantitative globale de la fraction particulaire vivante dans les milieux aquatiques est importante pour l'étude et la compréhension des phénomènes écologiques. Pour cela, une estimation de la biomasse phytoplanctonique par voie chimique (par extraction et détermination des pigments photosynthétiques) s'avère satisfaisante, plus simple et plus rapide. Le dosage de la chlorophylle a est réalisé selon la méthode monochromatique de Lorenzen (1967) utilisant comme solvant l'acétone à 90%.

F/- Calcul des MES

La connaissance de la quantité de matières en suspension (MES) est importante pour l'étude des milieux aquatiques. D'une part, les particules réduisent la transparence de l'eau et de ce fait la production primaire photosynthétique. D'autre part, elles présentent une surface de contact importante pour les échanges physicochimiques ou biologiques avec l'eau de mer. Selon leur nature, Elles sont également une source nutritive non négligeable pour la faune.

✓ *Principe et méthode*

La détermination des matières en suspension dans l'eau est réalisée par l'application de la méthode de pesée différentielle après filtration sur un filtre de fibre de verre WHATMAN GF/C 47 μ m ; l'utilisation de ce type de filtre permet la rétention de toutes les particules de taille variant entre 0.47 μ m et 250 μ m. Le filtre est séché et pesé avant et après la filtration. La différence de poids permet de connaître le poids sec total de matière en suspension dans le volume filtré correspondant.

GLOSSAIRE

Abiotique : Désigne dans toute entité écologique, ce qui est de nature strictement physico-chimique, ou encore minéral lorsqu'il s'agit de la dimension géologique d'un biotope.

Aigue : Qui se manifeste sur une courte période (en seconde, en minute, en heure ou quelques jours relativement à la durée du cycle de vie de l'organisme).

Anthropique : Relative à l'activité humaine.

Apoptose : (mort cellulaire programmée ou suicide cellulaire) Processus par lequel des cellules déclenchent leur auto destruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Contrairement à la nécrose, elle ne provoque pas d'inflammation : les membranes plasmiques ne sont pas détruites, et la cellule émet des signaux qui permettront sa phagocytose.

Autotrophes : êtres vivants capables d'utiliser les éléments minéraux dissous dans l'eau pour se nourrir grâce au processus de photosynthèse.

Benthique : Se dit du fond régions aquatiques ; se dit de la partie de l'environnement aquatique habitée par des organismes (benthos) vivant dans le substrat.

Biocénose : Ensemble des êtres vivants d'un biotope ou d'une station donnée. (la biocénose et le biotope constituent un écosystème).

Bioessais : Expérimentation effectuée en laboratoire, sur divers types d'être vivants afin de caractériser les activités biocides ou les particularités toxicologiques de produits chimiques ou de milieux contaminés.

Biotique : Désigne tout ce qui est propre à la vie. Facteurs biotiques : ensemble des facteurs écologiques liés aux êtres vivants (Compétition, prédation, parasitisme, mutualisme,).

Biotope : Milieu biologique offrant à une biocénose des conditions de vie relativement stable (biotope terrestre, marin, etc.).

Ecosystème : Système dans lequel il existe des échanges cycliques de matières et d'énergie dus aux interactions entre les différents organismes présents (biotope) et leur environnement (biocénose).

Ecotoxicologie : Science qui étudie l'origine, l'émission et l'introduction de polluants naturels ou artificiels dans la biosphère, leur devenir et leurs actions sur les écosystèmes. Elle inclut ainsi la toxicologie de l'environnement, la toxicologie industrielle, la toxicologie alimentaire ou la toxicologie nucléaire.

Euryhalin : Se dit des espèces capables de résister à des changements importants de salinité.

Excrétion : Rejet des résidus en sort de l'organisme.

Homéostasie : Maintien, chez les organismes vivants, de l'équilibre normal des réactions chimiques et des constituants principaux de l'organisme d'un individu. Par extension, l'homéostasie fait également référence à la stabilisation des constantes physiologiques d'un organisme.

Métabolisme : Par le terme de métabolisme, on comprend toutes les réactions chimiques ayant lieu dans l'organisme, nécessaires au maintien des processus de la vie. Ces réactions concernent l'apport d'énergie, mais aussi l'introduction, la transformation, la décomposition dans les organismes ainsi que l'élimination de certains composés et le maintien ou l'augmentation de la biomasse.

Toxicité : Particularité propre à diverses substances dont l'absorption a pour effet de perturber le métabolisme des êtres vivants, provoquant des troubles physiologiques pouvant aller jusqu'à la mort des individus exposés. En fonction de l'intensité et de la rapidité des effets, on distingue une toxicité aiguë, une toxicité subaiguë et une toxicité à long terme encore dénommée toxicité chronique, résultant de l'exposition permanente à de faibles concentrations d'un toxique.

Toxicité aiguë : Cette toxicité est évaluée par le biais de tests de courte durée comparativement à la durée de vie de l'organisme soumis à l'essai (ex généralement moins de quatre jours pour les poissons).

Toxicité chronique : Cette toxicité est évaluée par le biais de tests couvrant une partie appréciable de la vie de l'organisme soumis à l'essai et permettant d'examiner les effets sur certains paramètres tels que le métabolisme, la croissance, la reproduction et la survie.

Voie directe : Expression relative au milieu environnant (l'eau dans le cas d'organismes aquatiques). Une contamination par voie directe consiste donc en une exposition des organismes à une substance donnée à partir du milieu environnant cet organisme.

Voie trophique : Expression relative à la chaîne alimentaire. Une contamination par voie trophique consiste donc en une exposition des organismes à une substance donnée par le biais de la chaîne alimentaire.

Xénobiotique : Substance chimique étrangère à l'organisme (xénos=étranger ; bios=vie) et se comportant comme un toxique ou un allergène vis-à-vis de l'organisme même à faible concentration.

Zone intertidale : Zone de balancement des marées.

ECOTOXICITY ASSESSMENT OF INDUSTRIAL WASTEWATER: EVOLUTION OF CATALASE ACTIVITY AS A BIOMARKER OF OXIDATIVE STRESS IN THE MUSSELS *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* AND *PERNA PERNA*

MEKNACHI Abdellah^{1,2}, DJELLALI Mustapha² and BADIS Abdelmalek^{1,*}

¹ Laboratory of Natural Products Chemistry and Biomolecules (LNPC-BioM), Faculty of Sciences, University of Blida 1, Road of Soumaâ, P.O. Box 270, 09000 Blida, Algeria

² National Centre for Research and Development of Fisheries and Aquaculture (CNRDPA) 11, Colonel Amirouche Street, P.O. Box 67, Bou-Ismaïl, 42415, Tipaza, Algeria

Reçu le 17/11/2019, Révisé le 29/05/2020, Accepté le 09/06/2020

Abstract

Description of the subject: Biomonitoring is being adopted by many research organizations to describe, explain, and predict the effects of pollutants and the degree of pollution on marine ecosystems.

Objective: The present research aims to evaluate the toxicological aspect of an industrial wastewater discharging in the Bou-Ismaïl bay area, based on catalase (CAT) as biomarker resulting under oxidative stress, measured in two sentinel species of mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *Perna perna*), represented by three size classes.

Methods: Mussels are exposed to different concentrations of effluent for 4 days and then detoxified for 10 days. At the end of each cycle, we measure proteins and the antioxidant activities CAT.

Results: A preliminary analysis of this effluent showed a considerable polluting load (COD / BOD = 10 and [MES] very high) and presence of trace metallic elements in particular mercury (Hg). Positive correlations between CAT activity and the different reject concentrations were obtained under acute or chronic exposure. CAT responses were significantly increased in the two mussel species in two size classes: Large (Myt: 545.88-688.08; Per: 242.32-1443.60) and Small [Myt: 737.59-1469.98; Per: 585.90-2563.42). Concerning the medium size class, the CAT responses in the *Perna* mussel revealed a more increased sensitivity to pollution than that in *Mytilus*. The mussels detoxification, led to a decrease in the rates of CAT mainly in the mussels *Mytilus* of small sizes.

Conclusion: The present research allows to qualify catalase as a relevant defense biomarker, sensitive, fast and efficient in assessing the impact of pollution and the health of the surrounding environment.

Keywords: Ecotoxicity assessment ; Industrial wastewater ; Catalase biomarker ; Mussels ; Size class.

ÉVALUATION DE L'ÉCOTOXICITE DES EAUX USÉES INDUSTRIELLES : EVOLUTION DE L'ACTIVITE CATALASE EN TANT QUE BIOMARQUEUR DU STRESS OXYDATIF CHEZ LES MOULES *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* ET *PERNA PERNA*

Résumé

Description du sujet: La biosurveillance est adoptée par de nombreux organismes de recherche pour décrire, expliquer et prévoir les effets des polluants et le degré de pollution sur les écosystèmes marins.

Objectif: La présente recherche vise à évaluer l'aspect toxicologique d'un rejet d'eaux usées industrielles dans la baie de Bou-Ismaïl, basé sur la catalase (CAT) comme biomarqueur résultant du stress oxydatif, mesuré dans deux espèces sentinelles de moules *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna*, représentées par trois classes de taille.

Méthodes: Les moules sont exposées à différentes concentrations d'effluents pendant 4 jours puis détoxifiées pendant 10 jours. A la fin de chaque cycle, nous avons mesuré les protéines et les activités antioxydantes CAT.

Résultats: Une analyse préliminaire de cet effluent a montré une charge polluante considérable (DCO / DBO = 10 et [MES] très élevée) et la présence des éléments de traces métalliques notamment le mercure (Hg). Des corrélations positives entre l'activité CAT et les différentes concentrations du rejet ont été obtenues sous exposition aiguë ou chronique. Les réponses CAT ont été significativement augmentées dans les deux espèces de moules dans deux classes de taille: Large (Myt: 545,88-688,08; Per: 242,32-1443,60) et Petite [Myt: 737,59-1469,98; Per: 585,90-2563,42). Concernant la classe de taille moyenne, les réponses CAT chez la moule *Perna* ont révélé une sensibilité à la pollution plus élevée que celle de *Mytilus*. La détoxification des moules, a conduit à une diminution des taux de CAT principalement dans les moules *Mytilus* de petites tailles.

Conclusion: La présente recherche permet de qualifier la catalase en tant que biomarqueur de défense pertinent, sensible, rapide et efficace pour évaluer l'impact de la pollution et la santé du milieu environnant.

Mots-clés: Evaluation de l'écotoxicité ; Eaux usées industrielles ; Biomarqueur de catalase; Moules ; Classe de taille.

* Corresponding author: BADIS Abdelmalek. E-mail: badisabdelmalek@yahoo.fr

INTRODUCTION

For centuries, coastal environments have been considered as being areas of major ecological and socioeconomic interests. It is also subject to pollution, which is the outcome of urbanization, demographic process and the development of industrial and agricultural activities [1-5]. In order to address marine pollution which endangers living organisms, threatens human health and affects the quality of waters, several national and international monitoring programs have set targets to permanently estimate the degree of pollution mainly in the Mediterranean region to ensure an early prevention of risks caused by different pollutants, hence to protect species and to preserve the quality of marine waters [6-9]. Traditionally, the contamination level in marine environment is introduced in terms of the concentrations of chemical pollutants present in the environment, however, these measures rely on advanced and expensive analytical techniques and which neither provide an estimate nor make a prediction of the impact of these substances on living organisms, reaching thus their limits as environmental management tools.

Therefore, other channels have been explored by means of bioindicators and/or biointegrators or ecotoxicological bioassays carried on living matters such as shells, fishes and plants [10-13]. Scientists and international monitoring organizations of marine pollution also claim the use of biological responses or biomarkers to enhance chemical analyses in monitoring programs.

Indeed, their use allows assessing, on the one hand, the concentrations of contaminants and their bioavailability in the sediments, water columns and organisms and the effects of these pollutants on the biological component of ecosystems, on the other hand [4, 5, 10, 14-20]. Biomarkers are used to assess the effects of the analyzed levels by means of conventional chemistry tools on biological responses of test organisms. Mussels such as *Mytilus galloprovincialis*, *Perna perna* and other marine bivalves are commonly used as sentinel species for biomonitoring coastal environments throughout the world, for their inherent characteristics which make them outstanding bioindicators [1, 4, 9, 14, 21-32]. With the biomonitoring objective in mind, the National Center for Research and Development of Fisheries and Aquaculture (CNRDPA, Bou-Ismaïl) is currently developing a program for aquatic ecosystems management and environmental monitoring and thus contributing to the research on pollution indicators. This work seeks to study the catalase biomarker as a biological response to induced stress by acutely exposing the Mussel *Mytilus galloprovincialis* and *Perna perna* in industrial effluent, in order to adopt a fast technique which is likely to provide integrated information about the health of the Bou-Ismaïl bay area at Tipaza (Algeria).

MATERIALS AND METHODS

1. Sampling and physicochemical characterization of the industrial effluent

The liquid discharge collection of the industrial effluent has been undertaken at the final spillage point in the sea as part of the sanitation network of the industrial area of Bou-Ismaïl (paper and carton industry, kraft paper recycling, and ceramic industry).

Figure 1: Map of Bou-Ismaïl bay with point of discharge location, Shellfish Center and Fouka Marine Desalination Plant.

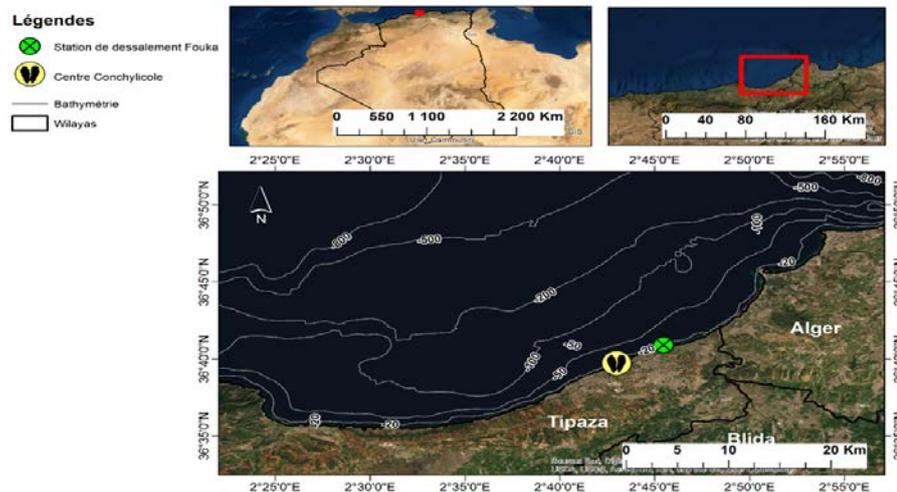


Table 1: Physicochemical parameters of the industrial effluent.

Parameters	Units	Standards of analysis	Results	Standards JORA 2006
Temperature	°C		23,7	<30
pH	/	Multi parameters	6,89	5,5 – 8,5
Electrical conductivity	ms/cm		2,06	/
SPM		ISO 11923 : 1997	5150	35
Kjeldahl nitrogen		ISO 5663 : 1984	59,5	30
Total phosphorus		ISO 6878 : 2004	3,35	10
Ortho phosphates			< 0,05	/
COD		ISO 6060 : 1989	5250	120
BOD ₅		ISO 5815-1 : 2003	525	35
chlorides		Rodier	390	/
Ammonium	mg/L		3,5	/
Nitrates		ISO 7890-11 :1986	9,75	/
Al		ISO 12020 : 1997	18	3
Cd		ISO 8288 : 1986	< 0,03	0,2
Cr		ISO 9174 : 1998	< 0,2	0,5
Co		ISO 8288 : 1986	< 0,2	/
Cu		ISO 8288 : 1986	0,4	0,5
Fe		FD T90-112	8,1	3
Hg	µg/L	ISO 5666 : 1999	2,615	0,01
Ni		ISO 8288 : 1986	< 0,2	0,5
Pb		ISO 8288 : 1986	< 0,2	0,5
Zn	mg/L	ISO 8288 : 1986	0,95	3
Sulfates		Rodier	170	/

JORA: Journal Officiel de la République Algérienne; Official Newspaper of the Algerian Republic

The varied origins of liquid discharges samples (industrial effluents, household effluents, final effluents of process and sewage treatment, leachate waters coming from landfills, unknown or accidental spill such as pipe breaks, etc.) frequently show significant variations of the level of pollutants equally from one sampling point to another, as well as from one time to another. It is crucial, to make the sampling more representative, to apply rigorous sampling protocols and to know the behavior of substances which will have influence on the choice of sampling methods. To this end, we drew on the protocols of Quebec Center of Expertise in Environmental Analysis [33, 34].

2. Mussels harvesting

Wild mussels used as a biological model are harvested from the sea buoyage signals in the sea water desalination plant in Fouka Marine (Fig. 1). The two mussel species *Mytilus galloprovincialis* and *Perna perna* co-exist and sampling has targeted the three size classes [2,2 ; 2,8], [4,3 ; 5,2] et [7,1 ; 8,6]. After harvesting the mussels, they are sorted, cleaned, their epibiont is removed, and measured by means of a vernier caliper gauge before launching adaptation phase.

3. Experimental procedure: Contamination / decontamination test

The different experimentations have been conducted and realized at the shellfish farming center of CNRDPA-Bou-Ismaïl (Fig. 1). The strategy of ecotoxicity tests consists of contaminating two mussel species *Perna* and *Mytilus*, of different size classes (**Large, Medium, Small**), by industrial discharge waters in the sea, and this, at different concentrations by dilution in breeding tanks of 70 liters. Mussels remain one week to adapt to experimental (acclimatization) conditions before the contamination test. All the mussels are kept in identical environmental conditions, and the use of air pumps ensures water aeration in tanks. Water used is daily renewed during the adaptation period and throughout the whole experimental cycle. Adaptation is a crucial step in implementing an experimentation as it should cover a sufficient period of time to allow organisms to adapt to laboratory conditions. In order to reduce other factors which might represent a source of disturbance or results interference, we measure the physicochemical parameters of seawater used for cultivating mussels on a daily basis during the experimental cycle (temperature, salinity, pH, dissolved oxygen) before and after changing water by means of YSI 556 multiparameter.

Following the acclimatization step, mussels are divided into five test groups in rectangular aquariums, and each group contain the both studied mussel species of different size classes. All the mussels are incubated in identical environmental conditions for a period of 4 days as a contamination cycle and 10 days as a decontamination cycle (0% pollutants). Thus, for 4 days mussels are exposed to four increasing concentrations (C1= 0.01%, C2= 0.15%, C3= 0.3% and C4= 0.5% (v/v)) of the effluent. The handling is compared to a control aquarium (0 mg/L pollutant). The four selected concentrations have been assessed in order to establish doses/responses relations between chemical pressure represented by the effluent's pollutants and the biological responses observed in mussels (CAT). At the end of each cycle, the digestive gland of the mussels is collected to be the object of biochemical assays of proteins and the antioxidant enzyme CAT.

4. Analytical methods and biochemical analyses

In our practice, the catalase activity is determined according to the method described by Atli et al. [35]. Total protein levels are estimated with the method of Lowry et al. [36], using bovine serum albumin (BSA) as a standard. In ice-cold, tissues are homogenized at the ratio of 1/10 (w/v) in Tris buffer (tris-hydroxymethyl-aminomethane) (20 mM; pH 7.8) for three minutes using a blender. The centrifugation of the homogenate is conducted at 10 000 g for 30 minutes between 4 and 5 °C. The obtained supernatant (S9 Fraction) is subsequently used to measure proteins and the catalase activity. 2.5 mL of substrate solution (25 mM H₂O₂ in the phosphate buffer 75 mM at pH 7) is placed in spectrophotometer cuvettes already seted in kinetic mode. After that 50 µL of the fraction S9 (enzyme source) is added to the mixture and followed by the decomposition of hydrogen peroxide measured by spectrophotometer at 240 nm within 60s-time span.

5. Statistical analyses

The data was tested for normality and homoscedasticity using the Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively. After, the statistical analysis was performed,

using a bilateral two-way analysis of variance (ANOVA) for independent samples, followed by Tukey post-hoc analysis. Significance was set at $P < 0.05$.

RÉSULTATS

1. Industrial effluent characterization.

The results of the analysis of the main parameters of the industrial effluent are mentioned in the table (1). In general, the values recorded in this table are far beyond (considerably) discharge spill limit values of the industrial effluent liquids recommended by the Algerian standards (JORA, 2006). Also, some parameters stand even higher than maximum limit values (JORA, 2009) for harmful substances in non-domestic wastewater at the time of discharge in a public sewerage system or in a wastewater treatment plant. Thus, the values of SPM and that of COD exceed 8 times and 5 times respectively the Algerian standards of untreated liquid discharges (JORA, 2009). In addition, the industrial effluent appears to be rich in dissolved salts (when conductivity > 2 [37]) and highly concentrated in chlorides (390 mg/L) and some metallic elements like iron (8,1 mg/L), aluminum (18 mg/L) and mainly mercury (2,615 mg/L). The particularity of the latter is that it is not removed by living organisms and thus it generates bioaccumulation all along the food chain with remarkable adverse effects including: neurotoxicity, immunotoxicity, stress and oxidative damage, behavior modification, inhibition of growth and alteration of tissues [38, 39]. The discussed values, are alarming if we consider the direct impact in the long and short terms in the receiving environment. The industrial effluent is not readily biodegradable when we noticed the ratio values COD/BOD₅ in the range 10. The presence of toxic substances in the discharges inhibits the development of some aquatic organisms or causes their mortality [40]. High level of SPM in the natural aquatic environment (lagoon, watercourse, estuary etc.) might have two types of adverse effects: physical at first, by the formation of light-blocking screen (photosynthesis decrease and consequences along the food chain, until reaching the eutrophication of the environment), or even clogging fish gills; Secondly, chemically, the sedimentation SPM generates a potential pollution/pollutants reserve [41, 42].

If silting is not a problem, for the time being, given the seawater large absorptive capacity, the decrease of clarity and high turbidity of water, visible from a great distance, indicating an evident pollution in the water where animal and plant life is compromised [43]. The values of the other parameters recorded in the table (1), lie close or in the normative interval of the industrial effluent discharges. Notwithstanding the fact that in the current study the discharge is directly released at sea. Hence, taking into account the continuous flow of the liquid discharge, the levels of harmful substances will certainly contribute to enriching the receiving environments. For instance, 30 mg/L kjeldhal nitrogen are potentially a source producing about 130 mg/L of nitrates in water [43]. According to Yadav et al. [37], the presence of odor and color as in the case of the liquid discharge in the current study is due to the presence of ammonium ($3.5 \text{ mg/L} > 0,5 \text{ WHO}$) and transition elements and/or their complexes respectively. They attribute the toxicity of the effluent (Fertilizer industry effluent), on the fish *Channa striatus*, to the impact of some metallic elements and to ammonium also present in the discharge water. Moreover, while the levels of metallic elements (Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb et Zn), in the effluent of this study, are below the detection limit or even below the standard, there is always a risk of permanent pollution of the environment along terrible ecological consequences. An increased mortality of the urchin *Paracentrotus lividus* was observed in the distant area of the leakage point of the liquid effluent. Damaging an equally important element of the trophic level will show the disturbance of biodiversity in the receiving environment. The harmful substances present in the industrial discharges, more specifically trace metals (TMs), are released in the aquatic environment in a bioavailable form, then bioassimilable by fauna and flora [44-47]. The presence of TMs in the aquatic compartment can have a detrimental effect (toxic) on the initial stage of the embryonic development of several marine species. Thus, Nadella et al. [48], demonstrated the highly toxic effect of some dissolved metals on embryos of *Mytilus trossolus*. They classified the toxicity level of dissolved metals as follows: toxicity $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Cd}$. According to Martin et al. [49], toxicity level of TMs on the embryonic stage of the mussel *Mytilus edulis* is as follows: $\text{Hg} > \text{Cu} > \text{Ag} > \text{Zn} > \text{Pb} > \text{Ni} > \text{Cd} > \text{Ar} > \text{Cr} > \text{Se}$. According to Roccheri et al. [50], even in the

decontamination cycle, following urchin *Paracentrotus lividus* embryo's exposure mainly to cadmium, stress proteins continue to be synthesized by eventually concluding the irreversibility of stress mechanisms. According to Boukadida et al. [51], hypersensitivity of the embryo-larval stage of *Mytilus galloprovincialis*, to pollution by metals (Cu, Ag and the mixture) combined with increasing temperature will certainly lead to reproduction impairment of *Mytilus galloprovincialis* in the Mediterranean Sea due to global warming. Coppola et al. [52] confirm, once again, the acute risk of the combined effect of arsenic and the temperature on the mussel *Mytilus galloprovincialis*.

Also, negative effects on the immune system with histopathological effects and on fertilization (eg: late embryos of irregular pluteus) of several aquatic species are described under the effect of TMs and other chemical pollutants while activating the different stress and defense mechanisms, mainly the HSP synthesis and the apparition of apoptosis and / or autophagy.

Once again, the effects are associated with temperature increase [1, 2, 28, 53-58].

2. CAT evolution during the contamination cycle

The will to develop more sensitive and methods faster than the classical mortality or reproduction tests has allowed the concept of biomarkers to be implemented as an early response of the health of indicator species. Hence, the objectives of this new approach are often the search of concentrations that induce the triggering of biological mechanisms (eg: defence mechanism CAT). Mortality is therefore only the final stage indicating the ineffectiveness to maintain homeostasis. Results pertaining to catalase measurement (CAT) in the mussels (*Mytilus galloprovincialis*) contaminated by

the industrial discharge are shown in the figure (2) below.

Regarding the medium-size class mussel *Mytilus*, statistical analyses have shown no significant effect ($p < 0.05$), by the industrial effluent, on the responses of the defense enzyme catalase, and that is compared to control group and to assessed concentration gradient.

The four assessed pollutant concentrations do not seem to have a significant effect on the induction of the antioxidant defensive mechanism where no significant effect is measured between concentrations. A significant impact ($p < 0.01$) of contamination by the industrial effluent is noticed on the large-size class mussels *Mytilus* exposed to the concentrations C2 and C3. Also compared to control individuals (CAT: 307.89 ± 23.86 U/mg Protein/min), a proportional increase of catalase activity is measured in specimens of mussels exposed to the concentrations C1, C2 and C3. The activities reached are respectively 545.89 ± 106.65 , 623.71 ± 81.48 and 688.09 ± 35.33 U/mg protein/min.

The concentration C4 (CAT: 551.08 ± 90.46 U/mg Protein/min) had a non-significant effect ($p < 0.05$) and identical to the concentration C1 on the induction of the antioxidant enzyme CAT. In the small-sized class mussels, the individuals of the latter have shown hyperactivity in the induction of the antioxidant mechanism marked by CAT. Thus, and compared to control group, the highest induction of catalase is measured under the effect of the concentration C4. Also, the trend was almost proportional with the four assessed pollutant concentrations. At this time we have noticed no significant effect ($p < 0.05$) between the concentration C1 (CAT: 737.59 ± 4.33 U/mg Protein/min) and C3 (CAT: 760.33 ± 64.27 U/mg Protein/min),

while a very significant effect ($p < 0.01$) of concentration is recorded compared to control group (416.13 ± 65.25 U/mg Protein/min). The study of the independent effect (ANOVA-2, $p < 0.05$) of each concentration on the CAT response in the three size classes reveal significant and non-significant effects depending on the case under consideration. Hence, the measured values of the catalase activity in the control individuals (no contaminant) have shown no significant difference between the three studied classes. Under the effect of the concentration C2, the statistical difference is significant irrespective of the studied size class. Moreover, and compared to the small-sized class, the difference is always significant between the compared size classes. However, the statistical analysis reveals a non-significant effect between the medium and large size classes and this under the effects of the concentrations C1, C3 and C4. According to the obtained results, the statistical analysis (ANOVA-2) of the effects of the contaminant concentration and the interaction with the size class highlighted the fact that the medium-sized class mussels *Mytilus* (juvenile) have been the most resistant to contamination. The large-sized individuals *Mytilus* reveal an average sensitivity, while the smaller ones *Mytilus* seemed more sensitive to the concentration effect. Figure (3), below, represents the catalase activities measured in the mussel *Perna perna*.

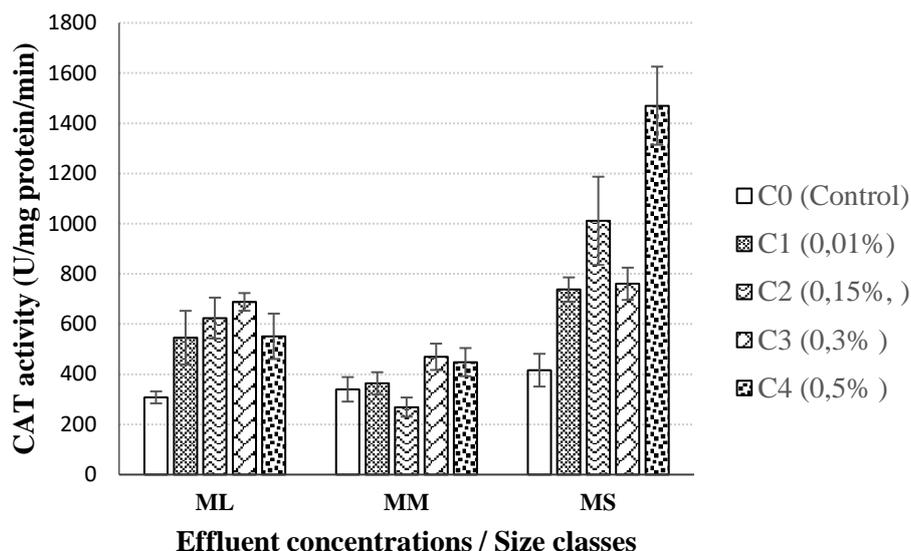


Figure 2: Catalase activity variation in the mussel *Mytilus galloprovincialis* contaminated by the industrial wastewater effluents.

ML: *Mytilus* Large, MM: *Mytilus* Medium, MS: *Mytilus* Small.

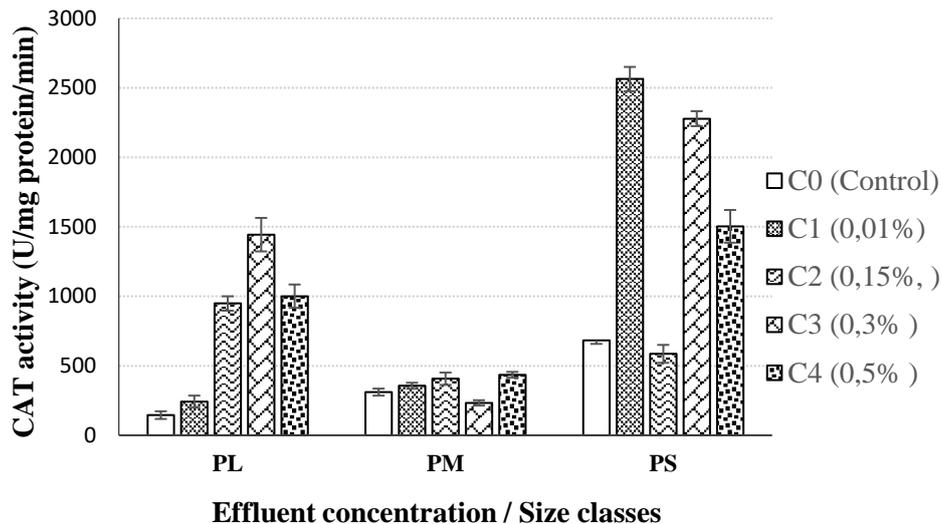


Figure 3: Catalase activity variation in the mussel *Perna penaeus* contaminated by the industrial wastewater effluents.

PL: *Perna* Large, PM: *Perna* Medium, PS: *Perna* Small.

As was the case in the mussel *Mytilus*, the medium-sized class mussel *Perna* (juvenile) has again shown no sensitivity to contamination by the mixture of xenobiotics present in the industrial effluent. Therefore, the catalase activities measured in the individuals of this size class, under the effect of four concentrations, have shown no significant difference ($P < 0.05$) from the measured enzymatic response (CAT). In the large-sized class individuals *Perna*, the concentration C1 had no significant effect ($p < 0.05$) on the induction of the antioxidant enzyme CAT. Compared to the control group (CAT : 145.24 ± 27.68 U/mg Protein/min), and under the effect of the concentrations C2, C3 and C4 we measured a very significant induction ($P < 0.001$) of CAT along with a maximum activity (893.95%) (CAT : 1443.61 ± 120.57 U/mg protein/min) measured under the effect of the concentration C3. The concentrations C2 and C4 have revealed an identical effect on the activation of the defense enzyme CAT (984.45 ± 51.69 and 1001.07 ± 83.95 U/mg protein/min; 553% and 589.26%, respectively). The most important inductions of the CAT activity in the mussel *Perna* are also measured in the small-sized class specimens. Furthermore, and compared to the controls (CAT: 684.14 ± 26.60 U/mg protein/min), we noticed very significant levels of induction ($p < 0.001$) in the range of 274.69%, 233.01% and 119.76% in the individuals exposed to the concentrations C1, C3 and C4 respectively.

In contrast, the CAT activity measured under the effect of the concentration C2 (CAT: 585.91 ± 64.54 U/mg protein/min) can only show an inactivation of the anti-oxidative stress activity, despite the difference compared to the controls was not significant ($P < 0.05$). The measurements taken were reproducible which allowed us to say that the enzyme might be inhibited. In aquatic organisms, antioxidant system enzymes are induced or inhibited by the pollutant and this according to the tested dose, to the specie and mainly to the exposure time [11, 59]. Compared to the small-sized class (CAT: 684.14 ± 26.60 U/mg protein/min) and in the absence of contaminants, we measure the significant differences (ANOVA-2, $p < 0.01$) in the rate of CAT activity between the three studied size classes. Nevertheless, no difference ($P < 0.05$) has been measured between the two medium and large-sized classes. The effects of concentrations C3 and C4, on the rate of the catalase induction, have shown significant differences (ANOVA-2, $p < 0.001$) regardless of size class with marked effect of the concentration C3 in the small-sized individuals *Perna*. The concentration C1 has shown the highest activity of CAT and this in small-sized *Perna*. But the same concentration has shown no significant effect of contamination in the two medium and large-sized classes. The difference is not significant ($p < 0.05$) between species and even in the same size class and this compared to the controls.

We have observed no significant difference (ANOVA-2, $p < 0.05$) of the effect of the concentration C2 between the small and medium-sized classes. However, the difference of the effect of the same concentration is very significant (ANOVA-2, $p < 0.05$) between small *Perna*/large *Perna* on the one hand and medium *Perna*/large *Perna* on the other hand. In addition, based on the obtained results, the medium-sized mussel *Perna* shows up the most resistance to contamination by the industrial wastewater. Large-sized class revealed sensitivity more or less significant towards the effect exerted by the xenobiotics of the real effluent. The hyperactivity of anti-oxidative stress defense mechanism is still marked in the small-sized class mussels *Perna*.

3. CAT evolution during the decontamination cycle

The figures (4 and 5), illustrate the CAT activities achieved at the end of the decontamination cycle in the control groups and those previously contaminated by the concentrations C3 and C4 of the species *Mytilus* and *Perna*, respectively.

The CAT activities measured at the end of the contaminations cycle are introduced in the diagram for a comparative purpose in order to study the reversibility of the anti-oxidative stress mechanism and the curability of the sentinel specie. In the individual medium-sized class mussels *Mytilus*, contamination has no outstanding effect on the increase of the rate of antioxidant activity CAT. Moreover, detoxification of the medium-sized mussels led to a decrease of the level of activity CAT in the range of 8.68% (C3Detox) and 3.85% (C4Detox) to reach activities close to those measured in the control group. The statistical analysis has highlighted no significant difference ($P < 0.05$) between the measured CAT activities. The large-sized mussel *Mytilus* detoxification led to a decrease (7.53%) of the CAT activity in the mussels previously exposed to the concentration C3. However, and compared to the control group, the statistical analysis revealed no significant difference ($P < 0.05$) between the two CAT activities reached at the end of the detoxification cycle.

Furthermore, and by referring to the measured catalase activity at the end of the contamination cycle (CAT: 551.08 ± 90.49 U/mg protein/min) in the large-sized class individuals under the concentration effect C4, an increase of 31% is measured at the end of the decontamination cycle (C4Detox). Also, the statistical difference was significant ($p < 0.05$) compared to the controls group. So, the degree of the enzyme activation can be considered as a sign of mussel's exposure to a past contamination caused by the industrial effluent. As a first assumption, the detoxification seems to have a curative effect on the specimen mussels previously exposed to the concentration C3 with a reversibility of the antioxidant mechanism. Nevertheless, the 10 days' time does not seem to be sufficient for mussels to recover their initial physiological mechanism, mainly in individuals previously contaminated by the concentration C4. However, the reversibility of the enzymatic process is much clearer in the small-sized class mussels *Mytilus*. Thus, and compared to CAT activities attained at the end of the contamination cycle, we measured decrease in CAT activity in the range of 40.01% and 66.60% in the mussels previously contaminated by the concentration C3 and C4 respectively. The statistical differences are very significant ($p < 0.01$). Also, the catalase activities reached at the end of the detoxification cycle are close to those measured in the controls and no significant difference ($P < 0.05$) is noticed between the measured activities. The decrease of the induction of the CAT activity might be considered as a sign of reversibility of the health of the specimens. Biomarkers of antioxidant defense like CAT contribute to maintaining organism homeostasis and are usefully used in the environmental biomonitoring [11, 59-65]. Except large-sized mussels previously contaminated by the concentration C4, the study of the independent effect (ANOVA-2, $p < 0.05$) of the detoxification has highlighted no significant difference between the CAT activities measured and this regardless of the studied class size. Moreover, the measured activities of the anti-oxidative defense enzyme can only be translated in the curability of the individuals and the efficiency of the detoxification cycle so that the mussels *Mytilus* return to their initial homeostasis state.

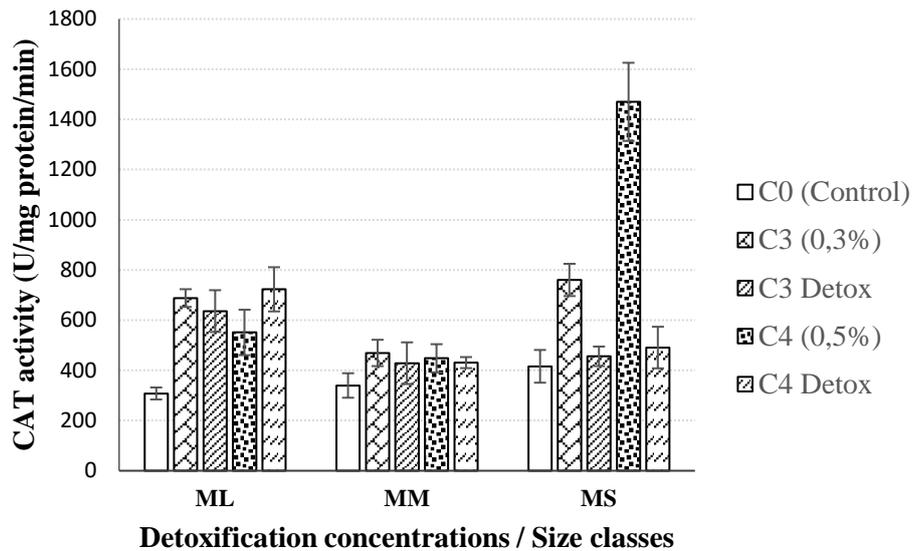


Figure 4: Catalase activity variation in the mussel *Mytilus* after the decontamination cycle. ML: *Mytilus* Large, MM: *Mytilus* Medium, MS: *Mytilus* small.

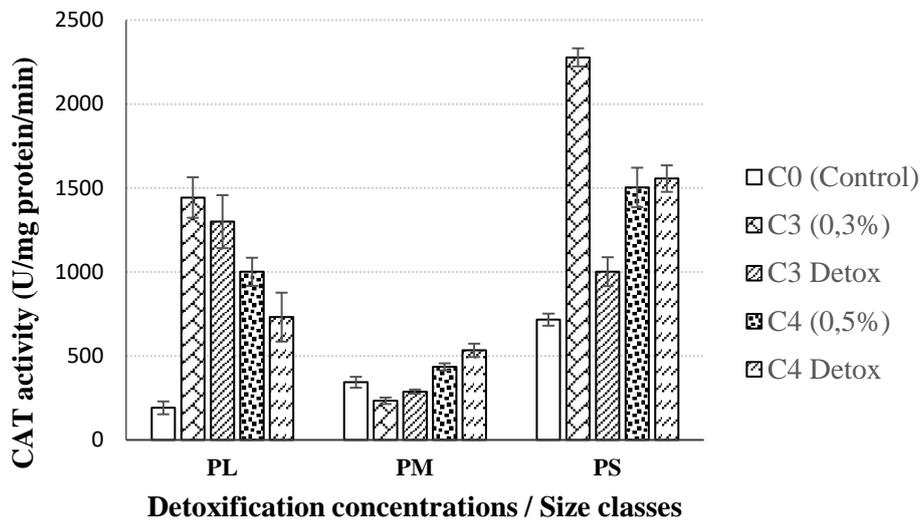


Figure 5: Catalase activity variation in the mussels *Perna* after the decontamination cycle. PL: *Perna* Large, PM: *Perna* Medium, PS: *Perna* small.

Compared to control group, the medium-sized class mussels *Perna* have shown no significant difference ($p < 0.05$) between the CAT activities measured at the end of the decontamination cycle. Nevertheless, increases in the range of 2.34% and 2.25% are measured in the previously contaminated specimens by the concentrations C3 and C4, respectively. This non-significant difference translates the long-term stability of the physiological activity (biochemical metabolisms) of juvenile mussels. We measured a decrease in CAT activity at the end of the detoxification cycle in the large-sized mussel *Perna*.

The decrease being significant (26.95%) in the individuals previously contaminated by the concentration C4 while it is not significant (9.95%) in mussels previously contaminated by the concentration C3. By contrast, the attained activities were higher than those measured in the control group. Hence, the mussels *Perna* seem that they did not find sufficient detoxification duration so that the homeostasis of specimens recovers. In the small-sized class mussel *Perna*, we measured a very significant decrease of activities in the range of 56% in the individuals previously contaminated by the concentration C3.

Compared to the CAT activity (CAT: 1503.53±117.67 U/mg protein/min) measured at the end of the contamination cycle, the detoxified individuals from the concentration C4 have shown a slight increase (3.51%) of the CAT activity. Nevertheless, the difference was not significant ($p < 0.05$). Moreover, it seems that the detoxification duration remains insufficient so that the CAT activity of the previously contaminated specimens (CAT C3D: 1001.87±86.11 and CAT C4D: 1556.33±78.88 U/mg protein/min) becomes close to that of the controls (CAT: 716.22±35.94 U/mg protein/min). As was the case in the contamination cycle, the specie *Perna* kept the same difference measured between the controls of the different size classes. Also, two-way ANOVA test show a significant difference ($p < 0.01$) irrespective of the size class in the detoxified mussels of the la concentration C3. Furthermore, the mussels detoxification of the concentration C4 revealed significant differences ($p < 0.001$) between small *Perna* / medium *Perna* on the one hand and small *Perna* / large *Perna* on the other hand. Between medium *Perna* / large *Perna* the independent effect of the detoxification, being non-significant ($P < 0.05$), expresses a similar trend to the CAT response.

DISCUSSION

The industrial wastewaters vary from one industry to another, they might contain toxic products, trace metals, organic pollutants, hydrocarbons, etc.

The mussel is an accumulating filtering bivalve of micropollutants. It can concentrate trace elements into concentrations higher than those found in its environment [61, 62, 64, 66-68]. During every physiological exchange process with the surrounding environment.

The exogenous molecules penetrate through biological barriers separating the internal environment from the external environment of the organism [12]. The accumulation of chemical substances in the organisms

is the reason behind the unsteadiness of the redox balance [64]. The origin of the oxidative stress in the aerobic organisms comes from the intracellular intake of the oxygen molecule which is essential for several physiological functions but it generates, at the same time, reactive oxygen species (ROS) which are potentially toxic to the cell.

The main origins of ROS production come from the oxidative phosphorylation of the ADP, microsomal electron transport chains, phagocytic activity and the activity of several enzymes that produce ROS such as intermediary molecules. The xenobiotics might increase the intercellular production of ROS, for instance, during their reduction, where they can be converted into their free radical which will quickly give its electron to an oxygen molecule and produce superoxide radical anion. The latter, in turn, will respond

in a chain reaction and hence amplify the initial phenomenon [4, 5, 64, 69-71].

In order to control the formation of these reactive species, cells have an antioxidant defense complex composed of enzymes

(super oxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase) and of molecules that trap the free radical species at the level of membranes (vitamin E, β -carotene) or of the aqueous phase (ascorbic acid, uric acid and glutathione).

The antioxidant defense enzyme CAT

is known for being induced to deal with oxidative stress [5, 59, 64, 71-73]. The catalase is an haemoprotein present at the level of peroxisomes which contributes to the defense against the ROS. It catalyzes the dismutation of the hydrogen peroxide into oxygen

and water ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) [35, 69, 70, 74-76]. Thus, the induction of the CAT activity

is a sign of mussels' exposure, of the current study, to the oxidative stress caused by

the xenobiotics present in the industrial effluent. The major importance of the CAT lies in its role to eliminate hydrogen peroxide [3, 5, 11, 62, 77, 78]. Excess of the latter diffuses into the cell causing oxidative damage [64]. H_2O_2 might alter the cellular physiology as a result of the formation of $\text{OH}\cdot$ radical by the Fenton reaction (1) [61, 64].

The $\text{OH}\cdot$ radical is the most reactive and the most toxic of the ROS species to the cell. $\text{Fe (II)} / \text{Cu (I)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}\cdot + \text{OH}\cdot + \text{Fe (III)} / \text{Cu (II)}$. (1)

At the cell level, the damage brings about alteration and more precisely the oxydation

of compenents such as the DNA, the proteins and the lipides with a widespread disturbance of the redox balance (ratios GSH/GSSG et NADH/NAD⁺) [11, 61, 64, 78, 79].

Ideally, the energy metabolism is associated with the energy allocated to the organism's defense functions and to the maintenance of the basic metabolism, of growth and reproduction [12, 69, 80-82].

According to Jean-Claude and Claude [69], the defense biomarkers allow organisms to fight and survive in the presence of pollutants at reasonable levels but this at an energy cost for the individual. Thus, several studies [76, 83-86] confirm, once again, the increase of metabolic rates in the organisms exposed to various chemical stresses generating different defense biomarkers. In our study, the medium-sized class individuals (young) of the two mussel species *Perna* and *Mytilus*, are found to be the most resisting to contamination, and the assessed pollutant concentrations have shown no significant effect ($P < 0.05$) on the CAT responses. However, the small-sized ones have shown greater sensitivity to contamination. The results obtained show a highly important defense enzyme CAT increases. This increase of energy spending to deal with the endured stress might lead to a reduction of energy investment in growth and/or reproduction with possibly an impact in maintaining the population. Toxic molecules interact with biological molecules. Therefore, the exposed organisms develop various defense mechanisms: avoidance and/or isolation, active removal, neutralization by complexation with proteins, etc. [69]. These defense costs are added to maintenance costs. Therefore, there is a quantitative correlation between the organism's defense capacity (survival) and its production capacity of biomass (growth and reproduction). Furthermore, the energy allocation for defense, maintenance and cells regeneration is privileged than growth or reproduction [82]. In mussels, the avoidance or isolation strategy is not possible, the strategy of the antioxidant enzymes seems to be the best resort to deal with xenobiotics. The excretion and sequestration in tissues might also be another resort. However, it has been demonstrated that the first responses to the presence of contaminants are those linked to an antioxidant system [11, 61-64].

In the present work, we have measured increases in the CAT activity under the effect of contamination and also decreases of the CAT activity have been noticed at the end of the detoxification cycle. Hence, it is easy to highlight the existence of a direct link between the level of pollution and the degree of the CAT stimulation. Furthermore, the decrease of the induction of the CAT activity might be considered as a sign of the reversibility of the specimens' health.

The defense biomarkers like the CAT contribute to maintaining the homeostasis of the organism [61-64]. In the absence of contaminants in the environment, the reverse processes to the accumulation quickly intervene, especially when achieving the biological target was not acute, and this in order to increase the efficiency to excrete trace elements concentrated within the organism. According to Geffard et al. [61-64], the elimination of metals might be demonstrated by moving organisms from a contaminated to a clean environment. Indeed, the curability of the health of the specimens is the result of an expected efficiency of the different decontamination processes and the elimination of the accumulated xenobiotics translated into a decrease of the quantity of a bioaccumulated pollutant. In parallel to measuring the CAT activity, Box et al. [62] have measured the concentration of the malondialdehyde MDA (the oxidation marker of the phospholipid membrane) in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) transplanted in different estuaries characterized by a different pollution gradient. However, no significant change of MDA has been observed along with an increase of the induction of the CAT activity, thus justifying the protecting role of the CAT against the oxidation of the components of the cellular membrane. According to the same authors, the glutathione peroxidase activity (GP_x) appeared unchangeable (The GP_x breaks down H_2O_2 like the CAT) hence concluding the major importance of the CAT response to oxidative stress. According to Jean-Claude et al. [69], because of stress, organisms implement an energy strategy in favour of low-energy consumption enzymes. In fact, the catalase neither requires a co-factor nor energy for its activity, whereas glutathione peroxidase consumes reduced glutathione and NADPH. Under the effect of a concentration of $2 \mu\text{g/L}$ of copper, Xu et al. [87], also observed a significant response of the CAT along with non-significant changes of SOD activity and concentrations in MDA measured in the mussels *Mytilus coruscus*. However, significant levels of MDA with reduced CAT activity has been demonstrated in the case of a persistent high pollution. According to Mejdoub et al. [11], the low activity of antioxidant enzymes such as the CAT, will increase the content of superoxide radical and H_2O_2 .

They will be reacting together to produce hydroxyl radical that can attack all biomolecules and disturb the cell metabolism. Moreover, and according to Vlahogianni et al. [64], many scientists consider the CAT as a biomarker, sensitive and important of the oxidative stress, better than the SOD, revealing biological effects in the redox status of marine organisms. Although some authors [4, 88-92] measured late answers of CAT activity with contradictory responses or again non-significant correlations between the CAT and the nature of the pollutant, several other scientists confirm the relevance of the catalase as a biomarker of oxidative stress caused by chemical pollutants and even biological [5, 11, 93-95]. Richir and Gobert [96], in their study of the correlations of bioaccumulation of 19 TMs, by the mussel *Mytilus galloprovincialis*, on the basis of size, weight, sex and stage of maturity, have noticed that the medium-sized class showed the best correlation with some metabolic stability. Furthermore, small-sized class mussels presented inter-individual variations and that bioaccumulation modelling was not easy, given the hyperactivity of this size class. Notwithstanding, the highest accumulation of almost all of the 19 TMs was in the small-sized mussels. Thus, the authors recommended, not using extreme size classes (small or large) in the monitoring programs. The medium-sized class is the most resisting with a more stable metabolism, thus responding to the choice of a bioindicator of the level of pollution. Therefore, the results obtained by Richir and Gobert [96], can only confirm our experimental results and conclude for the effect and/or the impact of the wastewater effluents, of the current study, on the sentinel species of the mussels *Mytilus* and *Perna*. Hence, the environmental impact affects the small individuals and prevents them from having the opportunity to survive through to mature stage and reproduce. Also, large individuals will not be able to produce a new generation under stressful conditions. As stated, an increase of energy spending for the basic metabolism to combat endured stress might lead to the reduction of energy investment for growth and/or reproduction. In this way, the medium-sized class cannot by itself ensure preserving the generation and the results will be the extinction of the specie as was the case in the Algerian coasts,

hence leading to considerable effects on the wealth and the biodiversity of the coastal environments which represent practically almost all (80%) of the marine biodiversity according to several scientists [97].

CONCLUSION

The findings of mussels exposure to wastewater have demonstrated positive correlations between the induced enzymatic activity (CAT) and the assessed concentrations. Thus, significant increases of CAT have been identified in both mussel species of large-sized classes but mainly in small-sized classes. No significant difference of CAT activity has been found in the medium-sized class of the two species, which showed resistance and/or adaptation to the effects of the assessed concentrations. The mussels detoxification, led to a decrease in the rates of CAT mainly in the mussels *Mytilus* of small sizes. The present research allows to qualify catalase as a relevant defense biomarker, sensitive, fast and efficient in assessing the impact of pollution and the health of the surrounding environment, especially in aquatic ecosystems.

Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to the financial support of DGRSDT. This work could not have happened without the support of a large number of people. I particularly want to thank Mr Abassi Djamel Eddine for his contribution to the English translation. Also, I am very grateful to three other people who counted enormously in the outcome of this work Mr Zenati Bilal, Mr Kordali Sid Ali and Mr Dilmi Amar. An immense thanks also to Mrs Belmaskine Hayate for her efforts to correct the manuscript and her pertinent remarks. I am also very grateful to the intern Mr Kritli Nabil.

REFERENCES

- [1]. Akaishi, F. M., St-Jean, S. D., Bishay, F., Clarke, J., da, S. R. I. and de Oliveira Ribeiro, C. A. (2007). Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquat Toxicol*, **82**(1): 1-14.
- [2]. Borgia, VJF., Thatheyus, AJ., Murugesan, AG., Alexander, SCP. and Geetha, I. (2018). Effects of effluent from electroplating industry on the immune response in the freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *Fish & shellfish immunology*, **79**:86-92.

- [3]. Kopecka, J., Lehtonen, KK., Barsiene, J., Broeg, K., Vuorinen, PJ. and Gercken, J. (2006). Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdansk (southern Baltic). *Marine pollution bulletin*, 53(8-9):406-21.
- [4]. Peric, L., Nerlovic, V., Zurga, P., Zilic, L. and Ramsak, A. (2019). Variations of biomarkers response in mussels *Mytilus galloprovincialis* to low, moderate and high concentrations of organic chemicals and metals. *Chemosphere*, 174:554-62.
- [5]. Sparks, C., Marnewick, J., Toefy, R., Snyman, R. and Odendaal, J. (2019). Baseline levels of antioxidant activities in *Mytilus galloprovincialis* along the coast of Cape Town, South Africa. *Marine pollution bulletin*, 140:287-93.
- [6]. Viarengo, A., Burlando, B., Giordana, A., Bolognesi, C. and Gabrielides, G. (2000). Networking and expert-system analysis: next frontier in biomonitoring. *Marine environmental research*, 49(5):483-6.
- [7]. Viarengo, A., Lafaurie, M., Gabrielides, G., Fabbri, R., Marro, A. and Romeo, M. (2000). Critical evaluation of an intercalibration exercise undertaken in the framework of the MED POL biomonitoring program. *Marine environmental research*, 49(1):1-18.
- [8]. Green, N., Ruus, A., Bjerkeng, B., Brevik, E., Håvardstun, J. and Mills, A. (2008). Coordinated Environmental Monitoring Programme (CEMP). Levels, trends and effects of hazardous substances in fjords and coastal waters-2007.
- [9]. Taleb, ZM., Benali, I., Gherras, H., Ykhlef-Allal, A., Bachir-Bouiadjra, B. and Amiard, J-C. (2009). Biomonitoring of environmental pollution on the Algerian west coast using caged mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Oceanologia*, 51(1):63-84.
- [10]. Brooks, SJ., Farmen, E., Heier, LS., Blanco-Rayon, E. and Izagirre, U. (2015). Differences in copper bioaccumulation and biological responses in three *Mytilus* species. *Aquat Toxicol*, 160:1-12.
- [11]. Mejdoub, Z., Fahde, A., Loutfi, M. and Kabine, M. (2017). Oxidative stress responses of the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to emissary's pollution in coastal areas of Casablanca. *Ocean & Coastal Management*, 136:95-103.
- [12]. Casas, S. and Bacher, C. (2006). Modelling trace metal (Hg and Pb) bioaccumulation in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, applied to environmental monitoring. *Journal of Sea Research*, 56(2):168-81.
- [13]. Flammarion, P., Devaux, A. et Garric, J. (2001). Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Exemples d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (357-360):209-26.
- [14]. Aslan, E., Görgün, AU., Katalay, S., Filizok, I., Becerik, S. and Aydemir, T. (2018). An investigation on the seasonal variations of the biomarkers of oxidative stress response and their correlations to Polonium-210 in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and common sole (*Solea solea*) from Izmir Bay, Turkey. *Journal of environmental radioactivity*, 189:103-8.
- [15]. van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, NPE. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2):57-149.
- [16]. Fossi, M., Marsili, L., Junin, M., Castello, H., Lorenzani, J. and Casini, S. (1997). Use of nondestructive biomarkers and residue analysis to assess the health status of endangered species of pinnipeds in the south-west Atlantic. *Marine pollution bulletin*, 34(3):157-62.
- [17]. Ruiz, P., Ortiz-Zarragoitia, M., Orbea, A., Theron, M., Le Floch, S. and Cajaraville, MP. (2012). Responses of conventional and molecular biomarkers in turbot *Scophthalmus maximus* exposed to heavy fuel oil no. 6 and styrene. *Aquatic toxicology*, 116:116-28.
- [18]. Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Solé, M., Porte, C. and Cajaraville, MP. (2002). Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic toxicology*, 58(1-2):75-98.
- [19]. Bessi, H. et El Alami, M. (2009). Les bio-essais dans l'évaluation d'impact des polluants sur les écosystèmes dulçaquicoles. Les technologies de laboratoire, 4(15).
- [20]. Forbes, V.E., Palmqvist, A. and Bach L. (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(1): 272-280.
- [21]. Capelli, R., Contardi, V., Fassone, B. and Zanicchi, G. (1978). Heavy metals in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the gulf of La Spezia and from the promontory of Portofino, Italy. *Marine Chemistry*, 6(2):179-85.
- [22]. Raspor, B., Pavičić, J. and Branica M. (1989). Cadmium-induced proteins from *Mytilus galloprovincialis*-polarographic characterization and study of their interaction with cadmium. *Marine Chemistry*, 28(1-3):199-214.

- [23]. Odžak, N., Martinčić, D., Zvonarić, T. and Branica, M. (1994). Bioaccumulation rate of Cd and Pb in *Mytilus galloprovincialis* foot and gills. *Marine Chemistry*, 46(1-2):119-31.
- [24]. Kurelec, B. and Pivčević, B. (1991). Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic toxicology*, 19(4):291-301.
- [25]. Regoli, F. and Orlando, E. (1993). *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of lead pollution: biological variables and cellular responses. *Science of the total environment*, 134:1283-92.
- [26]. Giandomenico, S., Spada, L., Annicchiarico, C., Assennato, G., Cardellicchio, N. and Ungaro, N. (2013). Chlorinated compounds and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected from Apulia Region coasts. *Marine pollution bulletin*, 73(1):243-51.
- [27]. Barut, IF., Meric, E. and Yokes, MB. (2016). Assessment of recent and chalcolithic period environmental pollution using *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 from Yarimburgaz Cave, the northern Marmara Sea and Bosphorus coasts. *Oceanologia*, 58(2):135-49.
- [28]. Balbi, T., Franzellitti, S., Fabbri, R., Montagna, M., Fabbri, E. and Canesi, L. (2016). Impact of bisphenol A (BPA) on early embryo development in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: Effects on gene transcription. *Environ Pollut*, 218:996-1004.
- [29]. Danellakis, D., Ntaikou, I., Kornaros, M. and Dailianis, S. (2011). Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic toxicology*, 101(2):358-66.
- [30]. Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Campillo, JA. and Beiras, R. (2010). Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). *Chemosphere*, 78(3):265-72.
- [31]. Torre, A., Trischitta, F. and Faggio, C. (2013). Effect of CdCl₂ on regulatory volume decrease (RVD) in *Mytilus galloprovincialis* digestive cells. *Toxicology in Vitro*, 27(4):1260-6.
- [32]. Giandomenico, S., Spada, L., Annicchiarico, C., Assennato, G., Cardellicchio, N. and Ungaro N. (2013). Chlorinated compounds and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected from Apulia Region coasts. *Marine pollution bulletin*, 73(1):243-51.
- [33]. Walkley, A. et Black, C. (2003). Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec et Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec. Détermination de la matière organique par dosage du carbone organique dans les sols agricoles: méthode Walkley-Black modifiée, MA.
- [34]. du Québec G. (2008). Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec. Sampling Guide for Environmental Analysis: Booklet.
- [35]. Atli, G., Alptekin, Ö., Tükel, S. and Canli, M. (2006). Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(2):218-24.
- [36]. Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL. and Randall, RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193:265-75.
- [37]. Yadav, A., Gopesh, A., Pandey, RS., Rai, DK. and Sharma, B. (2007). Fertilizer industry effluent induced biochemical changes in fresh water teleost, *Channa striatus* (Bloch). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 79(6):588-95.
- [38]. Coppola, F., Almeida, Â., Henriques, B., Soares, AM., Figueira, E. and Pereira, E. (2017). Biochemical impacts of Hg in *Mytilus galloprovincialis* under present and predicted warming scenarios. *Science of the total environment*, 601:1129-38.
- [39]. Oliveira, P., Barboza, LGA., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, C. and Guilhermino, L. (2018). Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Muller, 1774): Filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration. *Ecotoxicology and environmental safety*, 164:155-63.
- [40]. Rodier, J. et Legube, B. (2009). L'analyse de l'eau: Dunod.
- [41]. Dongo, KR., Niamke, BF., Adje, AF., Britton, BGH., Nama, LA. et Anoh, KP. (2013). Impacts des effluents liquides industriels sur l'environnement urbain d'Abidjan-Côte D'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7(1):404-20.
- [42]. Hazourli, S., Boudiba, L. et Ziat, M. (2007). Caractérisation de la pollution des eaux résiduaires de la zone industrielle d'El-Hadjar, Annaba. *LARHYSS Journal* P-ISSN 1112-3680/E-ISSN 2602-7828. (6).
- [43]. Bawa, ML., Djaneye-Boundjou, G. et Boukari, Y. (2006). Caractérisation de deux effluents industriels au Togo: étude d'impact sur l'environnement. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 2(1).
- [44]. Chalghmi, H. (2015). Etude de la pollution marine par les hydrocarbures et caractérisation de leurs effets biochimiques et moléculaires sur la palourde de Ruditapes sp.

- [45]. Salim, B. and Driss, AT. (2014). Bio-monitoring of Trace Mercury Using Seabirds' Dejections from Arzew Gulf: A Potential Risk for Human Health. *Journal of Environment Pollution and Human Health*, 2(1):7-11.
- [46]. Ayah, M., Grybos, M., Tampo, L., Bawa, LM., Bril, H. et Djaneye-Boundjou, G. (2015). Qualité et pollution des eaux d'un hydrosystème littoral tropical: cas du système lagunaire de Lomé, Togo. *European Scientific Journal*, 11(15).
- [47]. Boucheseiche, C., Cremille, E., Pelte, T. et Pojer, K. (2002). Bassin Rhône-Méditerranée-Corse. Guide technique (7).
- [48]. Nadella, SR., Fitzpatrick, JL., Franklin, N., Bucking, C., Smith, S. and Wood, CM. (2009). Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(3):340-8.
- [49]. Martin, M., Osborn, KE., Billig, P. and Glickstein, N. (1981). Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and Cancer magister larvae. *Marine pollution bulletin*, 12(9):305-8.
- [50]. Roccheri, MC., Agnello, M., Bonaventura, R. and Matranga, V. (2004). Cadmium induces the expression of specific stress proteins in sea urchin embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321(1):80-7.
- [51]. Boukadida, K., Banni, M., Gourves, PY. and Cachot, J. (2016). High sensitivity of embryolarval stage of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* to metal pollution in combination with temperature increase. *Marine environmental research*, 122:59-66.
- [52]. Coppola, F., Almeida, Â., Henriques, B., Soares, AM., Figueira, E. and Pereira, E. (2018). Biochemical responses and accumulation patterns of *Mytilus galloprovincialis* exposed to thermal stress and Arsenic contamination. *Ecotoxicology and environmental safety*, 147:954-62.
- [53]. Arienzo, M., Toscanesi, M., Trifuoggi, M., Ferrara, L., Stanislao, C. and Donadio, C. (2019). Contaminants bioaccumulation and pathological assessment in *Mytilus galloprovincialis* in coastal waters facing the brownfield site of Bagnoli, Italy. *Marine pollution bulletin*, 140:341-52.
- [54]. Boukadida, K., Cachot, J., Morin, B., Clerandeanu, C. and Banni, M. (2019). Moderate temperature elevation increase susceptibility of early-life stage of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* to metal-induced genotoxicity. *The Science of the total environment*, 663:351-60.
- [55]. Yavasoglu, A., Ozkan, D., Guner, A., Katalay, S., Oltulu, F. and Yavasoglu, NUK. (2016). Histopathological and apoptotic changes on marine mussels *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) following exposure to environmental pollutants. *Marine pollution bulletin*, 109(1):184-91.
- [56]. Annamaria, VG., Chiara, L., Alessandra, AN., Alvise, B., His, E. and Francesco, GP. (2005). *Mytilus galloprovincialis* as bioindicator in embryotoxicity testing to evaluate sediment quality in the lagoon of Venice (Italy). *Chemistry and Ecology*, 21(6):455-63.
- [57]. Radenac, G., Fichet, D. and Miramand, P. (2001). Bioaccumulation and toxicity of four dissolved metals in *Paracentrotus lividus* sea-urchin embryo. *Marine environmental research*, 51(2):151-66.
- [58]. Wepener, V., van Vuren, JHJ., Chatiza, FP., Mbizi, Z., Slabbert, L. and Masola, B. (2005). Active biomonitoring in freshwater environments: early warning signals from biomarkers in assessing biological effects of diffuse sources of pollutants. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 30(11-16):751-61.
- [59]. Dong, S., Yang, Y., Cheng, B., Ren, C., Zhang, H. and Xu, H. (2019). Responses of antioxidant defenses in the clam *Macrta veneriformis* to 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 217:98-105.
- [60]. Bao, M., Huo, L., Wu, J., Ge, D., Lv, Z. and Chi, C. (2018). A novel biomarker for marine environmental pollution of CAT from *Mytilus coruscus*. *Marine pollution bulletin*, 127:717-25.
- [61]. Verlecar, X., Jena, K. and Chainy, G. (2008). Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76(4):745-52.
- [62]. Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A. and Deudero, S. (2007). Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(4):531-9.
- [63]. Damiens, G., His, E., Gnassia-Barelli, M., Quiniou, F. and Roméo, M. (2004). Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 138(2):121-8.

- [64]. Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.J. and Valavanidis, A. (2007). Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine pollution bulletin*, 54(9):1361-71.
- [65]. Sureda, A., Box, A., Tejada, S., Blanco, A., Caixach, J. and Deudero, S. (2011). Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain). *Aquat Toxicol*, 101(3-4):540-9.
- [66]. Perošević, A., Joksimović, D., Đurović, D., Milašević, I., Radomirović, M. and Stanković, S. (2018). Human exposure to trace elements via consumption of mussels *Mytilus galloprovincialis* from Boka Kotorska Bay, Montenegro. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50:554-9.
- [67]. Maanan, M. (2008). Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region. *Environmental Pollution*, 153(1):176-83.
- [68]. Schintu, M., Durante, L., Maccioni, A., Meloni, P., Degetto, S. and Contu, A. (2008). Measurement of environmental trace-metal levels in Mediterranean coastal areas with transplanted mussels and DGT techniques. *Marine pollution bulletin*, 57(6-12):832-7.
- [69]. Jean-Claude, A. et Claude, A-T. (2008). Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques: Lavoisier.
- [70]. Jing, G., Li, Y., Xie, L. and Zhang, R. (2006). Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144(2):184-90.
- [71]. Kraak, M.H., Wink, Y.A., Stuijzand, S.C., Buckert-de Jong M.C., de Groot, C.J. and Admiraal, W. (1994). Chronic ecotoxicity of Zn and Pb to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic toxicology*, 30(1):77-89.
- [72]. Borković, S.S., Šaponjić, J.S., Pavlović, S.Z., Blagojević, D.P., Milošević, S.M. and Kovačević, T.B. (2005). The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141(4):366-74.
- [73]. Dellali, M., Romeo, M. et Aissa, P. (2001). Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. *Oceanologica acta*, 24(3):263-71.
- [74]. Fournier, E. (2005). Bioaccumulation du sélénium et effets biologiques induits chez le bivalve filtreur *Corbicula fluminea*: prise en compte de l'activité ventilatoire, de la spéciation du sélénium et de la voie de contamination: Bordeaux 1.
- [75]. Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Rocha, E. and Reis-Henriques, M. (2006). Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. *Pesticide biochemistry and physiology*, 85(2):97-103.
- [76]. Atli, G. and Canli, M. (2007). Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(2):282-7.
- [77]. Vlahogiannis, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.J. and Valavanidis, A. (2007). Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine pollution bulletin*, 54(9):1361-71.
- [78]. Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T. and Narbonne, J. (2000). Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo [a] pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic toxicology*, 49(4):269-87.
- [79]. Barillet, S., Adam-Guillermin, C., Palluel, O., Porcher, J.M. and Devaux, A. (2011). Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environ Pollut*, 159(2):495-502.
- [80]. Lagadic, L. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie.
- [81]. Amiard, J-C., Caquet, T. and Lagadic, L. (2000). Use of biomarkers for environmental quality assessment: CRC Press.
- [82]. Ducrot, V. (2005). Compréhension et modélisation des relations entre les caractéristiques biologiques et écologiques et la sensibilité aux contaminants des communautés d'invertébrés benthiques: perspectives pour l'évaluation des effets des substances chimiques: Université Paul Verlaine-Metz.
- [83]. Almeida, J., Diniz, Y., Marques, S., Faine, L., Ribas, B. and Burneiko, R. (2002). The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International*, 27(8):673-9.
- [84]. Linde-Arias, A.R., Inácio, A.F., de Alburquerque, C., Freire, M.M. and Moreira, J.C. (2008). Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly

- degraded Brazilian River. *Science of the total environment*, 399(1-3):186-92.
- [85]. **ROCHE, H., BUET, A. et RAMADE, F. (2003)**. Caractéristiques écophysiológicas d'une population d'anguilles de Camargue exposée à une pollution clandestine par des polluants organiques persistants. *Revue d'écologie*.
- [86]. **Almeida, J., Novelli, E., Silva, MDP. and Júnior, RA. (2001)**. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environmental Pollution*, 114(2):169-75.
- [87]. **Xu, K., Tang, Z., Liu, S., Xia, H., Liu, L. and Wang, Z. (2018)**. Effects of low concentrations copper on antioxidant responses, DNA damage and genotoxicity in thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Fish & shellfish immunology*, 82:77-83.
- [88]. **Gomes, T., Pereira, CG., Cardoso, C., Pinheiro, JP., Cancio, I. and Bebianno, MJ. (2012)**. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic toxicology*, 118:72-9.
- [89]. **Almeida, A., Freitas, R., Calisto, V., Esteves, VI., Schneider, RJ. and Soares, AM. (2015)**. Chronic toxicity of the antiepileptic carbamazepine on the clam *Ruditapes philippinarum*. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology* : CBP.;172-173:26-35.
- [90]. **Lima, I., Moreira, SM., Osten, JR., Soares, AM. and Guilhermino, L. (2007)**. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. *Chemosphere*, 66(7):1230-42.
- [91]. **Livingstone, D. (2001)**. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine pollution bulletin*, 42(8):656-66.
- [92]. **Gravato, C., Oliveira, M. and Santos, M. (2005)**. Oxidative stress and genotoxic responses to resin acids in Mediterranean mussels. *Ecotoxicology and environmental safety*, 61(2):221-9.
- [93]. **Boukadida, K., Cachot, J., Clerandeaux, C., Gourves, PY. and Banni, M. (2017)**. Early and efficient induction of antioxidant defense system in *Mytilus galloprovincialis* embryos exposed to metals and heat stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 138:105-12.
- [94]. **Prego-Faraldo, M., Vieira, L., Eirin-Lopez, J., Méndez, J. and Guilhermino, L. (2017)**. Transcriptional and biochemical analysis of antioxidant enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* during experimental exposures to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Marine environmental research*, 129:304-15.
- [95]. **Gorbi, S., Avio, GC., Benedetti, M., Totti, C., Accoroni, S. and Pichierri, S. (2013)**. Effects of harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* exposure on immunological, histological and oxidative responses of mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & shellfish immunology*, 35(3):941-50.
- [96]. **Richir, J. and Gobert, S. (2014)**. The effect of size, weight, body compartment, sex and reproductive status on the bioaccumulation of 19 trace elements in rope-grown *Mytilus galloprovincialis*. *Ecological Indicators*, 36:33-47.
- [97]. **Dauvin, J-C., Grimes, S. and Bakalem, A. (2013)**. Marine biodiversity on the Algerian continental shelf (Mediterranean Sea). *Journal of natural history*, 47(25-28):1745-65.
- [98]. **Peixoto, F., Alves-Fernandes, D., Santos, D. and Fontainhas-Fernandes, A. (2006)**. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 85(2):91-6.
- [99]. **Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J-M., and Ait-Aissa, S. (2005)**. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(1):177-83.
- [100]. **Sun, Y., Yu, H., Zhang, J., Yin, Y., Shi, H. and Wang, X. (2006)**. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. *Chemosphere*, 63(8):1319-27.
- [101]. **Koutsogiannaki, S., Franzellitti, S., Fabbri, E. and Kaloyianni, M. (2014)**. Oxidative stress parameters induced by exposure to either cadmium or 17beta-estradiol on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. The role of signaling molecules. *Aquat Toxicol*, 146:186-95.



Ecotoxicological Assessment of Three Types of Wastewater Effluents: Catalase as a Biomarker of Oxidative Stress in Marine Bivalves

Abdellah Meknachi, Mustapha Djellali, and Abdelmalek Badis

Abstract

Catalase (CAT) is an important enzyme in the antioxidant defense system in marine bivalves. This present work consists first of all in studying the effect, of an acute exposure (bioassays) of the mussels *Mytilus galloprovincialis* to three types of real effluents [industrial wastewater (IW), desalination station effluent (DSE) and harbor effluents (HE)], on the enzymatic activities CAT. In situ, the transplantation of mussels into natural environments was carried out in the same context. The medium size class of the *Mytilus* mussel has proven to be the most resistant to contamination by the IW. Notwithstanding, this same size class showed hypersensitivity to contamination by the SDE, thus translating the high toxicity of the latter which led to very high CAT inductions whatever the concentration tested. Furthermore, under controlled laboratory conditions, the HE demonstrated a certain toxicity by inducing the CAT enzyme. On the other hand, the *Mytilus* mussels transplanted to the khemesti port site are found all dead after ten days of immersion. The deoxygenation of the medium probably had an additional and aggressive effect on our specimens of mussels. This study makes it possible to qualify catalase as a relevant, sensitive, rapid and effective defense biomarker in the evaluation of the health state of the surrounding environment. However, more studies must be made on metabolic activities and energy reserves while adopting the multi-biomarker approach.

Keywords

Catalase • Oxidative stress • Effluents • *Mytilus galloprovincialis* • Transplantation

1 Introduction

Surface and coastal waters are often contaminated by many chemicals released by industry, agriculture and urban communities. The estuarine and coastal zones, under strong continental influence, are the most affected by this type of contamination. The problems posed by the dispersion of pollutants into the environment have attracted the interest of the scientific community for many decades now. Awareness of the need to preserve aquatic ecosystems has led to the emergence of certain issues, including the fate of these pollutants in the environment and their effects on animal and plant communities (Bouzahouane et al., 2018; Cappello et al., 2013; Flammarion et al., 2001; Jing et al., 2019; Sillero-Rios et al., 2018; Vlahogianni et al., 2007).

In order to know and monitor the evolution of chemical contamination of aquatic ecosystems, research and monitoring programs based on the measurement of contaminants concentration in water and sediments have been implemented. However, the chemical analysis of the pollutants present in the various compartments of the aquatic ecosystems is not always possible because of the multiplicity of the molecules present, and this often at concentrations lower than the limits of analytical detection, which makes sampling and measurement techniques quite complex. The risks of contamination at the time of sampling and analysis are numerous, making measurements difficult. These problems have been overcome by the use of “ultra-clean” techniques in sampling. However, the direct measurement of contaminants in water uses sophisticated analytical techniques that are difficult to apply in a perennial network for the routine measurement of the quality and health of aquatic

A. Meknachi (✉) · M. Djellali · A. Badis
National Center for Research and Development of Fisheries and Aquaculture, CNRDPA-BouIsmaïl, 11 Bd Colonel Amirouche BouIsmaïl, Tipasa, Algeria
e-mail: meknachi@gmail.com

A. Meknachi · A. Badis
Laboratory of Chemistry of Natural Substances and Biomolecules LCSN-BioM, USDB1 University of Blida-1, B.P. 270, Route de Soumaa, Blida, Algeria

ecosystems. Moreover, the temporal variability of the littoral and limnic environment confers little representativity to a point measurement in the water column. Finally, such an approach does not provide information on the risks faced by animal or plant populations exposed to pollutants, and cannot, on its own, predict the biological effects of contaminant mixtures (synergies, etc.) or simply quantify the bioavailability of contaminants for living organisms. As a result, the manager lacks information on the urgency of taking action to improve the health status of these ecosystems, or to protect biodiversity and the integrity of these ecosystems (Aouini et al., 2018; Barillet et al., 2011; Boukadida et al., 2017; Brooks et al., 2015; Casas and Bacher, 2006; Mejdoub et al., 2017).

With this in mind, Goldberg (1975) proposed monitoring the concentrations of contaminants in living organisms to monitor the surrounding environment. This is the principle of “quantitative bioindicators” based on the fact that aquatic organisms concentrate contaminants at concentrations higher than those present in the environment (Aouini et al., 2018; Arienzo et al., 2019; Benali et al., 2017; Casas and Bacher, 2006).

Current surveillance strategies are diverse, and the use of fixed molluscs and relatively sedentary fish are most commonly developed in environmental monitoring programs. *Mytilus galloprovincialis* mussels and other marine bivalves have characteristics that make them good bioindicators of coastal water contamination (Akaishi et al., 2007; Arienzo et al., 2019; Aslan et al., 2018; Cappello et al., 2013; Casas and Bacher, 2006; Forbes et al., 2006; Sparks et al., 2019).

Other tools, the biomarkers (reflecting an interaction between a biological system and a potential hazard) can be used to study the bioavailability of contaminants. They are then studied more for their contribution to the mechanistic understanding of the action of pollutants (Al-Fanharawi et al., 2018; Aslan et al., 2018; Beiras, 2018; Peric et al., 2017; Sparks et al., 2019).

In this context, the National Center for Research and Development of Fisheries and Aquaculture CNRDPA-BouIsmaïl is currently developing a program of management of aquatic ecosystems and environmental monitoring contributing to the research of pollution indicators. Within this framework, we carried out our research on the Mediterranean mussel “*Mytilus galloprovincialis*” as a biological model in order to better define the ecotoxicology research topics of real effluents, in laboratory and in situ, whose main objective is the contribution looking for biomarkers like an early response that can provide integrated information on the state of the aquatic ecosystem as well as on bioaccumulation phenomena.

2 Materials and Methods

2.1 Experimental Procedure

The different experiments were conducted and carried out at the CNRDPA-BouIsmaïl pilot shellfish breeding center (Fig. 1).

On the map below are indicated the sampling points of the different liquid discharges used in this study, as well as the collection points of the *Mytilus* mussels and the transplant sites of artificial cages (mussels caging).

2.1.1 First Series of Ecotoxicity Tests

Mytilus galloprovincialis mussels, which are used as a biological model, are collected from the sea buoyage signals of the Fouka marine seawater desalination plant (Fig. 1). Sampling targeted the three size classes (22 mm; 28 mm), (43 mm; 52 mm) and (71 mm; 86 mm). After the collection of the mussels, the latter are sorted, cleaned, cleared of their epibionts and measured using a Vernier caliper before their adaptation. The set of mussels is maintained under identical environmental conditions, and the use of air pumps ensures the aeration of the water tanks. A daily renewal of the rearing water is carried out during the adaptation period and throughout the entire experimental cycle.

In order to minimize other factors that may constitute a source of disturbance or interference of ours results, a measurement of the physicochemical parameters (temperature, salinity, pH and dissolved oxygen) is carried out each day during the whole experimental cycle before and after the change of water using a YSI 556 multiparameter.

The strategy of the ecotoxicity tests is to contaminate the *Mytilus* mussels, of different size classes (large, medium and small), by the waters of an industrial wastewater (IW), discharging directly at sea in BouIsmaïl Bay (Fig. 1), and this at different concentrations by dilution in tanks of 70 L.

Thus, the mussels are exposed for four days at four increasing concentrations ($C1 = 0.01\%$; $C2 = 0.15\%$; $C3 = 0.3\%$ and $C4 = 0.5\%$ (v/v)) of the IW. The manipulation is automatically compared to a control aquarium (0 mg/L pollutant).

The four selected concentrations were tested to establish dose–response relationships between the chemical pressure represented by the pollutants of the release and the biological responses observed in the mussels.

2.1.2 Second Series of Experience

In the second series of experiments, we chose to work on the medium-sized class (juvenile mussels) judged to be the most resistant. The experimental conditions are the same as the

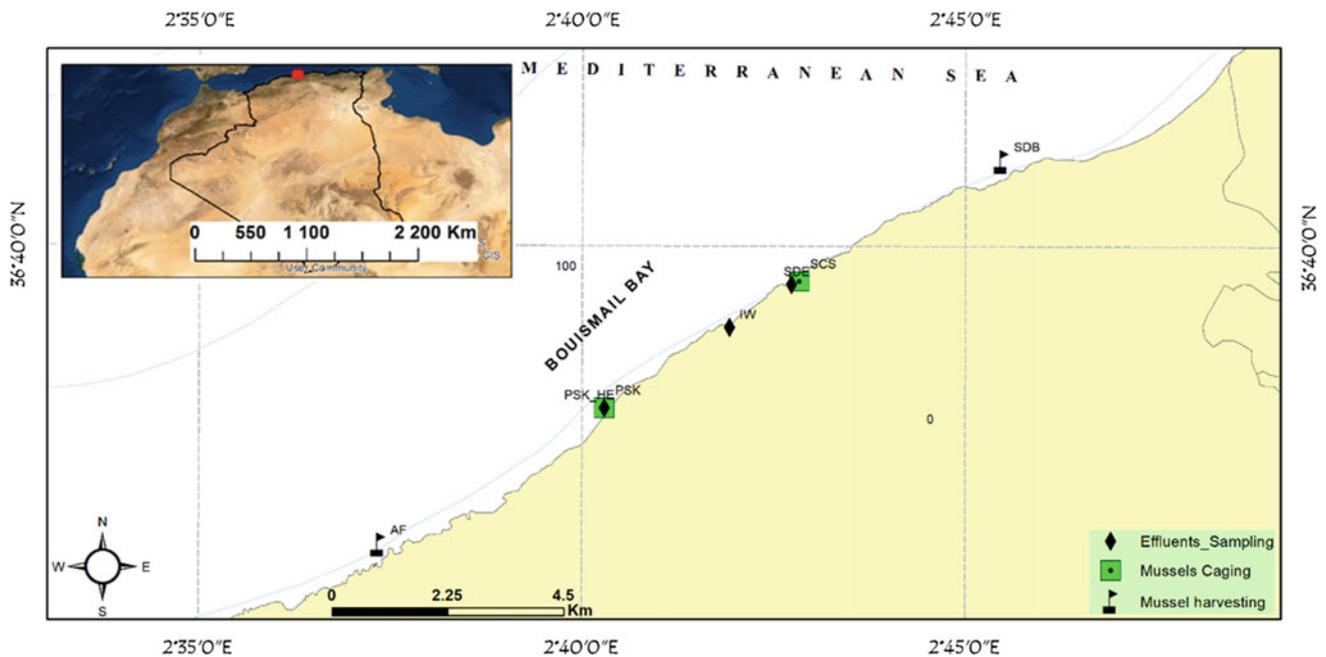


Fig. 1 Map of BouIsmaïl Bay with points of discharge locations, mussels harvesting and mussels caging

first series of tests. But this time, the mussel specimens are exposed to two types of effluents, namely the water discharge from the BouIsmaïl seawater desalination plant (DSE) and the water from the site port of Khemisti (HE) (Fig. 1). The concentrations chosen are the following: C2 = 0.15%; C3 = 0.3% and C4 = 0.5% (v/v), and the exposure time is always 96 h.

2.1.3 In Situ Study: Artificial Cage Transplantation Technique

The mussels this time from an aquaculture farm (AF) located at Ain-Tagourait (Fig. 1) (Tipasa, Algeria) are put in plastic nets (40 cm × 30 cm and mesh 20 mm) and divided into four lots of 15 individuals in wool pockets. The nets are stiffened by a 30 mm diameter PVC tube split in their width and threaded on the upper part.

The artificial stations (mussels caging) were transplanted at two sites: Khemisti port site (PSK Fig. 1) (contaminated environment) and in an open environment (low contamination site) near the shellfish center (SCS) (see map). The immersion time of the stations was planned for one month with a periodic sampling of mussels every ten days. However, we were limited to ten days following the total mortality of transplanted individuals in the port site.

2.2 Analytical Methods and Biochemical Assays

Total proteins are assayed by Lowry method using bovine serum albumin (BSA) as standard. Catalase activity is determined according to the method of Lartillot et al. 1988 described by Atli et al. (2006).

In ice-cold, tissues are homogenized (1/10 w/v) in Tris (tris (hydroxymethyl) aminomethane) buffer (20 mM, pH 7.8) for three minutes using a mixer. Centrifugation of the homogenate is done at 10,000 g for 30 min at 4 °C. The supernatant thus obtained (Fraction S9) is used to assay the proteins and catalase.

In our practice, 2.5 ml of substrate solution (25 mM H₂O₂ in 75 mM phosphate buffer at pH7) are placed in a cuvette of the spectrophotometer already set in the kinetic mode. 50 µl of the S9 fraction (enzyme source) are added to the mixture; thus, the kinetic mode of the spectrophotometer is triggered and the decomposition of hydrogen peroxide is monitored in a time interval of 60 s.

2.3 Statistical Analyzes

Data are tested for normality and homoscedasticity using Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively. A statistical

analysis is then performed using a bilateral analysis of variance (ANOVA 2), followed by a post hoc analysis of Tukey. The significance was set at $p < 0.05$. The results of the in situ study are tested using ANOVA one way (STATISTICA 6.0).

3 Results

3.1 First Series of Experiments

The results relating to the determination of catalase (CAT) in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) contaminated by industrial rejection are shown in Fig. 2.

Concerning the medium-sized *Mytilus* mussel, the statistical analyzes did not show any significant effect of the contamination, by industrial effluent, on the responses of the defense enzyme catalase, and this compared to the controls and to the gradient concentration examined. The four concentrations of pollutants tested did not seem to have a remarkable effect on the induction of the antioxidant defense mechanism where no significant effect was measured between concentrations.

A significant effect of contamination by industrial discharge is noted in *Mytilus* mussels of the large size class exposed to concentrations C2 and C3. Also, compared to the control individuals (CAT: 307.89 ± 23.86 U/mg Proteins/min), a proportional increase in catalase activity is measured in mussels exposed to the effluent xenobiotics for concentrations C1, C2 and C3. The activities achieved, respectively, are 545.89 ± 106.65 , 623.71 ± 81.48 and 688.09 ± 35.33 U/mg proteins/min. The C4 concentration (CAT: 551.08 ± 90.46 U/mg Proteins/min) had an insignificant and identical effect as that of the C1 concentration on the induction of the antioxidant enzyme CAT.

In mussels of the small size class, individuals of the latter have shown a hyperactivity in the induction of the antioxidant

mechanism translated by the CAT. Thus, compared to the controls, the highest induction of catalase (253.25%) is measured under the effect of the C4 concentration. Also, the trend was almost proportional with the four concentrations tested. This time, no significant effect was noted between the concentration C1 (CAT: 737.59 ± 4.33 U/mg Protein/min) and C3 (CAT: 760.33 ± 64.27 U/mg Proteins/min), while a very significant effect of the concentration is marked compared to controls (416.13 ± 65.25 U/mg Protein/min).

The study of the independent effect of each concentration on the CAT response in the three size classes reveals significant and non-significant effects depending on the case considered. Thus, the measured values of the catalase activity in the control individuals (no contaminant) did not show any significant difference between the three classes studied. Under the effect of the C2 concentration, the statistical difference is significant whatever the size class studied. Also, compared to the small size class, the difference is always significant between the compared size classes. However, the statistical analysis reveals an insignificant effect between the medium and large size class and this under the effect of concentrations C1, C3 and C4.

In light of the results obtained, the statistical analysis of the effects of the contaminant concentration and the interaction with the size class revealed that the *Mytilus* mussels of the medium size class (juveniles) are the most resistant to contamination. *Mytilus* individuals of the large size class showed medium sensitivity, while small *Mytilus* appeared the most sensitive to concentration.

3.2 Second Series of Experiments

• Comparative study between the different types of effluents (*Mytilus* mussel, medium size)

The results relating to the determination of catalase (CAT) in the mussel (*Mytilus galloprovincialis* of medium size) contaminated by the different types of liquid discharges are represented by Fig. 3.

Whatever the concentration tested for industrial liquid discharge (IW), ANOVA-2 ($P < 0.05$) did not highlight any significant difference between the CAT activities measured (Fig. 3). Also, for the harbor effluent (HE), compared to the effect of the concentration C2, the statistical analysis did not show any significant difference in the CAT activities. However, the difference in the activity of the antioxidant enzyme being significant ($P < 0.01$) between the effect of concentration C3 and that of concentration C4.

In addition, the discharge from the seawater desalination station (DSE) led to very large CAT inductions proportional to the concentrations tested. The highest induction (573.22%) of the antioxidant enzyme is noted under the

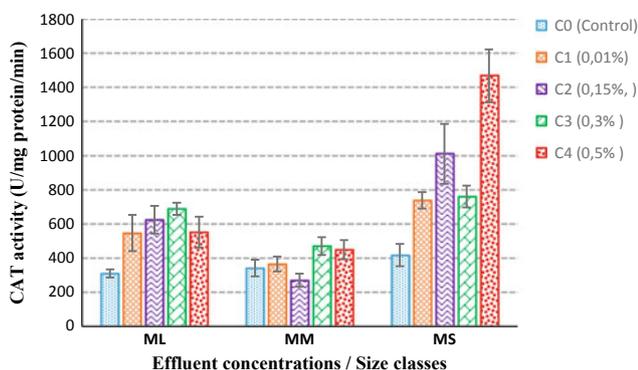


Fig. 2 Variation in catalase activity in *Mytilus galloprovincialis* contaminated by IW

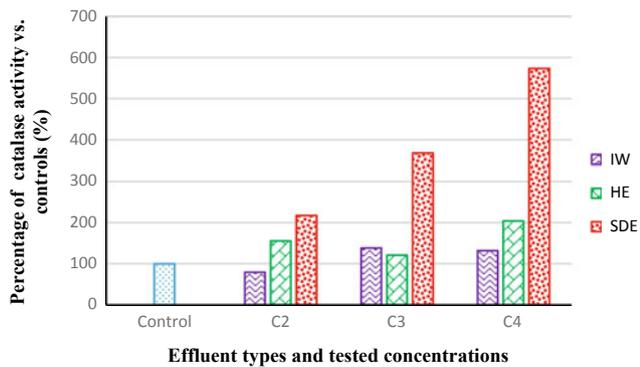


Fig. 3 Variation in catalase activity in young *Mytilus* mussels under the effect of different effluents

effect of the C4 concentration. The differences in CAT activities were very significant ($P < 0.0001$) regardless of the concentration used for the rejection (DSE).

The study of the independent effect of the concentration C2 (ANOVA-2; $P < 0.05$) on the CAT responses did not show any significant difference ($P < 0.05$) between the port discharge and that of the desalination plant. Notwithstanding, the difference being significant between IW and HE but still very significant between IW and DSE.

For the concentration C3, there was no significant difference of the effect of the nature of effluents between IW and HE. However, the differences are clearly significant between IW-DSE and HE-DSE.

Whatever the type of liquid effluent tested, the differences in CAT activity measured under the effect of the concentration C4 are significant ($P < 0.05$) between IW-HE and very significant ($P < 0.0001$) between IW-DSE and HE-DSE.

3.3 Mussels Caging

The results relating to the determination of catalase (CAT) activity in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) transplanted in the port of Khemisti (PSK) and in an open environment (SCS) near the shellfish farming center of CNRDPA-Boulsmail are represented in Fig. 4.

According to the graph in Fig. 4, it emerges that the catalase activity in mussels transplanted in an open medium (SCS) like that of origin of provenance (AF) is identical examining ANOVA one way ($P < 0.05$).

The conditions of the open transplant medium (for ten days) were within the tolerance range for *Mytilus* individuals, which did not lead to a variation in the activity of the antioxidant enzyme CAT. It is also likely that the two media are not really affected by a source of contamination by the different types of xenobiotic.

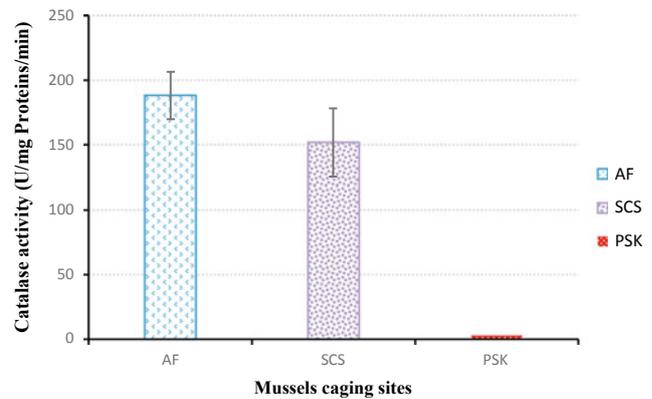


Fig. 4 Variation in catalase activity in transplanted mussels. *Note* The mussels transplanted into the port of khemisti (PSK) were found all dead on the tenth day of exposure

Furthermore, the mussels transplanted to the Khmesti port site (PSK) were unable to survive, when they showed a total mortality on the tenth day. It is likely that the environmental conditions were not favorable for the mussel specimens to be able to exercise their physiological activity of basic metabolism (respiration, nutrition, etc.) in an optimal manner without any external aggression due to environmental conditions.

4 Discussion

4.1 First and Second Series of Experiment

Since the development of the “Mussel Watch” program by Goldberg in 1975, the use of bivalve molluscs has been widespread in order to monitor the improvement or degradation of the environment and to study its biological and physiological impacts (Arienzo et al., 2019; Benali et al., 2017; Dong et al., 2019; Pellerin and Amiard, 2009; Zorita et al., 2008). By their filtration capacity of sea water, in order to feed on suspended matter, bivalves can ingest a large quantity of contaminants and therefore concentrate the trace elements (chemical or biological) at concentrations higher than those encountered in its environment (Aouini et al., 2018; Arienzo et al., 2019; Box et al., 2007; Gorbi et al., 2013; Maanan, 2008; Pellerin and Amiard, 2009; Perosevic et al., 2018; Silva Dos Santos et al., 2018). In bivalves, the accumulation of contaminants is mainly by passive diffusion via gill respiration and by active transport resulting from the filtration of water and the ingestion of the particles present (Aasen et al., 2006; Casas and Bacher, 2006). Tissues directly exposed to xenobiotics accumulate these according to their bioavailability (e Silva et al., 2006). The accumulation of chemicals in organisms is the cause of oxidative stress (Aouini et al., 2018; Vlahogianni et al., 2007).

Indeed, by their redox properties, many xenobiotics such as hydrocarbons, metals, quinones or even certain pesticides are known to exert their deleterious effects through the formation of reactivated oxygen species (ROS) (Akcha et al., 2000; Boukadida et al., 2017; Mejdoub et al., 2017; Peric et al., 2017; Verlecar et al., 2008; Vlahogianni et al., 2007). The reactivity of ROS can be the cause of harmful biological effects (oxidation of components such as DNA, proteins, lipids and general disturbance of the redox state) in invertebrates (Barillet et al., 2011; Bouzahouane et al., 2018; Sparks et al., 2019; Vernon and Jha, 2019; Yavasoglu et al., 2016).

In fact, to cope with the production of ROS, aquatic organisms have developed antioxidant defense systems made up of enzymes (superoxide dismutase, **catalase CAT**, glutathione peroxidase) and molecules which trap radical species at the level of membranes (vitamin E, β -carotene) or the aqueous phase (ascorbic acid, uric acid and glutathione). The antioxidant defense enzyme CAT is known to be induced to deal with oxidative stress (Al-Fanharawi et al., 2018; Bao et al., 2018; Barillet et al., 2011; Boukadida et al., 2017; Cappello et al., 2013; Damiens et al., 2004). Measured in the *Mytilus galloprovincialis* mussel, the catalase activity can tell us about the levels of pollution (Box et al., 2007; Vlahogianni et al., 2007) and the degree of cell damage (Akcha et al., 2000; da Silva Barreto et al., 2018; Di Giulio et al., 1993; Teixeira et al., 2017).

In fact, the CAT activities noted in this study, under the effect of the various liquid discharges, can clearly tell us about the degree of toxicity of each effluent. Effluent from the desalination plant is the most toxic regardless of the concentration tested.

In situations of severe stress, defense enzymes are induced very quickly and amply to cope with the endured effects. Sometimes, the end result of such a situation is the inhibition of the activity of the various defense mechanisms (Aouini et al., 2018; Benali et al., 2017). In our study, we noted remarkable mortalities at the end of the exposure of the mussels to the different concentrations of rejection from the desalination station, thus reflecting the total impairment of the different physiological mechanisms of the *Mytilus* mussels as a bioindicator of the level of contamination. Under the effect of industrial discharge and that of port effluent, no mortality was noted. Thus, it is easy to conclude on the high toxicity of the discharge from the desalination plant.

The bioaccumulation of xenobiotics varies according to their chemical properties giving a good indication of their bioavailability in the environment. Acquiring knowledge on the type and rate of contamination will make it possible to analyze the risks they represent at different physiological levels (e Silva et al., 2006; Lemaire et al., 2006; Pellerin and Amiard, 2009).

The introduction of different concentrations of industrial (IW) and port effluents (HE) did not lead to any variation in the physicochemical parameters of the water in aquariums compared to the control groups. So, the deleterious effect on our specimens can be attributed to the xenobiotics present in the two effluents. On the other hand, the liquid discharge of the desalination station (SDE) led to an increase in the salinity and the conductivity of the water in the aquariums. The effect of the xenobiotics present in the effluent therefore combines and probably increases with the increase in salinity leading to a multiplication of the stress signal (CAT).

As was the case in our study, industrial effluents are generally discharged directly into receiving environments (in our case coastal waters) without any pretreatment and are often very loaded with suspended matter, dissolved salts, trace chemical elements organic and/or inorganic. Reaching the receiving environment, liquid effluents can have very harmful effects on the biological component of the environment as they can modify the physicochemical properties of the water column and even sedimentary funds following the accumulation and precipitation of xenobiotics transported by the continuous flow of liquid discharges.

Certain contaminants have the particularity of not being eliminated by living organisms, thus generating a bioaccumulation throughout the food chain with remarkable harmful effects in particular: neurotoxicity, immunotoxicity, stress and oxidative damage, behavior modification, growth inhibition and impaired reproduction (Coppola et al., 2017; Oliveira et al., 2018). The effects are very worrying if we consider the direct short and long-term impact on the receiving environment.

Also, the continuous flow rates of industrial liquid discharges will certainly bring a significant load in xenobiotics on the one hand, but also on the other hand, it can lead to a slight reduction in the salinity of the coastal waters which receive them. The sensitivity of aquatic organisms to the decrease in salinity has been reported by several scientists.

(Hamer et al., 2008) showed an increased mortality of mussels *Mytilus galloprovincialis* under lowest salinities during two acclimation experiments at high/low seawater temperature (27/13 °C), especially during the summer period. Their results revealed that the oxygen consumption rate of mussels increase inversely with the salinity. Furthermore, the DNA integrity from mussels sampled in the winter period showed a significantly lower DNA integrity status than those sampled during the summer season.

Under stressful environmental conditions, homeostasis of organisms is compromised. The hypothesis is that this will in turn increase the susceptibility of mussels to other stresses. The hypothesis is that this will in turn increase the susceptibility of mussels to other stresses.

According to Bussell et al. (2008), the reducing seawater salinity to half that of normal caused a significant reduction

in several measures of immune function, including the concentration of hemocytes, percentage of eosinophilic hemocytes and phagocytosis. Wang et al (2011) found that clearance rate, absorption efficiency, respiration rate and scope for growth of the mussel *Perna viridis* decreased with decreasing salinity and dissolved oxygen concentration. (Bakhmet et al., 2005) report that, when exposed to moderate hyposalinity (15 g/L), the mussel *Mytilus edulis* showed a significant decrease in the heart rate with respect to the control salinity (25 g/L). The heart beat quickly accelerated in all organisms when they were returned to the control salinity medium. In the mussel *Mytilus galloprovincialis*, Freitas et al. (2017) notice that, at low salinity, despite an increase of antioxidant enzymes activity, lipids peroxidation (LPO) increased, probably as a result of ROS overproduction from higher electron transport system activity.

On the other hand, discharges from desalination plants can increase the salinity of the areas close to the outfalls. The dispersion of brine can vary considerably depending on site-specific characteristics, the volume of effluent, the method of discharge and the existing hydrographic conditions. However, salinity and temperature are higher than the reference standards for discharge sites (Fernández-Torquemada et al., 2009).

The southern shore of the Mediterranean is considered to be one of the world's poorest regions of water. As a result, desalination efforts around the Mediterranean are concentrated mainly on its southern and eastern shores, as well as in Spain. In 2013, more than 1532 seawater desalination plants were set up around the Mediterranean Sea with a total cumulative capacity of around 12 Mm³/day. Spain was the main producer (31% of total capacity), while in third place comes Algeria followed by Libya with 20 and 11%, respectively (POL, 2015). Given the desalination effort thus mentioned, the biodiversity of our coastal waters is therefore compromised.

Salinity and temperature have long been perceived as environmental factors that inhibit the survival and growth of marine biota (Murray and Wingard, 2006; Wiltshire et al., 2010).

Laboratory and mesocosm experiments have shown the sensitivity of certain seagrass beds to hypersalinity with tolerances which vary from one species to another. Generally, physiology, leaf growth and survival rate are affected (Fernández-Torquemada and Sánchez-Lizaso, 2011; Fernández-Torquemada et al., 2005; Koch et al., 2007; Marín-Guirao et al., 2013; Ruíz et al., 2009; Sandoval-Gil et al., 2012).

In the field, it has been shown that a shallow *Posidonia oceanica* meadow was affected after six years of exposure to brine (Sanchez-Lizaso et al., 2008), while the benthic community was changed (de-la-Ossa-Carretero et al., 2016;

Del-Pilar-Ruso et al., 2008; Ruso et al., 2007) with disappearance of certain echinoderm.

In the distant vicinity of the outlets of the liquid discharges of the present study, we observed a disappearance of the herbarium *Posidonia oceanica*, of the sea urchin *Paracentrotus lividus*, while the spat of *Mytilus* mussels installed on hard substrates did not find the opportunity to grow.

Several authors agree on the importance of salinity, and their results show its influence as much as an abiotic factor on metabolic activity and above all on enzyme responses (Hamer et al., 2008).

Results found by Carregosa et al. (2014) showed that clams under salinity associated stress can alter their biochemical mechanisms, such as increasing their antioxidant defenses, to cope with the higher oxidative stress resulting from hypo and hypersaline conditions. Among the physiological and biochemical parameters that they analyzed: glycogen and protein content, lipid peroxidation levels, antioxidant enzymes (Catalase and especially superoxide dismutase), the latter proved to be sensitive biomarkers to assess the impact of salinity in clams. Among the physiological and biochemical parameters that they analyzed: glycogen and protein content, lipid peroxidation levels, antioxidant enzymes (Catalase and especially superoxide dismutase), the latter proved to be sensitive biomarkers to assess the impact of salinity in clams.

4.2 Mussels Caging Discussion

Several authors describe the transplantation of mussels from a reference site that is not/or little polluted to more polluted sites, as a very promising and very relevant technique and strategy in order to assess the degree of contamination of marine ecosystems (Box et al., 2007; Cappello et al., 2017, 2013; Gherras Touahri et al., 2016; Risso-de Faverney et al., 2010; Schintu et al., 2008; Verlecar et al., 2008).

According to Box et al. (2007) and Sillero-Rios et al. (2018), measuring the same biomarker simultaneously in different localities provides information on the degree of pollution of the latter and provides a better understanding of the mechanisms of the mode of action of pollutants in the environment on transplanted organisms. In fact, Box et al. (2007) found that the degree of induction of CAT activity was greater in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) transplanted in estuaries most affected by urban discharges than in specimens transplanted in estuaries little affected by anthropogenic activity for which they measured a lesser induction of the antioxidant enzyme CAT.

In agreement with Cappello et al. (2013), significantly greater CAT activity was recorded in mussels caged at the site influenced by anthropogenic activities compared to the reference site. By applying passive biomonitoring of

pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece, Vlahogianni et al. (2007) found that CAT activity was increased 2–3 times at the polluted sites, with high activity in the winter and spring time, compared to the control site. Data for increases in CAT activity demonstrate a disturbance from pollutants in the Elefsis Bay with seasonal variations reflecting the intensity of pollution in the area.

In fact, it is easy to attribute the induction levels of the antioxidant enzyme CAT, from the present study, to the overall quality of the different mussels caging sites. In addition to chemical analyzes of bioaccumulation, the measurement of biomarkers provides information on the nature and level of chemical contamination but also on the health of living organisms and populations of aquatic ecosystems (Aouini et al., 2018; Benali et al., 2017; Gorbi et al., 2008; Kopecka et al., 2006; Verlecar et al., 2008; Vlahogianni et al., 2007).

It is recognized that the biological responses of organisms (growth, bioaccumulation and detoxification of chemical pollutants, enzymatic responses of biomarkers, etc.) can be affected not only by chemical pollutants but also by a certain number of natural stressors such as temperature, salinity, dissolved oxygen, food availability and the reproductive state (Balbi et al., 2017; Blanco-Rayon et al., 2019; Cappello et al., 2017; Chatel et al., 2010; Gonzalez-Fernandez et al., 2017; Nardi et al., 2018; Richir and Gobert, 2014). Thus, to exclude the effect of fluctuating temperatures and the reproductive cycle on the signals of the CAT biomarker, the immersion of artificial stations was carried out during the period of sexual rest in the months of June and July.

In terms of volume, the port of Khemisti is small. The discharges reaching the latter are of domestic, industrial origin (two activities are located nearby) and those linked to fishing activities, which leads to a significant concentration of pollution in situ.

The dissolved oxygen contents, which are the result of physical, chemical and biological factors (photosynthesis, respiration, redox reaction, etc.) and which govern the majority of chemical and biological processes, oscillate between a minimum of 3.93 mg/L and a maximum of 4.41 mg/L in the port of Khemisti (PSK), while in SCS and AF sites, the values often exceed 7 mg/L. In assessing the degree of a given pollution, direct measurement of the dissolved oxygen level can tell us about the eutrophication of aquatic ecosystems. Eutrophication can lead to water suffocation (Mucci, 1997). Dissolved oxygen is therefore a sensitive and practical indicator in a first assessment of an environmental diagnosis. In fact, the lower content of dissolved oxygen in the port of Khemisti is the likely result of the latter's eutrophication. Adding to this, the presence of xenobiotics of different forms, the defense system of mussels transplanted in the port site did not have the possibility of coping with the stresses endured, ultimately leading to total

mortality of the transplanted individuals. Dellali et al. (2001) reported that a decrease in the oxygen content is at the origin of an increase in the activity of catalase in the mussels of the lagoon of Bizerte (Tunisia).

Toxic molecules interact with biological molecules. Consequently, the exposed organisms develop various defense mechanisms: avoidance and/or isolation, active elimination, neutralization by complexation with proteins, etc. (Jean-Claude and Claude, 2008). Studies of metabolism and biomass production in organisms exposed to toxins (Ducrot, 2005) have shown that these defense mechanisms are costly for the organism in terms of energy. These defense costs are added to maintenance costs: there is therefore a quantitative correlation between the organism's defense capacity (survival) and its biomass production capacity (growth and reproduction). In addition, energy allocation for the defense, repair and regeneration of cells is favored over growth and reproduction. In extreme situations, the survival of the living is uncertain. According to Jean-Claude and Claude (2008), defense biomarkers allow organisms to fight and survive in the presence of pollutants at reasonable levels, but this has an energy cost for the individual.

In mussels, since the avoidance or isolation strategy is not possible, the use of antioxidant enzymes seems to be the best strategy for dealing with xenobiotics. The excretion and sequestration of xenobiotics in the tissues can also intervene. However, it has been shown that the first responses to the presence of contaminants are those linked to the antioxidant system (Aouini et al., 2018; Box et al., 2007; Damiens et al., 2004; Verlecar et al., 2008; Vlahogianni et al., 2007).

In addition, valve closure is a known behavior in bivalves in response to environmental stress (Freitas et al., 2017; Geffard et al., 2001). As a result, the decrease in the volume of water filtered by the mussels will lead to a decrease in food capture which will have a direct effect on energy intake. Consequence: bad physiological activities. On the other hand, damage to the digestive enzyme by port pollutants either by trophic route or via water will probably have an effect on the efficiency of food energy conversion. The digestive gland is the main organ involved in food processing, digestion and nutrient delivery, and these processes could interfere with the processes of accumulation, detoxification and elimination of pollutants (Arrighetti et al., 2019; Blanco-Rayon et al., 2019; Faggio et al., 2018).

The results obtained in this study have shown that the *Mytilus* mussel has a number of characteristics which make it an excellent bioindicator of the quality of the marine environment, the importance of which has already been emphasized in numerous research studies (Arienzo et al., 2019; Benali et al., 2017; Boukadida et al., 2017; Chatel et al., 2010). Also, the CAT as a stress biomarker demonstrates its sensitivity, its precocity and its effectiveness in predicting the deleterious effects of the real effluents of the

present study. Also, the major interest of catalase as a biomarker resides in the non-specific character of its response, which constitutes an advantage in the context of multiple contamination of aquatic ecosystems. According to several authors, the biomarkers of defense like CAT help maintain the organism's homeostasis. The latter depends on the dose, duration/effect relationship (Al-Fanharawi et al., 2018; Aouini et al., 2018; Bao et al., 2018; Benali et al., 2017).

Catalase can be influenced by intrinsic or extrinsic factors beyond the control of the researcher. Thus, to compensate for the variations in biomarker responses due to these factors, the multimarker approach seems to be a promising key for a better interpretation of the results and thus a more precise evaluation of the health state of the aquatic environment.

5 Conclusion

In conclusion, the practice of biomarkers, in our present study, has proven to be very interesting from the point of view of precocity of rest of the measured signals and their correlations with the levels of pollution. They can indeed constitute an obvious complement to chemical monitoring programs by translating a risk for organisms in aquatic ecosystems. As a result, biomarkers can be used and are still of great ecological relevance, particularly in the case of a long-term monitoring program for the coastal and estuarine environments.

Furthermore, the integration of these biological variables into a long-term monitoring and measurement network will provide managers of aquatic environments with better information on the evolutionary trend of the monitored environments (sign of good management or degradation) and will allow scientists to better understand the functioning of the systems studied.

Acknowledgements This work could not have happened without the support of some people. I particularly want to thank Mr Djamel Eddine ABASSI for his contribution to the English translation. Also, I am very grateful to Mr Amar DILMI who counted enormously in the outcome of this work. I am also very grateful to the intern Mr Nabil KRITLI.

References

- Aasen, J. A., Hardstaff, W., Aune, T., & Quilliam, M. A. (2006). Discovery of fatty acid ester metabolites of spirolide toxins in mussels from Norway using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-To-The-Minute Research in Mass Spectrometry*, 20, 1531–1537.
- Akaishi, F. M., St-Jean, S. D., Bishay, F., Clarke, J., da, S. R. I., & de Oliveira Ribeiro, C. A. (2007). Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquatic Toxicology*, 82, 1–14.
- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., & Narbonne, J. (2000). Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo [a] pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 49, 269–287.
- Al-Fanharawi, A. A., Rabee, A. M., & Al-Mamoori, A. M. J. (2018). Biochemical and molecular alterations in freshwater mollusks as biomarkers for petroleum product, domestic heating oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, 69–77.
- Aouini, F., Trombini, C., Volland, M., Elcafsi, M., & Blasco, J. (2018). Assessing lead toxicity in the clam *Ruditapes philippinarum*: Bioaccumulation and biochemical responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, 193–203.
- Arienzo, M., Toscanesi, M., Trifuoggi, M., Ferrara, L., Stanislao, C., Donadio, C., et al. (2019). Contaminants bioaccumulation and pathological assessment in *Mytilus galloprovincialis* in coastal waters facing the brownfield site of Bagnoli, Italy. *Marine Pollution Bulletin*, 140, 341–352.
- Arrighetti, F., Landro, S. M., Lambre, M. E., Penchaszadeh, P. E., & Teso, V. (2019). Multiple-biomarker approach in the assessment of the health status of a novel sentinel mussel *Brachidontes rodriguezii* in a harbor area. *Marine Pollution Bulletin*, 140, 451–461.
- Aslan, E., Ugru Gorgun, A., Katalay, S., Filizok, I., Becerik, S., & Aydemir, T. (2018). An investigation on the seasonal variations of the biomarkers of oxidative stress response and their correlations to Polonium-210 in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and common sole (*Solea solea*) from Izmir Bay, Turkey. *Journal of Environmental Radioactivity*, 189, 103–108.
- Atli, G., Alptekin, Ö., Tükel, S., & Canli, M. (2006). Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143, 218–224.
- Bakhmet, I., Berger, V. J., & Khalaman, V. (2005). The effect of salinity change on the heart rate of *Mytilus edulis* specimens from different ecological zones. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 318, 121–126.
- Balbi, T., Fabbri, R., Montagna, M., Camisassi, G., & Canesi, L. (2017). Seasonal variability of different biomarkers in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) farmed at different sites of the Gulf of La Spezia, Ligurian sea, Italy. *Marine Pollution Bulletin*, 116, 348–356.
- Bao, M., Huo, L., Wu, J., Ge, D., Lv, Z., Chi, C., et al. (2018). A novel biomarker for marine environmental pollution of CAT from *Mytilus coruscus*. *Marine Pollution Bulletin*, 127, 717–725.
- Barillet, S., Adam-Guillermin, C., Palluel, O., Porcher, J. M., & Devaux, A. (2011). Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environmental Pollution*, 159, 495–502.
- Beiras, R. (2018). *Biological Tools for Monitoring* (pp. 265–291)
- Benali, I., Boutiba, Z., Grandjean, D., de Alencastro, L. F., Rouane-Hacene, O., & Chevre, N. (2017). Spatial distribution and biological effects of trace metals (Cu, Zn, Pb, Cd) and organic micropollutants (PCBs, PAHs) in mussels *Mytilus galloprovincialis* along the Algerian west coast. *Marine Pollut. Bull.*, 115, 539–550.
- Blanco-Rayon, E., Guilhermino, L., Irazola, M., Ivanina, A. V., Sokolova, I. M., Izagirre, U., & Mari Gomez, I. (2019). The influence of short-term experimental fasting on biomarker responsiveness in oil WAF exposed mussels. *Aquatic Toxicol.*, 206, 164–175.
- Boukadida, K., Cachot, J., Clerandeaux, C., Gourves, P. Y., & Banni, M. (2017). Early and efficient induction of antioxidant defense

- system in *Mytilus galloprovincialis* embryos exposed to metals and heat stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 138, 105–112.
- Bouzahouane, H., Barour, C., Sleimi, N., & Ouali, K. (2018). Multi-biomarkers approach to the assessment of the southeastern Mediterranean Sea health status: Preliminary study on *Stramonita haemastoma* used as a bioindicator for metal contamination. *Chemosphere*, 207, 725–741.
- Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., & Deudero, S. (2007). Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146, 531–539.
- Brooks, S. J., Farnen, E., Heier, L. S., Blanco-Rayon, E., & Izagirre, U. (2015). Differences in copper bioaccumulation and biological responses in three *Mytilus* species. *Aquatic Toxicology*, 160, 1–12.
- Bussell, J. A., Gidman, E. A., Causton, D. R., Gwynn-Jones, D., Malham, S. K., Jones, M. L. M., et al. (2008). Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 358, 78–85.
- Cappello, T., Maisano, M., Mauceri, A., & Fasulo, S. (2017). (1)H NMR-based metabolomics investigation on the effects of petrochemical contamination in posterior adductor muscles of caged mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 417–422.
- Cappello, T., Mauceri, A., Corsaro, C., Maisano, M., Parrino, V., Lo Paro, G., et al. (2013). Impact of environmental pollution on caged mussels *Mytilus galloprovincialis* using NMR-based metabolomics. *Marine Pollution Bulletin*, 77, 132–139.
- Carregosa, V., Velez, C., Soares, A. M., Figueira, E., & Freitas, R. (2014). Physiological and biochemical responses of three Veneridae clams exposed to salinity changes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 177, 1–9.
- Casas, S., & Bacher, C. (2006). Modelling trace metal (Hg and Pb) bioaccumulation in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, applied to environmental monitoring. *Journal of Sea Research*, 56, 168–181.
- Chatel, A., Hamer, B., Talarmin, H., Dorange, G., Schroder, H. C., & Muller, W. E. (2010). Activation of MAP kinase signaling pathway in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of environmental pollution. *Aquatic Toxicology*, 96, 247–255.
- Coppola, F., Almeida, A., Henriques, B., Soares, A., Figueira, E., Pereira, E., & Freitas, R. (2017). Biochemical impacts of Hg in *Mytilus galloprovincialis* under present and predicted warming scenarios. *Science of the Total Environment*, 601–602, 1129–1138.
- da Silva Barreto, J., de Melo Tarouco, F., de Godoi, F. G. A., Geihs, M. A., Abreu, F. E. L., Fillmann, G., et al. (2018). Induction of oxidative stress by chlorothalonil in the estuarine polychaete *Laeonereis acuta*. *Aquatic Toxicology*, 196, 1–8.
- Damiens, G., His, E., Gnassia-Barelli, M., Quiniou, F., & Roméo, M. (2004). Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 138, 121–128.
- de-la-Ossa-Carretero, J. A., Del-Pilar-Ruso, Y., Loya-Fernández, A., Ferrero-Vicente, L. M., Marco-Méndez, C., Martínez-García, E., and Sánchez-Lizaso, J. L. (2016). Response of amphipod assemblages to desalination brine discharge: Impact and recovery. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 172, 13–23.
- Del-Pilar-Ruso, Y., De-la-Ossa-Carretero, J. A., Giménez-Casalduero, F., & Sánchez-Lizaso, J. L. (2008). Effects of a brine discharge over soft bottom Polychaeta assemblage. *Environmental Pollution*, 156, 240–250.
- Dellali, M., Romeo, M., & Aissa, P. (2001). Suiivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. *Oceanologica Acta*, 24, 263–271.
- Di Giulio, R. T., Habig, C., & Gallagher, E. P. (1993). Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquatic Toxicology*, 26, 1–22.
- Dong, S., Yang, Y., Cheng, B., Ren, C., Zhang, H., Xu, H., et al. (2019). Responses of antioxidant defenses in the clam *Macrura veneriformis* to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 217, 98–105.
- Ducrot, V. (2005). *Compréhension et modélisation des relations entre les caractéristiques biologiques et écologiques et la sensibilité aux contaminants des communautés d'invertébrés benthiques: perspectives pour l'évaluation des effets des substances chimiques*. Université Paul Verlaine-Metz.
- e Silva, C. A. R., Smith, B. D., & Rainbow, P. S. (2006). Comparative biomonitors of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil). *Marine Environmental Research*, 61, 439–455.
- Faggio, C., Tsarpali, V., & Dailianis, S. (2018). Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *Science of the Total Environment*, 636, 220–229.
- Fernández-Torquemada, Y., González-Correa, J. M., Loya, A., Ferrero, L. M., Díaz-Valdés, M., & Sánchez-Lizaso, J. L. (2009). Dispersion of brine discharge from seawater reverse osmosis desalination plants. *Desalination and Water Treatment*, 5, 137–145.
- Fernández-Torquemada, Y., & Sánchez-Lizaso, J. L. (2011). Responses of two Mediterranean seagrasses to experimental changes in salinity. *Hydrobiologia*, 669, 21.
- Fernández-Torquemada, Y., Sánchez-Lizaso, J. L., & González-Correa, J. M. (2005). Preliminary results of the monitoring of the brine discharge produced by the SWRO desalination plant of Alicante (SE Spain). *Desalination*, 182, 395–402.
- Flammarion, P., Devaux, A., & Garric, J. (2001). Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Exemples d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 209–226.
- Forbes, V. E., Palmqvist, A., & Bach, L. (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 272–280.
- Freitas, R., De Marchi, L., Bastos, M., Moreira, A., Velez, C., Chiesa, S., et al. (2017). Effects of seawater acidification and salinity alterations on metabolic, osmoregulation and oxidative stress markers in *Mytilus galloprovincialis*. *Ecological Indicators*, 79, 54–62.
- Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C., & Mouneyrac, C. (2001). Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site. *Biomarkers*, 6, 91–107.
- Gherras Touahri, H., Boutiba, Z., Benguedda, W., & Shaposhnikov, S. (2016). Active biomonitoring of mussels *Mytilus galloprovincialis* with integrated use of micronucleus assay and physiological indices to assess harbor pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 110, 52–64.
- Gonzalez-Fernandez, C., Albetosa, M., & Sokolova, I. (2017). Interactive effects of nutrition, reproductive state and pollution on molecular stress responses of mussels, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. *Marine Environment Research*, 131, 103–115.
- Corbi, S., Avio, G. C., Benedetti, M., Totti, C., Accoroni, S., Pichierri, S., et al. (2013). Effects of harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* exposure on immunological, histological and oxidative responses of mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 35, 941–950.
- Corbi, S., Lamberti, C. V., Notti, A., Benedetti, M., Fattorini, D., Moltedo, G., & Regoli, F. (2008). An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea. *Marine Environment Research*, 65, 34–49.

- Hamer, B., Jakšić, Ž., Pavičić-Hamer, D., Perić, L., Medaković, D., Ivanković, D., et al. (2008). Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. *Aquatic Toxicology*, 89, 137–151.
- Jean-Claude, A., & Claude, A.-T. (2008). *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Lavoisier.
- Jing, W., Lang, L., Lin, Z., Liu, N., & Wang, L. (2019). Cadmium bioaccumulation and elimination in tissues of the freshwater mussel *Anodonta woodiana*. *Chemosphere*, 219, 321–327.
- Koch, M., Schopmeyer, S., Kyhn-Hansen, C., Madden, C., & Peters, J. (2007). Tropical seagrass species tolerance to hypersalinity stress. *Aquatic Botany*, 86, 14–24.
- Kopecka, J., Lehtonen, K. K., Barsiene, J., Broeg, K., Vuorinen, P. J., Gercken, J., & Pempkowiak, J. (2006). Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdansk (southern Baltic). *Marine Pollution Bulletin*, 53, 406–421.
- Lemaire, N., Pellerin, J., Fournier, M., Girault, L., Tamigneaux, E., Cartier, S., & Pelletier, E. (2006). Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *Mytilus* spp. from farm sites of eastern Quebec. *Aquaculture*, 261, 729–751.
- Maanan, M. (2008). Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region. *Environmental Pollution*, 153, 176–183.
- Marín-Guirao, L., Sandoval-Gil, J. M., Bernardeau-Esteller, J., Ruiz, J. M., & Sánchez-Lizaso, J. L. (2013). Responses of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* to hypersaline stress duration and recovery. *Marine Environment Research*, 84, 60–75.
- Mejdoub, Z., Fahde, A., Loufi, M., & Kabine, M. (2017). Oxidative stress responses of the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to emissary's pollution in coastal areas of Casablanca. *Ocean & Coastal Management*, 136, 95–103.
- Mucci, A. (1997). Chimie des Milieux Aquatiques. Chimie des Eaux Naturelles et des Interfaces dans l'Environnement. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 61, 2158–2159.
- Murray, J. B., & Wingard, G. L. (2006). *Salinity and temperature tolerance experiments on selected Florida Bay mollusks*. Rep. No. 2331–1258.
- Nardi, A., Benedetti, M., d'Errico, G., Fattorini, D., & Regoli, F. (2018). Effects of ocean warming and acidification on accumulation and cellular responsiveness to cadmium in mussels *Mytilus galloprovincialis*: Importance of the seasonal status. *Aquatic Toxicology*, 204, 171–179.
- Oliveira, P., Lirio, A. V., Canhoto, C., & Guilhermino, L. (2018). Toxicity of mercury and post-exposure recovery in *Corbicula fluminea*: Neurotoxicity, oxidative stress and oxygen consumption. *Ecological Indicators*, 91, 503–510.
- Pellerin, J., & Amiard, J.-C. (2009). Comparison of bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in two marine bivalves (*Mytilus edulis* and *Mya arenaria*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150, 186–195.
- Peric, L., Nerlovic, V., Zurga, P., Zilic, L., & Ramsak, A. (2017). Variations of biomarkers response in mussels *Mytilus galloprovincialis* to low, moderate and high concentrations of organic chemicals and metals. *Chemosphere*, 174, 554–562.
- Perošević, A., Joksimović, D., Durović, D., Milasević, I., Radomirović, M., & Stanković, S. (2018). Human exposure to trace elements via consumption of mussels *Mytilus galloprovincialis* from Boka Kotorska Bay, Montenegro. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50, 554–559.
- Pol, J. S. M. (2015). *Environment programme mediterranean action plan*.
- Richir, J., & Gobert, S. (2014). The effect of size, weight, body compartment, sex and reproductive status on the bioaccumulation of 19 trace elements in rope-grown *Mytilus galloprovincialis*. *Ecological Indicators*, 36, 33–47.
- Risso-de Faverney, C., Guibolini-Sabatier, M. E., & Francour, P. (2010). An ecotoxicological approach with transplanted mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for assessing the impact of tyre reefs immersed along the NW Mediterranean Sea. *Marine Environment Research*, 70, 87–94.
- Ruiz, J. M., Marín-Guirao, L., & Sandoval-Gil, J. M. (2009). Responses of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* to in situ simulated salinity increase. *Botanica Marina*, 52, 459–470.
- Ruso, Y. D. P., De la Ossa Carretero, J. A., Casalduero, F. G., & Lizaso, J. S. (2007). Spatial and temporal changes in infaunal communities inhabiting soft-bottoms affected by brine discharge. *Marine Environment Research*, 64, 492–503.
- Sanchez-Lizaso, J. L., Romero, J., Ruiz, J., Gacia, E., Buceta, J. L., Invers, O., et al. (2008). Salinity tolerance of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*: Recommendations to minimize the impact of brine discharges from desalination plants. *Desalination*, 221, 602–607.
- Sandoval-Gil, J. M., Marín-Guirao, L., & Ruiz, J. M. (2012). Tolerance of Mediterranean seagrasses (*Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa*) to hypersaline stress: Water relations and osmolyte concentrations. *Marine Biology*, 159, 1129–1141.
- Schintu, M., Durante, L., Maccioni, A., Meloni, P., Degetto, S., & Contu, A. (2008). Measurement of environmental trace-metal levels in Mediterranean coastal areas with transplanted mussels and DGT techniques. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 832–837.
- Sillero-Rios, J., Sureda, A., Capo, X., Oliver-Codorniu, M., & Arechavala-Lopez, P. (2018). Biomarkers of physiological responses of *Octopus vulgaris* to different coastal environments in the western Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 128, 240–247.
- Silva Dos Santos, F., Neves, R. A. F., Carvalho, W. F., Krepsky, N., & Crapez, M. A. C. (2018). Evaluation of the immune responses of the brown mussel *Perna perna* as indicators of fecal pollution. *Fish & Shellfish Immunology*, 80, 115–123.
- Sparks, C., Marnewick, J., Toefy, R., Snyman, R., & Odendaal, J. (2019). Baseline levels of antioxidant activities in *Mytilus galloprovincialis* along the coast of Cape Town, South Africa. *Marine Pollution Bulletin*, 140, 287–293.
- Teixeira, M., Almeida, A., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Wrona, F. J., et al. (2017). Toxic effects of the antihistamine cetirizine in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Water Research*, 114, 316–326.
- Verlecar, X., Jena, K., & Chainy, G. (2008). Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76, 745–752.
- Vernon, E. L., & Jha, A. N. (2019). Assessing relative sensitivity of marine and freshwater bivalves following exposure to copper: Application of classical and novel genotoxicological biomarkers. *Mutation Research*, 842, 60–71.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. J., & Valavanidis, A. (2007). Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin*, 54, 1361–1371.
- Wang, Y., Hu, M., Wong, W. H., Shin, P. K., & Cheung, S. G. (2011). The combined effects of oxygen availability and salinity on physiological responses and scope for growth in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*, 63, 255–261.
- Wiltshire, K. H., Kraberg, A., Bartsch, I., Boersma, M., Franke, H.-D., Freund, J., et al. (2010). Helgoland roads, North Sea: 45 years of change. *Estuaries and Coasts*, 33, 295–310.

- Yavasoglu, A., Ozkan, D., Guner, A., Katalay, S., Oltulu, F., & Yavasoglu, N. U. K. (2016). Histopathological and apoptotic changes on marine mussels *Mytilus galloprovincialis* (Lamark, 1819) following exposure to environmental pollutants. *Marine Pollution Bulletin*, *109*, 184–191.
- Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Apraiz, I., Cancio, I., Orbea, A., Soto, M., et al. (2008). Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. *Environmental Pollution*, *153*, 157–168.