

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة سعد دحلب البليدة
Université Saad Dahlab de Blida



Faculté des Sciences de l'Ingénieur

Département de Chimie Industrielle

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master II
Option : Procédés de Traitement des Effluents et Protection de l'Environnement

**Etude de biomarqueurs de stress chez
les bivalves marins :
Cas de la moule *Mytilus galloprovincialis***

Présenté par Mostapha DJELLALI

Soutenu devant le jury composé de :

- | | | |
|---------------------------|---------------------------------|-----------|
| - NACEUR M. W. Professeur | Université Saad Dahlab de Blida | Président |
| - BOUZID B. MCA | Université Saad Dahlab de Blida | Examineur |
| - MEGUELATI S. MCB | Université Saad Dahlab de Blida | Examineur |
| - Dr A. BADIS MCA | Université Saad Dahlab de Blida | Promoteur |

Septembre 2011

Remerciements

Mes remerciements les plus sincères au **Dr Abdelamlek BADIS**, qui à toujours soutenu mes convictions scientifiques, et de plus à bien accepter de diriger ce modeste travail. Je vous remercie de votre confiance sans limite.

Mes remerciements les plus cordiales aux membres du jury, au **Pr Mohamed Wahib NACEUR** qui à accepter de présider le jury malgré un programme chargé, aux **Dr Bachir BOUZID** et **Dr Smain MEGUELATI** qui m'ont fait honneur d'accepter de juger ce modeste travail.

Mes remerciements vont à l'ensemble du département chimie industrielle, le Directeur à leurs tête, et à mes anciens enseignants que j'ai eu la chance et le plaisir de revoir à nouveau. MERCI. Le temps ne peut éteindre la lumière que vous avez sue allumée en moi.

Mes reconnaissances à Messieurs **Abdellah MEKNACHI** et **Rachid ANNANE** pour leurs soutiens tant sur le plan scientifique qu'humain. Merci à vous deux.

A mes collègues et ami(e)s du CNRDPA.MERCI

A mon Directeur, MERCI, pour sont professionnalisme et sa disponibilité.

Un immense merci à l'ensemble des membres du laboratoire CNRDPA, pour m'avoir aidé à réaliser mes travaux dans les meilleures conditions possibles.

Enfin, A tous ceux et à toutes celles dont l'amitié fut ma lumière.

A ma regrettée Mère

A mon Père

A mes Frères et Sœurs

A ma bien aimée Femme

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة آثار التداخل للحالة الفيزيولوجية والتلوث عند المحار *Mytilus galloprovincialis*. وتمت دراسة هذه الآثار من خلال قياس مستويات الكاتالاز (أنزيمات دفاع مضادة للأكسدة) بواسطة الوضع المزمن والحاد على التوالي في البحر وفي المخبر. القيمة القصوى للملاحظة للكاتالاز و الموافقة ل $19,6 \pm 157,72$ وحدة /ملغ من البروتين قد تم تسجيلها في ميناء خميستي. هذا التركيز المرتفع راجع لتلوث الميناء. القيمة الدنيا سجلت في بناء قوراية ($87,6 \pm 62,40$ وحدة /ملغ من البروتين). بعد تعريض بلح البحر لمستويات (تركيزات) مختلفة من النحاس لمدة 72 ساعة تم تسجيل قيمة الكاتالاز ما تعادل $9,06 \pm 113$ وحدة /ملغ من البروتين وذلك على مستوى مجمل جسم بلح البحر حين تعريضه لاقصى تركيز من النحاس ما قيمته 35 ملغ/ل اما على مستوى الخياشيم فقد تم تسجيل قيمة قصوى الكاتالاز ما تعادل $19,5 \pm 162$ وحدة /ملغ من البروتين وذلك عند تعرضه لتركيز 5 ملغ/ل من النحاس. هذا ما يجعل من الخياشيم موقعا رئيسيا للاجهاء المؤكسد. في الاخير ،ان تجارب و عملية ازالة التلوث تثبت وجود نظم(عمليات) ازالة التسمم عند بلح البحر ،و بالتالي قد تم تسجيل مستويات تخفيض من 26 الى 68% .

الكلمات المفتاحية : علم السموم البيئية، *Mytilus galloprovincialis*، الكاتالاز ، النحاس ، والتسمم المزمن و الحاد

Résumé :

Le but de ce travail est d'étudier les effets interférents de la condition éco physiologique et de la pollution chez la moule *Mytilus galloprovincialis*. Ces effets ont été étudiés par une mesure des niveaux de la catalase (enzymatique de défense anti-oxydante), en mode chronique et en mode aiguë, respectivement par la mise en mer et au laboratoire. Influencés par la condition anthropique, une induction maximale de $157,72 \pm 19,6$ U/mg de protéines de la CAT est observée au port de Khemisti. La plus faible induction est enregistrée au niveau du port de Gouraya ($40,62 \pm 6,87$ U/mg de protéines). Exposées à différentes teneurs de cuivre pour une durée de 72h, un taux d'inductions de $113 \pm 9,06$ U/mg protéines de la CAT au niveau de la chaire totale est observée pour une teneur maximale de $35 \mu\text{g Cu / l}$. Au niveau des branchies une induction maximale de $162 \pm 19,5$ U/mg protéines est observée à $5 \mu\text{g Cu / l}$, ce qui fait des branchies site majeur de stress oxydant. Enfin, les essais de décontamination démontrent de l'existence chez les moules de systèmes de détoxification. Ainsi des réductions de 26 à 68 % sont enregistrées.

Mots clés : écotoxicologie, *Mytilus galloprovincialis*, Catalase, Cuivre, intoxication chronique et aigues.

Abstract:

The aim of this work is to study the effects of interfering physiological and ecological condition of pollution in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. These effects were studied by measuring the levels of catalase (enzymatic antioxidant defense) mode chronic and acute mode, respectively, through the sea and in the laboratory. Influenced by anthropogenic condition, a maximum induction of 157.72 ± 19.6 U / mg protein was observed in the CAT port Khemisti. The lower induction is registered at the port of Gouraya (40.62 ± 6.87 U / mg protein). Exposed to different concentrations of copper for a period of 72 hours, a rate of inductions 113 ± 9.06 U / mg protein for CAT in the pulp is observed for a total maximum of 35 mg Cu / l . Gill maximum induction of 162 ± 19.5 U / mg protein was observed at 5 mg Cu / l , Gill is a major site of oxidative stress. Finally, decontamination trials demonstrate the existence of mold in detoxification systems, up to 68% discount.

Key words: ecotoxicology, *Mytilus galloprovincialis*, catalase, copper, acute and chronic poisoning.

Table de matière

Introduction	2
--------------------	---

Partie théorique

Chapitre I : Pollutions et dégradations des écosystèmes aquatiques côtiers

I.1. Définition de la pollution marine	4
I.2. Origine et diversité des contaminants chimiques	4
I.3. Dynamique des contaminants dans l'environnement aquatique	5
I.4. Mécanismes d'accumulation des métaux	6

Chapitre II: Biomarqueurs de stress chez les bivalves

II. 1. Ecotoxicologie : Définition	9
II. 2. Biomarqueurs : Définition	9
II. 3. Biosurveillance et Biomarqueurs en écotoxicologie	10
II. 4. Réponses biochimiques aux stress	13
II. 4. 1. Protéines de stress	13
II. 5. Les indicateurs de stress oxydatif	14
II.5. 1. Principales espèces activées de l'oxygène (EAO)	15
II.5. 2. Principaux systèmes de défense antioxydants :	16
II. 5. 2. 1. Catalase (CAT) :	17
II. 6. Stress oxydatif chez les mollusques marins et l'évaluation environnemental	19

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériels et méthodes

III. 1. Choix du matériel biologique : la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	25
III.1. 1. Systématique	25
III.1. 2. Répartition géographique	25
III.1. 3. Nourriture	26
III.1. 4. Reproduction	26
III. 2. Avantage du modèle moule	28
III. 3. Collecte des moules <i>Mytilus galloprovincialis</i> :	29

III. 4. Expériences réalisées	29
III. 4. 1. Expérience de transplantation de moule (Expérience <i>In situ</i>)	29
III. 4. 2. Expérience au laboratoire	32
III. 5. Analyses biochimiques	33
III. 5. 1. Préparation des échantillons tissulaires	33
III. 5. 2. Dosages des protéines par la méthode de Lowry.....	33
III. 5. 3. Dosages de la Catalase par mode Cinétique	34

Chapitre IV: Résultats et discussions

IV. Résultats et discussions	36
IV. 1. Résultats.....	36
IV. 1. 1. Mesure de la catalase au niveau des moules du site de référence	36
IV.1. 2. Résultats du test de transplantation de moule (Expérience <i>In situ</i>).....	37
IV. 1. 3. Résultats des tests de toxicité au cuivre	40
IV. 2. Discussions	42
IV.2.1. Discussions des résultats du test de transplantation	42
IV.2. 2. Discussions des résultats des tests de toxicité au cuivre	44
Conclusion.....	46

Liste des abréviations

AchE	Acétylcholinestérase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
APPL	Agence pour la Protection du Littoral (EPIC-Wilaya d'Alger)
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
CAT	Catalase
CYP1A	Cytochrome P450 1 A
Cys-x-Cys	Séquence ADN Cystéine-x-Cystéine
EAO	Espèces Activées de l'Oxygène
EPIC	Entreprise Publique à caractère Industriel et Commercial
EROD	EthoxyRésorufine- <i>O</i> -Dééthylase
GPX	Glutathion peroxydase
GRNC	Groupe Radioécologie Nord Cotentin (France)
GRP	Glucose Regulated Proteins
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion <i>S</i> -transférase
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HAPs	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HSP	Heat Shock Protein
IC	Indice de Condition
JAMP	Joint Assessment and Monitoring Programme
LPO	lipoperoxydation
MATE	Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement (Algérie)
MDR	Multidrug Resistance
MEDPOL	MEDiteraneen POLution
MT	Métallothionéine
MXR	Multi Xenobiotic Resistance
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NOEC	No observed effect dose
ONEDD	Observatoire National de l'Environnement et Développement Durable- Algérie
ONL	Observatoire National du Littoral - Algérie
OSPAR	OSPAR : la Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-est ou Convention OSPAR (OSPAR pour « Oslo-Paris ») définit les modalités de la coopération internationale pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du nord-est. Elle est entrée en vigueur le 25 mars 1998, et remplace les Conventions d'Oslo et de Paris.

PAM	Plan d'Action pour la Méditerranée (Convention de Barcelone 1975)
PCBs	Polychlorobiphenyls
PNEC	Predicted No Effect Concentration
RINBIO	Réseau INTégrateur BIOlogique – Ifremer France
RNO	Réseau National d'Observation – Ifremer France
ROS	Reactive Oxygen Species
TRIS	Tri(hydroxyméthyl)aminométhane
UNESCO	Organisation des Nations unies pour l'éducation, la science et la culture. L'Unesco abrite aussi la Commission Océanographique Intergouvernementale, organe de coordination scientifique.
VG	Protéines de type vitellogénine.
UV-Vis	Ultra Violet et Visible

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 ;

Aiguë : 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 qui permettent 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 ;

Bioaccumulation : processus par lequel des substances chimiques sont intégrées et retenues par les organismes, soit directement dans l'environnement ou par consommation d'aliments contenant ces substances ;

Bioamplification : augmentation à chaque maillon de la chaîne alimentaire, de la concentration d'un polluant dans l'organisme ;

Biocénose : Ensemble des êtres vivants d'un biotope ou d'une station donnée. (La biocénose et le biotope constituent un écosystème) ;

Bioessai : test expérimental réalisé pour identifier le potentiel toxique d'une substance ou d'un mélange de substances par la réponse biologique de l'organisme test

Bioindicateur : désigne des espèces biologiques ou animales qui, du fait de leurs particularités écologiques, constituent l'indice précoce de modifications biotiques ou abiotiques de l'environnement dues à des activités humaines (ex: les moules).

Biomarqueur : Mesure de changements observables à différents niveaux d'organisation biologique permettant de révéler l'exposition à une substance chimique à caractère polluant et/ou les effets biologiques induits.

Biomonitoring (n.m.) ou **biosurveillance** (n.f.) : désigne l'utilisation du vivant (organisme ou ensemble d'organismes à tous les niveaux d'organisation biologique moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique et écologique) pour surveiller l'évolution, des modifications, des altérations, ou la stabilité de la qualité d'un milieu

Biotique (adj.) : en écologie, les facteurs biotiques représentent l'ensemble des interactions du vivant sur le vivant dans un écosystème. Opposables aux facteurs abiotiques, ils constituent

une partie des facteurs écologiques de cet écosystème. Il s'agit des ressources alimentaires, des relations trophiques de prédation, compétition, parasitisme, etc.

Biotope : Milieu biologique offrant à une biocénose des conditions de vie relativement stable (biotope terrestre, marin, etc.) ;

Bivalve (adj.) : se dit de mollusques (classe des Bivalvia) dont la coquille est constituée de deux parties distinctes et attachées, plus ou moins symétriques, pouvant s'ouvrir ou se refermer. Cette classe comprend environ trente mille espèces, notamment les moules, les huîtres et les palourdes. Les bivalves sont tous exclusivement aquatiques, et on les trouve aussi bien dans l'eau douce que dans l'eau salée.

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 ;

Espèces sentinelles : organismes sensibles à la présence d'un polluant donné dans le milieu environnant

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 ;

Mésocosme : dispositif expérimental délimité spatialement, situé en conditions environnementales naturelles et qui simule de façon réaliste les écosystèmes réels.

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 ;

Nécrose : Une de deux formes principales de mort cellulaire (l'autre étant l'apoptose, ou mort cellulaire programmée) observée lors d'accidents traumatiques, suite à certaines pathologies ou lors de déficits métaboliques. La nécrose est accompagnée habituellement d'une réponse inflammatoire qui consiste en la présence d'exsudat et de cellules spécialisées du système hématopoïétique comme les lymphocytes et les macrophages. La cassure de la membrane plasmique qui en résulte conduit à la libération dans le milieu extérieur du contenu cytoplasmique ;

Spéciation : répartition d'un élément ou d'un métal parmi différentes formes physiques ou chimiques.

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 ;

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

Liste des figures

Fig. 1 : Réponse physiologique à une augmentation de la concentration métallique dans le milieu (a : métaux non essentiels, b : métaux essentiels) (d'après Simkiss et Taylor 1989 <i>in</i> Morin, 2006).....	6
Fig. 2: Modèle conceptuel des interactions entre les métaux et les organismes aquatiques (Source Campbell et Couillard, 2004 <i>in</i> Marie, 2005).....	8
Fig. 3 : Mécanismes membranaires permettant l'entrée des ions métalliques M^+ dans la cellule (Simkiss et Taylor, 1989, modifié <i>in</i> Marie, 2005).	8
Fig. 4 : Evaluation de la qualité de l'environnement par une approche globale-chimique et biologique (d'après Lagadic et Caquet, 1996).	11
Fig. 5 : Chaîne de formation des Espèces Activées de l'Oxygène (EAO) à partir de l'oxygène moléculaire chez les organismes aérobies.....	15
Fig. 6 : Intervention des systèmes antioxydants dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules animales (<i>in</i> Sanchez, 2007).....	18
Fig. 7 : répartition géographique de la Moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	26
Fig. 8 : La moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	28
Fig. 9 : Zone d'étude.	30
Fig. 10 : Station artificielle pour la transplantation des moules.....	31
Fig. 11 : Dispositif expérimental.....	32
Fig. 12 : Procédures expérimentales (dosages biochimiques).....	35
Fig.13 : Variation de l'activité CAT en fonction des classes de tailles.....	36
Fig. 14 : Variation de l'IC en fonction des classes de tailles.....	36
Fig. 15 : Variation de l'activité CAT en fonction du temps de transplantation Classe de taille [3, 4[cm).....	38
Fig. 16 : Variation d'IC en fonction du temps d'exposition. Classe de taille [3, 4[cm.....	38
Fig. 17 : Variation de la taille en fonction du temps de transplantation.....	39
Fig. 18 : Variation de l'activité CAT en fonction du temps de transplantation. Classe de taille [5, 6[cm).....	39
Fig. 19 : Variation de l'activité CAT en fonction du temps de transplantation. Classes de tailles [3, 4[et [5, 6[(cm).....	40
Fig. 20 : Variation de l'activité CAT au niveau de la chaire en fonction de la concentration du Cu pour la classe de taille [4, 5[cm).	40
Fig. 21 : Variation de l'activité CAT au niveau des branchies en fonction de la concentration du Cu pour la classe de taille [4, 5[(cm).	41
Fig. 22: Variation de l'activité CAT au niveau des branchies : phase d'exposition et phase de décontamination.	41

Liste des tableaux

Tab. 1 : Classification des biomarqueurs	12
Tab. 2 : Modification de l'activité des enzymes anti oxydantes chez des organismes exposés au cadmium (Cd) ou au cuivre (Cu) : augmentation (↑), diminution (↓) par rapport aux témoins. GD : glande digestive, BR : branchies, h : heure, j : jour (Bigot, 2009).....	23
Tab. 3 : Modification d'activités des enzymes anti oxydantes en fonction de la saison chez des bivalves : augmentation (↑), diminution (↓). GD : glande digestive, BR : branchies, T° : température (Bigot, 2009).....	24
Tab. 4 : Conditions physico-chimiques de la station de référence	37

Introduction

Initialement développés en biologie humaine pour fournir un diagnostic précoce de certaines pathologies, les biomarqueurs ont rapidement été utilisés en écotoxicologie dans l'objectif d'évaluer les effets de la contamination des milieux sur les organismes sauvages.

Ne prenant généralement pas en compte la notion de spéciation ou de biodisponibilité des polluants, les méthodes d'analyses physico-chimiques, bien que toujours plus performantes, atteignent leurs limites en tant qu'outils d'aide à la gestion environnementale. Il est donc apparu nécessaire de compléter ces mesures par des données biologiques permettant d'évaluer l'effet potentiel global des substances présentes dans le milieu vivant. Dans ce contexte, les biomarqueurs ont été définis comme des changements observés ou mesurés à différents niveaux d'organisation biologique infra-populationnels et qui reflètent l'exposition des organismes à au moins un contaminant (Depledge et Fossi, 1994; Lagadic *et al.*, 1997). Les recherches menées sur cette thématique ont mis en avant la complémentarité de l'approche biomarqueurs avec les méthodes conventionnelles de surveillance des milieux aquatiques. Les biomarqueurs peuvent permettre d'identifier les effets biologiques précoces de la contamination sur les organismes (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003) mais également les sources de contamination (Galloway *et al.*, 2004a). De plus, les biomarqueurs mesurés aux niveaux les plus bas de l'organisation biologique peuvent participer à la caractérisation des voies mécanistiques permettant de lier exposition et effets (Galloway *et al.*, 2004b).

Dans une optique de préservation de la biodiversité, de la qualité et du fonctionnement normal des écosystèmes aquatiques côtiers, plusieurs marqueurs biochimiques ont été utilisés dans le programme JAMP (Joint Assessment and Monitoring Programme) développé dans le cadre de la convention OSPAR et le programme MEDPOL mis en place dans le cadre du Programme Environnement des Nations Unies (PAM-UNEP). Ces deux programmes ont permis d'acquérir un large jeu de données couvrant une large zone géographique et incluant le suivi dans l'espace et dans le temps de différents biomarqueurs mesurés chez le poisson et les mollusques. D'autres programmes de recherche ont également été développés, notamment RINBIO, RNO par l'Ifremer-France, le programme MUSSEL WATCH – Méditerranée pour la surveillance de l'environnement marin en Méditerranée. En Algérie le MATE a installé plusieurs entités de surveillance et d'observation de l'environnement tels que l'APPL, l'ONL, l'ONEDD.

La démarche scientifique adoptée est préconisée par l'équipe de recherche « Environnement et pollution » de la division de recherche « Ecosystèmes Aquatiques » du CNRDPA - Bou-Ismaïl. Dans ce qui suit, il est fait référence principalement de la catalase comme biomarqueur et de la moule, espèce *emblématique* et espèce par *excellence indicatrice* de la pollution dans les réseaux de surveillance de l'environnement marin en Méditerranée et dans le monde. Pour la mise en évidence de l'intérêt des biomarqueurs dans les études d'évaluation de la pollution, des tests de toxicité aigue au cuivre sont réalisés aux laboratoires du CNRDPA et des essais de transplantations de moule sont effectués au niveau des ports de pêches, réputés pollués, de la baie de Bou ismail.

Ainsi la démarche entreprise pour la réalisation du présent travail s'articule en deux grandes parties.

Une partie théorique, organisé en deux chapitres, le premier chapitre est consacré à l'étude de la pollution et la dégradation des écosystèmes aquatiques côtiers ainsi que la dynamique des contaminants en milieu et les mécanismes d'accumulation des métaux lourds. Le deuxième chapitre est dédié à la présentation des outils d'évaluation environnementale en écotoxicologie, en particulier les biomarqueurs. Une attention particulière aux protéines de stress et aux principaux systèmes de défense antioxydant observés chez les mollusques marins, notamment la catalase, ont été singulièrement étudiées.

La seconde partie, consacré aux matériels et méthodes, s'articule autours de deux chapitres. La stratégie expérimentale adoptée, le matériel biologique et les méthodes analytiques mis en œuvre tout au long de ce travail sont présentées dans ce troisième chapitre. Le quatrième chapitre regroupe l'ensemble des résultats acquis au cours des différentes expériences au laboratoire et *in situ* avec leurs interprétations et discussions. Enfin, une conclusion clôture ce modeste travail.

Partie théorique

Chapitre I

Pollutions et dégradations des écosystèmes aquatiques côtiers

I.1. Définition de la pollution marine

La pollution marine a été définie par la **Commission Océanographique Internationale de l'UNESCO** comme étant : *'...l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, de substances ou d'énergie dans l'environnement marin pouvant entraîner des effets délétères, tels que dommages aux ressources biologiques, dangers pour la santé humaine, entraves aux activités maritimes, y compris les pêcheries, détérioration des qualités de l'eau de mer pour son utilisation et réduction des possibilités dans le domaine des loisirs* (Calamari et Naeve, 1994 in Ramade, 1998).

De cette définition, il est à rappeler que la richesse biologique du littoral, ainsi que les possibilités de développement qu'il offre, a poussé les hommes à s'installer près de la mer depuis toujours. Actuellement 60% de la population mondiale vit à moins de 100 km des côtes, soit 3,6 milliards d'êtres humains. Cette densité représente une pression considérable sur le milieu côtier, qui subit des modifications topographiques et hydrodynamiques, un puisement parfois excessif dans les ressources biologiques côtières et une contamination bactérienne et chimique liée aux activités humaines.

I. 2. Origine et diversité des contaminants chimiques

Les vagues de révolutions industrielles du 20ème siècle ont donné lieu à un développement de l'industrie chimique dans tous les secteurs économiques et la quantité de molécules de synthèse présentes sur le marché est énorme : 100000 composés environ, dont 320 reconnus cancérigène, mutagène ou reprotoxique (pour l'instant !) (in Letendre, 2009). La chimie est présente dans l'industrie en général, l'agroalimentaire, les produits ménagers, la pharmaceutique, la cosmétique et les sources de contamination de l'environnement sont multiples. A ces substances synthétiques et leurs dérivés s'ajoutent les molécules issues de l'utilisation des énergies fossiles (industrie, transport, chauffage) notamment les produits pétroliers, qui a augmenté exponentiellement depuis des décennies. Les déchets issus de toutes ces activités constituent une proportion majoritaire des contaminants rencontrés dans l'environnement. On rencontre également des pollutions métalliques ou métalloïdes dont les sources sont variées. Les métaux sont présents naturellement dans les roches et les sédiments océaniques et peuvent être diffusés au niveau des gisements, mais les activités anthropiques sont généralement responsables des concentrations excessives que l'on peut trouver. L'extraction minière, la métallurgie ainsi que divers procédés industriels, les rejets domestiques, la consommation de carburants et certaines activités agricoles participent ainsi à ce type de pollution.

I.3. Dynamique des contaminants dans l'environnement aquatique

Libérés dans la nature, les polluants subissent une dispersion dans les différents compartiments de l'environnement, dont la durée et l'étendue varient selon les propriétés physico-chimiques des molécules, la nature de leur introduction dans l'environnement et leur stabilité chimique. Ces paramètres conditionnent également l'exposition des organismes aux xénobiotiques et les dommages qu'ils encourent. Dans le compartiment eau, les sources de pollution des eaux sont divisées en deux catégories : les sources ponctuelles et les sources diffuses (Hemond et Fechner-Levy, 2000 *in* Letendre, 2009). Les déversements localisés, discrets et quantifiables tels les effluents industriels et les rejets de stations d'épuration, mais également les rejets accidentels, sont qualifiés de sources ponctuelles. Les molécules chimiques issues des effluents sont alors acheminées par les eaux de rejet directement dans les cours d'eau où elles débouchent. Les pollutions recouvrant une large zone ou composées de différentes sources sont difficiles à quantifier et appelées sources diffuses.

Théoriquement les organismes sont capables d'absorber toute molécule naturelle ou anthropogénique, qui est accumulée si elle n'est pas utilisée et si l'organisme ne peut pas l'excréter. Selon la nature et les propriétés des molécules, principalement la liposolubilité, mais également les aptitudes physiologiques et métaboliques des êtres vivants, l'accumulation sera différente. Les organismes aquatiques sont particulièrement sujets à l'accumulation de certains polluants pour différentes raisons. Le milieu aquatique constitue, comme déjà évoqué, le réceptacle ultime de la plupart des contaminants, dont les concentrations y sont particulièrement importantes ; les organismes liés à ce milieu sont exposés de façon massive et chronique à un panel de substances dont certaines sont particulièrement liposolubles et nocives. De plus, les espèces aquatiques possèdent généralement une capacité limitée à métaboliser les xénobiotiques dont l'excrétion est lente en comparaison aux vertébrés supérieurs.

L'accumulation des substances est alors influencée par la teneur en lipides de l'organisme ainsi que par la liposolubilité et la biodisponibilité des contaminants. Cette disponibilité est en partie liée aux particules en suspension, qui, absorbées ou en contact avec les téguments, représentent une voie importante d'exposition aux polluants et affectent notamment la bioaccumulation de composés organiques hydrophobes (Qiao, 1997; Schrap et Opperhuizen, 1990 *in* Letendre, 2009). L'accumulation indirecte de contaminants par la chaîne alimentaire contribue en grande partie à la bioaccumulation de certains polluants. Le rapport entre la

quantité de contaminants ingérés et la quantité éliminée correspond à la bioamplification (Connell, 1989 *in* Letendre, 2009).

L'enrichissement successif en polluants dans les tissus des animaux d'un réseau trophique, auquel s'ajoute la bioconcentration, entraîne une augmentation exponentielle des teneurs lorsqu'on monte dans la chaîne alimentaire (réseau trophique).

L'accumulation d'une substance dépend finalement de plusieurs facteurs: les propriétés physico-chimiques de la molécule, le transport actif et la diffusion à travers les membranes cellulaires, le taux de métabolisation et l'accumulation des métabolites, la spécificité des organes ou tissus d'accumulation ainsi que les cinétiques d'entrée et de dépuration (Franke *et al.*, 1994 *in* Letendre, 2009).

I.4. Mécanismes d'accumulation des métaux

Certains métaux sont essentiels au développement des êtres vivants, leur absorption en petite quantité est indispensable au métabolisme cellulaire (De Filippis et Pallaghy 1994 *in* Morin, 2006). C'est le cas notamment du zinc, du cuivre ou du fer. D'autres, en revanche, ne sont pas nécessaires (cadmium, plomb, mercure, arsenic) et leur toxicité est reconnue, même à de très faibles concentrations (Fig.1). Ils semblent intervenir dans les voies métaboliques d'ions métalliques essentiels de structure chimique apparentée, perturbant ainsi le fonctionnement cellulaire de transport et de régulation de ces éléments. Une carence ou un excès en ces oligo-éléments indispensables au fonctionnement cellulaire sont susceptibles d'engendrer un stress physiologique chez les organismes.

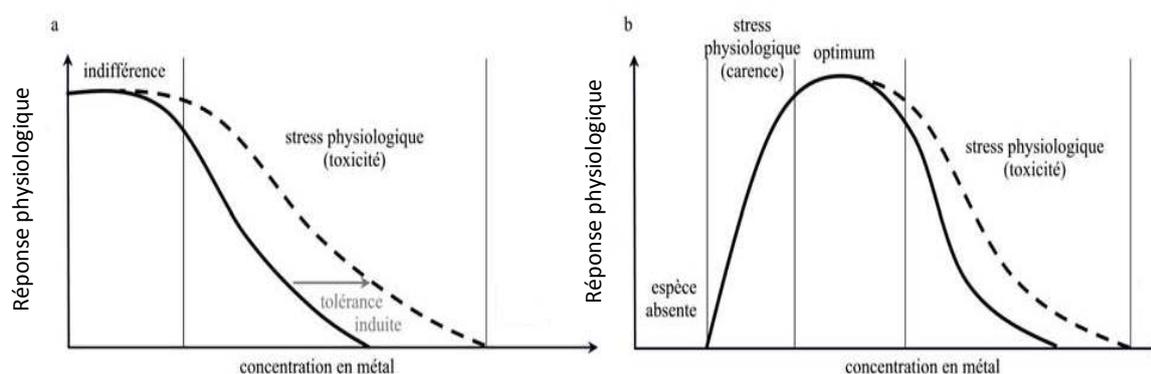


Fig. 1 : Réponse physiologique à une augmentation de la concentration métallique dans le milieu (a : métaux non essentiels, b : métaux essentiels) (d'après Simkiss et Taylor 1989 *in* Morin, 2006).

Le caractère essentiel du cuivre est lié à la participation de ce métal dans au moins 12 protéines importantes. Il joue en particulier un rôle important dans l'utilisation du fer pour la

formation de l'hémoglobine. A titre d'exemple, la plupart des crustacés et des mollusques possèdent une protéine, l'hémocyanine, qui contient du cuivre et représente leur principal transporteur d'oxygène. Dans le cas des végétaux, le cuivre entre dans la composition de plusieurs enzymes qui interviennent dans le métabolisme des sucres, de l'azote et de la paroi cellulaire (Blanquet *et al.*, 2003a)

Les effets néfastes du cuivre sur les organismes vivants se traduisent généralement par des modifications des paramètres biochimiques et des fonctions physiologiques. Des effets toxiques peuvent être observés à partir de concentrations ne dépassant pas 1 à 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Flemming et Trevors, 1989). La concentration pour laquelle aucun effet n'est observé (PNEC : Predicted No Effect Concentration) a été récemment évaluée à 1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ (GRNC, 2002 *in* Blanquet *et al.*, 2003b). Les travaux réalisés sur le sujet montrent que dans les milieux aquatiques, le phytoplancton ainsi que les invertébrés et les végétaux peuvent faire preuve d'une certaine tolérance au cuivre. Il faut alors prendre en considération les importantes variations de sensibilités spécifiques à chaque espèce, sachant que la tolérance au cuivre reste principalement liée à sa biodisponibilité dans le milieu.

La biodisponibilité des métaux, fortement dépendante de leur spéciation chimique dans la colonne d'eau (Lage *et al.* 1996), a été décrite au travers du Biotic Ligand Model (Di Toro *et al.* 2001, Heijerick *et al.* 2002 *in* Morin, 2006). Les approches mathématiques visant à modéliser le transfert des espèces métalliques hydrophiles vers l'intérieur de la cellule montrent qu'il dépend vraisemblablement de deux mécanismes principaux (Campbell *et* Couillard, 2004 *in* Marie, 2005) (Fig. 2 et 3) : une diffusion passive (sous contrôle thermodynamique) au travers de la membrane plasmique combinée à un transport actif occasionnel des métaux, liés à de la matière organique de faible poids moléculaire (Hudson 2005 *in* Morin, 2006). Ce dernier processus implique une phase de fixation préalable des espèces métalliques à la surface de la cellule, généralement rapide, suivie de la formation d'un complexe de surface noté M-X-cell.

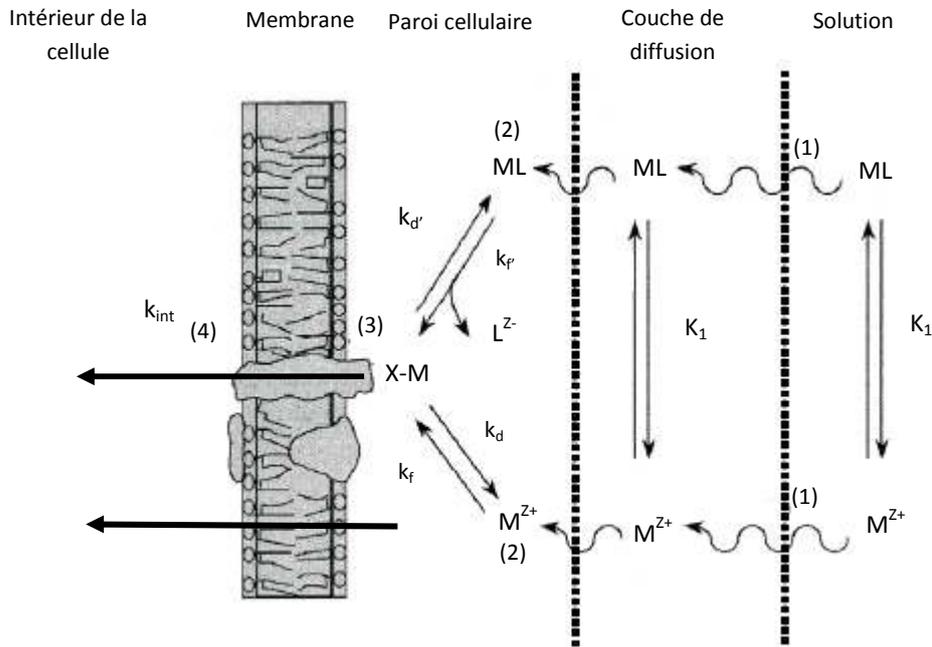


Fig. 2: Modèle conceptuel des interactions entre les métaux et les organismes aquatiques (Source Campbell et Couillard, 2004 *in* Marie, 2005).

Légende:

MZ+: ion métallique libre; ML: complexe métallique en solution; M-X-Membrane: complexe métallique de surface; K1: constante d'équilibre pour la formation de l'espèce ML; Kf, Kf': constantes d'équilibre de formation du complexe de surface; Kd, Kd': constantes d'équilibre de dissociation du complexe de surface; Kint: constante de vitesse pour l'assimilation du métal. Les charges sur les complexes ne sont pas indiquées.

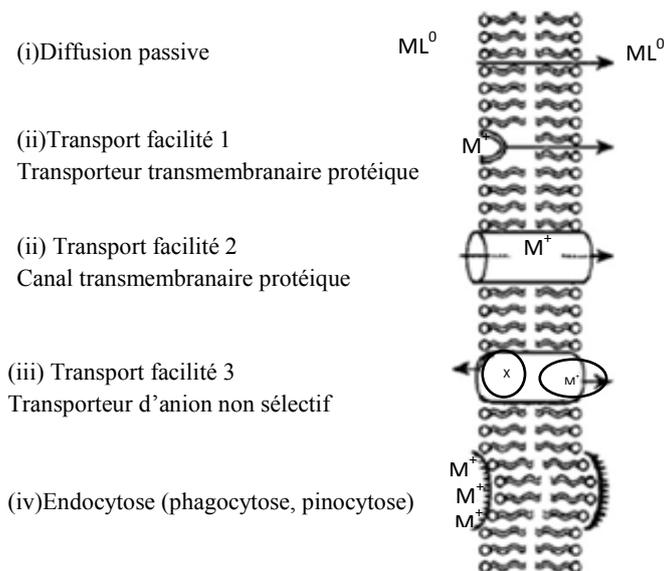


Fig. 3 : Mécanismes membranaires permettant l'entrée des ions métalliques M^{+} dans la cellule (Simkiss et Taylor, 1989, modifié *in* Marie, 2005).

Chapitre II

Biomarqueurs de stress chez les bivalves

II. 1. Ecotoxicologie : Définition

Le terme "écotoxicologie" a été introduit par Truhaut en 1969 (*in* Bouchard, 2008) et était dérivé des mots "écologie" et "toxicologie". Jusque-là, les études de toxicologie environnementales concernaient principalement les effets néfastes des toxiques sur l'homme. L'écotoxicologie prend ainsi en compte les effets des produits chimiques dans le contexte de l'écologie. On peut donc définir l'écotoxicologie comme un outil pour l'étude des effets néfastes des contaminants chimiques sur les écosystèmes en intégrant les impacts aussi bien sur les individus que sur la population (Walker *et al.*, 2006 *in* Bouchard, 2008).

II. 2 .Biomarqueurs : Définition

L'une des nombreuses définitions proposées du biomarqueur est celle d'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 » (Lagadic *et al.*, 1997 ; Depledge *et al.*, 1994 ; Garric *et al.*, 2010).

Le besoin de méthodes d'évaluation de l'imprégnation chimique des milieux et de leur qualité écologique pour la mise en œuvre de mesures prédictives du risque toxique pour l'environnement et l'homme, entraîne un regain d'intérêt pour les biomarqueurs en tant qu'outils d'aide au diagnostic de contamination et à la gestion du risque toxique (Galloway *et al.*, 2004a ; Hagger *et al.*, 2006). Ainsi, le biomarqueur mesuré sur un organisme (au niveau infra-cellulaire, cellulaire ou tissulaire) peut être interprété comme une réponse adaptative à un stress, telle qu'une pression toxique, ou encore comme un signal d'alerte d'apparition ultérieure de perturbations du fonctionnement de l'organisme, voire de sa population. Cependant le stress chimique n'est pas l'unique cause de modifications biologiques chez un organisme vivant. Son environnement tel que l'habitat, la nourriture, la prédation, le parasitisme, ou même sa dynamique de développement provoquent des réponses biologiques d'adaptation. Ainsi le passage de l'état larvaire à l'état juvénile, l'acquisition de la maturité sexuelle, le statut reproducteur, la sénescence, ou encore la maturité (âge) des communautés de producteurs primaires jouent un rôle dans ces processus.

De ce fait, la mise en œuvre de biomarqueurs et l'interprétation que l'on en fera, en termes de relation cause (chimique)-effet, ou de pronostic de risque écologique, seront plus ou moins pertinentes selon les connaissances disponibles sur l'organisme sur lequel les mesures seront effectuées.

II. 3. Biosurveillance et Biomarqueurs en écotoxicologie

Les outils de surveillance de la qualité environnementale s'inscrivent dans deux approches complémentaires : le contrôle analytique de paramètres physico-chimiques, et la mise en œuvre de méthodes d'observation et/ou de quantification de paramètres biologiques (Amiard *et al.*, 1998). Cette dernière, la biosurveillance, présente l'avantage de rendre compte de la biodisponibilité des polluants *in situ* (Forbes, 2006). Contrairement aux mesures physico-chimiques, la biosurveillance permet d'évaluer les effets intégrés dans le temps de la présence de l'ensemble des contaminants et autres facteurs de stress dans le milieu naturel, à plus ou moins long terme (Amiard *et al.*, 1998). Elle s'effectue à différents niveaux d'organisation (fig.4), allant de la communauté (utilisation d'indices biocénotiques) jusqu'aux niveaux individuels et infraindividuels (recours aux biomarqueurs). Les études peuvent concerner les populations naturellement présentes sur le site (biosurveillance passive) ou des populations transplantées d'une localité considérée comme référence sur les différents sites étudiés (biosurveillance active).

Les modifications provoquées par un contaminant sur la biologie d'un animal, que ce soit au niveau moléculaire, cellulaire ou physiologique, peut altérer sa santé ou sa reproduction. Une exposition suffisamment importante (par la dose ou la durée d'exposition), peut conduire à diminuer l'abondance de l'espèce localement, voire mené à la disparition de la population. Or, si cette espèce joue un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème local, c'est toute la biocénose qui peut être affectée par le contaminant. Il y a donc un grand intérêt à connaître quelles sont les cibles physiologiques des toxiques, et leur importance dans le maintien de l'homéostasie des individus : un impact au niveau moléculaire peut avoir des répercussions sur un écosystème entier.

Dans ce contexte, les chercheurs en toxicologie de l'environnement ont développé des indicateurs qui permettent de mesurer les perturbations de paramètre physiologique précis. Les biomarqueurs sont ainsi définis comme les changements structuraux ou fonctionnels observables et mesurables qui apparaissent après pénétration de substances polluantes dans l'organisme (Lagadic *et al.*, 1997).

Les biomarqueurs permettent donc de détecter les changements précoces provoqués par un toxique sur une espèce sentinelle. Ces changements d'ordre génétique, enzymatique, histologique ou fonctionnel, permettent de prédire les conséquences sur la santé de l'individu et, par extension, de l'écosystème (Fig. 4).

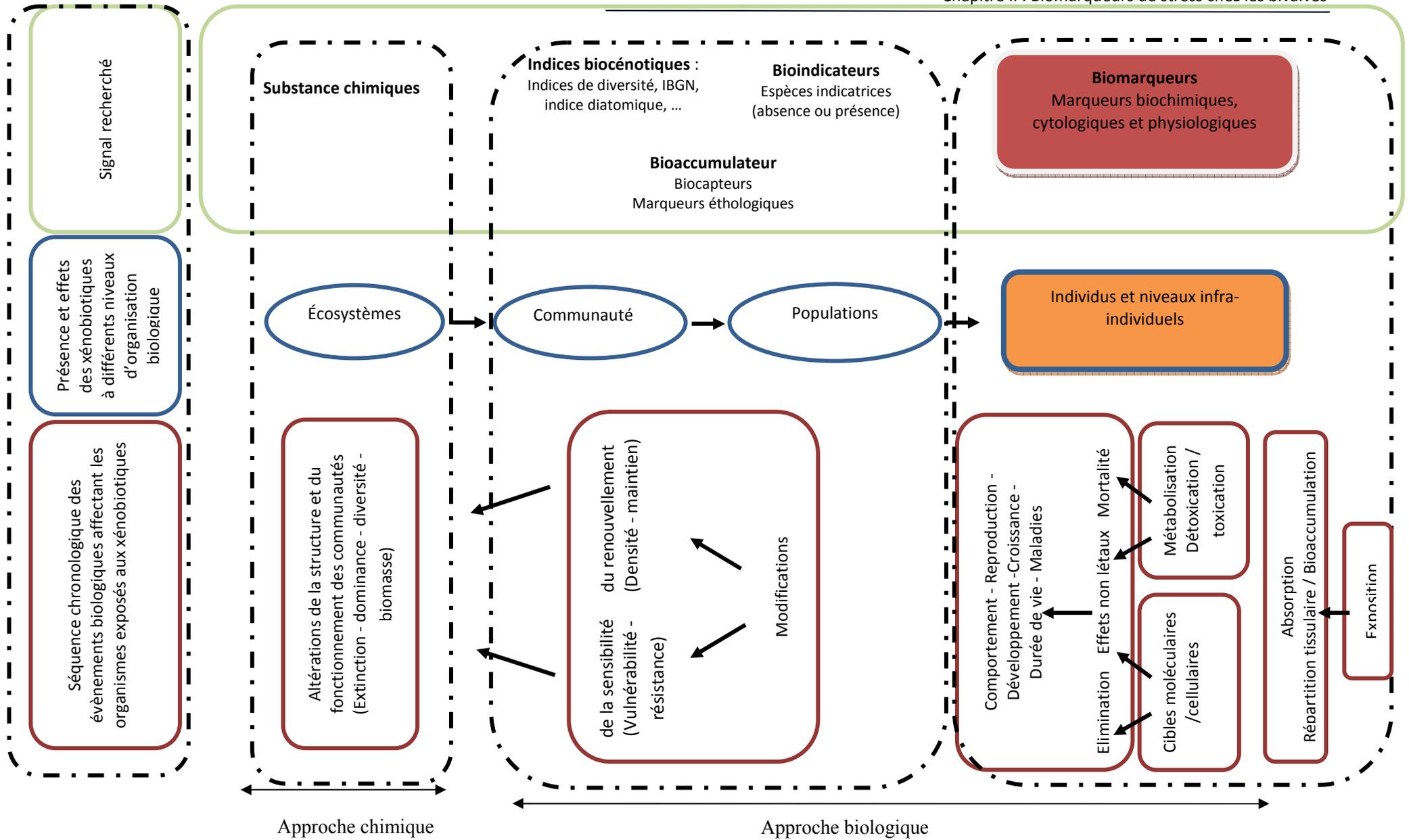


Fig. 4 : Evaluation de la qualité de l'environnement par une approche globale-chimique et biologique (d'après Lagadic et Caquet, 1996).

Le rôle fonctionnel des biomarqueurs entre en considération dans certaines des classifications qui leur sont attribuées. Le Tableau 1 présente les deux types de classifications des biomarqueurs les plus souvent citées parmi celles qui figurent dans la littérature (Guerlet, 2007).

Tab. 1 : Classification des biomarqueurs.

Catégories	descriptions	exemples	Références
BM d'exposition à un xénobiotique	Témoin de la pénétration du polluant dans l'organisme, souvent le résultat d'une interaction polluant / molécules biologiques dans les tissus ou fluides corporels	Conjugaison au GSH, formation d'adduits à l'ADN, induction des MT	Cajaraville et <i>al.</i> , 2000; Lagadic et <i>al.</i> , (1997); NAS/NRC, (1989)
BM d'effet	Témoin de l'amplitude d'un effet, toxique ou non, sur une cible critique, après entrée et distribution du xénobiotique dans l'organisme (=BM de stress général+BM spécifiques d'une classe de xénobiotiques)	Cassures à l'ADN, enzymes du stress oxydant , Réponses lysosomales	
BM de sensibilité	Témoin de variations génétiques de la réponse à la contamination par les polluants. Lorsque cette sensibilité est faible, après sélection par des molécules toxiques : BM de résistance	Augmentation de la quantité de GST, baisse de sensibilité des AChE (résistance aux insecticides)	
BM de défense	Réaction de défense d'un organisme exposé à un contaminant	Induction des MT ou de l'activité EROD	(de Lafontaine et <i>al.</i> , 2000)
BM de dommages	Altération directe causée à l'organisme par les contaminants toxiques	Cassures à l'ADN, produits de la LPO, niveaux de VG	

Abréviations : AChE : acétylcholinestérases ; BM : biomarqueur ; EROD : activité 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase ; GSH : glutathion ; GST : glutathion S-transférases ; LPO : lipoperoxydation ; MT : métallothionéines ; VG : protéines de type vitellogénine.

II. 4. Réponses biochimiques aux stress

La présence de polluants dans l'organisme constitue donc un stress qui induit des modifications au niveau physiologique et métabolique (Timbrell, 1994), la réponse est constituée d'une part de mécanismes limitant les effets toxiques des contaminants en protégeant les cellules et en facilitant leur excrétion, d'autre part de modifications des métabolisme et physiologie normaux, induites directement par les toxiques, ou collatéralement par les mécanismes de prise en charge. Les mécanismes protecteurs et de métabolisation des xénobiotiques sont déjà largement étudiés mais des connaissances approfondies sur les régulations de ces systèmes face aux stress multiples, anthropiques et naturels, que rencontrent les organismes dans l'environnement sont toujours d'actualité.

II. 4. 1. Protéines de stress

L'exposition aux polluants, mais également à divers stress exogènes, induit chez les organismes aquatiques et terrestres l'expression de diverses familles de protéines regroupées sous le terme de protéines de stress. Elles interviennent dans la réparation et/ou l'élimination de composés cellulaires endommagés et dans l'atténuation du stress.

Il existe différentes catégories de protéines de stress, dont le poids moléculaire varie entre 15 à 110kDa.

On trouve parmi elles les HSP (*Heat Shock Proteins*), ainsi que les GRP (*Glucose Regulated Proteins*) et d'un point de vue large, les ubiquitines et protéases. Face à un stress thermique les HSP, au-delà du rôle de maintenance de l'homéostasie des protéines, confèrent aux cellules une thermotolérance après une pré-exposition hyperthermique sublétales (Li et Werb, 1982 in Letendre, 2009). La synthèse de protéines sous l'induction d'un stress thermique a été mise en évidence sur des drosophiles en 1974 (Tissières *et al.*, 1974 in Letendre, 2009). D'autres stress, tels l'anoxie (Prentice *et al.*, 2004), le stress oxydant (Aucoin *et al.*, 1995 in Letendre, 2009), l'exposition à des composés chimiques et métalliques (Bauman *et al.*, 1993 ; Mirkes *et al.*, 1994), la variation de la salinité environnementale (Deane *et al.*, 2002) et les rayonnements ionisants (Sierra-Rivera *et al.*, 1993) induisent la synthèse de protéines.

D'autres protéines comme les métallothionéines (MT), famille de molécules de petite taille riches en cystéines et en métaux, leurs synthèses sont induites par les métaux, ainsi que divers stress. Ils jouent un rôle dans la fixation des métaux essentiels dans la cellule (zinc et cuivre), le contrôle des concentrations des formes ioniques libres de ces métaux et de leur destination dans la cellule, la détoxification de métaux non-essentiels (cadmium et mercure) et dans la

limitation des effets toxiques qu'ils peuvent induire (Kägi et Schäffer, 1988). Elles sont capables pour cela, selon leur spécificité, de se lier temporairement à divers métaux grâce à des sites de fixation contenant des séquences cys-x-cys, dont les distributions et fréquences conditionnent la formation de complexes métal-sulfure (Vasak, 1986). L'expression des métallothionéines peut également être induite par d'autres types de stimulation (choc thermique, stress oxydant, hormones, ...) (Bauman *et al.*, 1993). L'induction par des oxydants et pro-oxydants semble liée au rôle protecteur des métallothionéines contre le stress oxydant mis en évidence dans de nombreuses études (Viarengo *et al.*, 2000). Dans le contexte d'utilisation comme biomarqueur d'exposition à des métaux, ces aspects peuvent interférer avec la réponse à la concentration métallique propre (Burgess *et al.*, 1993). Les niveaux d'induction dépendants de la nature du métal et les effets synergiques que la présence de métaux différents peuvent générer sont également des éléments à prendre en compte dans l'approche écotoxicologique (Cosson, 1994 ; Petering *et al.*, 1984 *in* Letendre, 2009).

La présence de xénobiotiques dans l'organisme induit l'expression d'une troisième catégorie de protéines : les MXR ou *multixenobiotic resistant* qui attribuent aux cellules, comme leur nom l'indique, une résistance aux effets toxiques d'un grand nombre de composés chimiques par leur pompage actif en dehors de la cellule. Plus précisément, l'activité MXR correspond à l'activité ATP-dépendante de protéines membranaires équivalentes aux P-glycoprotéines (P-gp) connues dans le mécanisme comparable de *multidrug resistance* (MDR) mis en évidence dans des lignées de cellules cancéreuses résistantes au traitement chimique (Endicott et Ling, 1989 *in* Letendre, 2009). Les MXR peuvent transporter en dehors de la cellule une grande variété de composés chimiques et naturels, qui ont pour propriétés physiques communes une relative hydrophobicité, un faible poids moléculaire et une configuration spatiale plane (Bard, 2000).

II. 5. Les indicateurs de stress oxydatif

Bien que la consommation d'oxygène soit indispensable à toute forme de vie aérobie, elle entraîne également la formation de composés réactifs - les espèces activées de l'oxygène (EAO) - pouvant exercer de multiples effets délétères sur les composants cellulaires. Les EAO sont produites naturellement, soit de manière «accidentelle» par les monooxygénases à cytochrome P450, les chaînes mitochondriales transporteuses d'électrons, *via* l'auto-oxydation de certaines molécules (la plupart du temps catalysée par des ions métalliques de transition), soit de manière «délibérée» par des phagocytes activés, des lymphocytes, des fibroblastes, *etc.* (Halliwell et Cross, 1994). Des facteurs exogènes peuvent également initier

la synthèse d'EAO: les radiations ionisantes et certains xénobiotiques dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Lemaire et Livingstone, 1993) et les métaux lourds.

L'organisme possède naturellement des systèmes de défense antioxydante lui permettant de piéger ou d'inactiver ces EAO. Cependant, dans certaines conditions ces systèmes ne sont pas suffisants. Ainsi, lorsque l'équilibre entre les forces prooxydantes et les défenses antioxydantes est rompu, les cellules subissent un stress oxydatif.

II.5. 1. Principales espèces activées de l'oxygène (EAO)

Les EAO incluent des formes radicalaires (radicaux libres) correspondant à des structures mono- ou poly-atomiques indépendantes possédant un ou plusieurs électrons non apparié(s) isolé(s) sur une orbitale externe, mais également des formes non radicalaires (Halliwell et Cross, 1994). Les EAO sont formé naturellement à partir de l'oxygène moléculaire chez les organismes aérobies (Fig. 5).

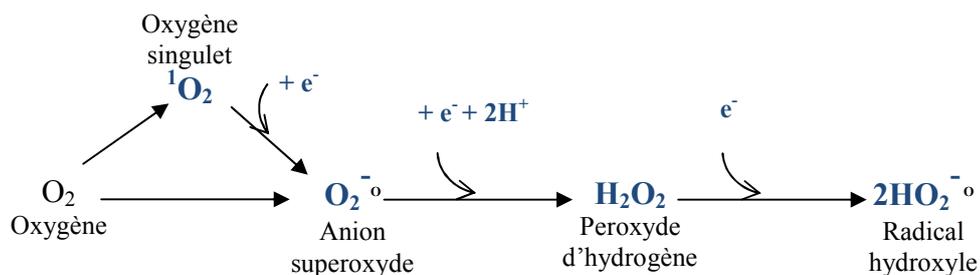
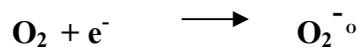


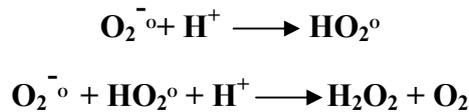
Fig. 5 : Chaîne de formation des Espèces Activées de l'Oxygène (EAO) à partir de l'oxygène moléculaire chez les organismes aérobies.

Anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$) : résulte de la réduction monoélectronique de l'oxygène moléculaire:



Il est produit au cours de réactions enzymatiques (monooxygénases à cytochrome P450, *etc.*), lors du transport d'électrons dans la chaîne respiratoire et sous l'action de facteurs environnementaux ou certains xénobiotiques (Sies et Cadenas, 1983 *in* Vidal, 2001). En solution aqueuse, l'anion superoxyde se comporte comme un faible agent oxydant capable d'oxyder l'acide ascorbique ou des thiols. Par contre, c'est un fort agent réducteur pouvant réduire certains complexes de métaux. Ces réactions peuvent donner lieu à sa dismutation en générant de l'oxygène moléculaire et une autre espèce réactive (mais non radicalaire) : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Exemple de réaction conduisant à la formation de peroxyde d'hydrogène: dismutation spontanée de l'anion superoxyde:

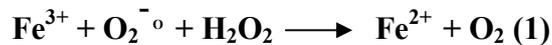


Le peroxyde d'hydrogène est un faible agent oxydant relativement stable en l'absence de métaux de transition libres. Il est faiblement réactif à de faibles concentrations.

Par contre, il peut inactiver certaines enzymes à de fortes concentrations. Il peut également conduire à la formation du radical hydroxyle ($^\circ\text{OH}$) en réagissant avec l'anion superoxyde selon la réaction d'HaberWeiss (Haber et Weiss, 1934 *in* Vidal, 2001):



Bien que thermodynamiquement favorable, cette réaction est très lente (Halliwell, 1978 *in* Vidal, 2001). Par contre, la production du radical hydroxyle peut devenir significative en présence de métaux de transition tels que le fer ou le cuivre *via* les deux réactions suivantes:



La seconde réaction est dite réaction de Fenton (Walling, 1975 *in* Vidal, 2001). La somme des deux réactions correspond à la réaction d'Haber -Weiss. Le radical hydroxyle est une espèce hautement réactive pouvant attaquer la plupart des molécules biologiques dont les protéines, les lipides et les acides nucléiques.

II.5. 2. Principaux systèmes de défense antioxydants :

Les principaux systèmes de défense antioxydants ont été mis en évidence chez les invertébrés aquatiques (Lemaire et Livingstone, 1993). En particulier, chez la moule *Mytilus edulis*, l'activité catalase (CAT) est principalement peroxysomiale, l'activité superoxyde dismutase SOD est cytosolique (SOD à cuivre et zinc) et mitochondriale (SOD à manganèse) et les activités de glutathion peroxydase (GPXs sélénium-dépendante et sélénium-indépendante) sont principalement cytosoliques (Livingstone et *al.*, 1990). Les activités CAT, SOD et GPX

sélénium-dépendante sont plus importantes dans la glande digestive que dans les branchies ou les tissus musculaires (Gamble *et al.*, 1995). De nombreuses études réalisées en laboratoire et sur le terrain, concernant les défenses anti-oxydantes et les enzymes détoxifiantes chez *Mytilus edulis*, montrent généralement des corrélations directes entre les défenses anti-oxydantes, les enzymes détoxifiantes, les dommages occasionnés sur les biomolécules et les xénobiotiques (Viarengo *et al.*, 1990; Lemaire et Livingstone, 1993) mais aussi des corrélations avec les saisons (Vidal *et al.*, 2002).

Plusieurs mécanismes de défense existent, enzymatiques et non-enzymatiques (fig. 6).

II. 5. 2. 1. Catalase (CAT) :

Avec un atome de fer par sous-unité, les catalases ont une masse d'environ 60KDa (*in* Letendre, 2009). Chez les mammifères la masse molaire est d'environ 240kDa (Fita et Rossmann, 1985 *in* Bigot, 2009) Elles catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène moléculaire. Par leurs actions réductrices du peroxyde d'hydrogène les catalases, enzymes peroxysomales, préviennent les peroxydations des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée. Les catalases sont présentes dans tout le règne animal et se retrouvent aussi chez les végétaux. Elles sont sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydatif au niveau des membranes cellulaires, comme les HAP, PCB ou certains pesticides (Livingstone, 1993) et les métaux (Labrot *et al.*, 1996). plusieurs travaux relèvent l'augmentation de l'activité catalase chez des poissons et des bivalves exposés à des polluants organiques (HAP, PCB, pesticides et engrais chimiques) (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1993; Cossu *et al.*, 1997). Par ailleurs, les travaux effectués sur les biomarqueurs de stress oxydant en laboratoire et surtout *in situ* montrent que le caractère non spécifique de leur réponse constitue un avantage comme indicateur d'un état de pollution mixte (Cossu *et al.*, 1997).

Le peroxyde d'hydrogène produit par les SODs doit être rapidement métabolisé par la catalase et la glutathion peroxydase pour que la protection apportée par les SODs soit effective (Michiels *et al.* 1994; Rahman *et al.* 2006 *in* Nzengue Y., 2008), sinon, l'accumulation de H₂O₂ peut être nocive.

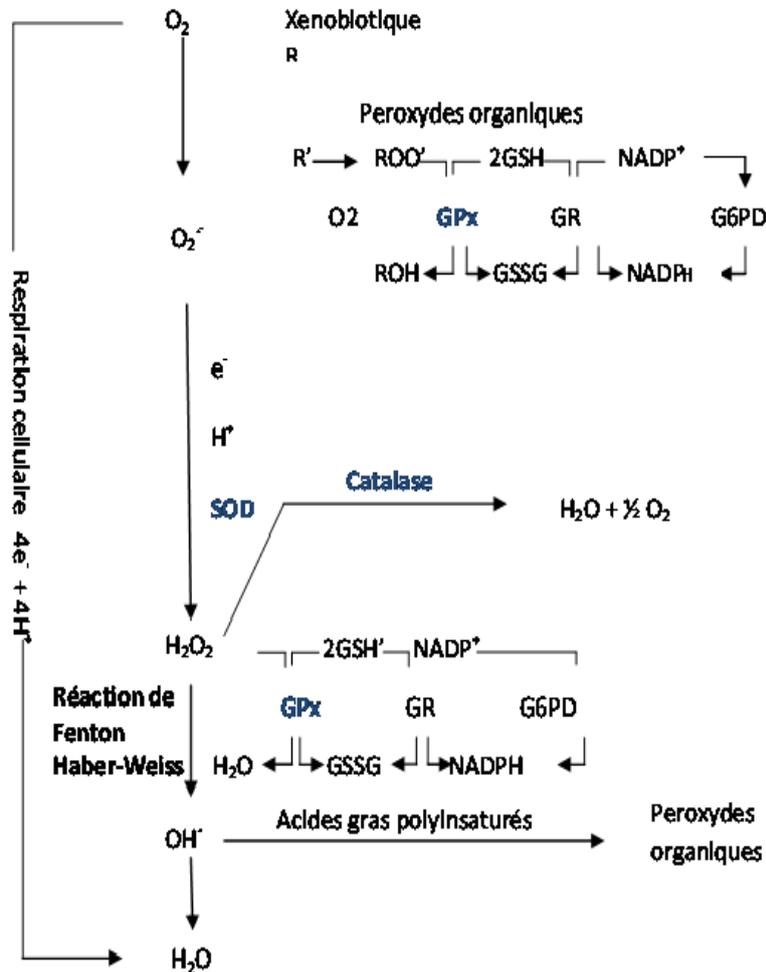
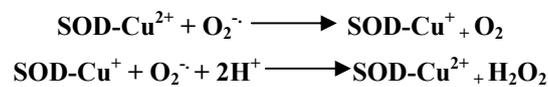
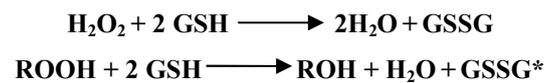


Fig. 6 : Intervention des systèmes antioxydants dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules animales (in Sanchez, 2007)

SOD (SuperOxyde Dismutase):



Le peroxyde d'hydrogène peut également être transformé en eau moléculaire par certaines **GPXs** (glutathion peroxydase). Les deux réactions catalysées par les GPX sont les suivantes:



*GSSG: glutathion oxydé.

CAT (Catalase) :



II. 6. Stress oxydatif chez les mollusques marins et l'évaluation environnemental

Les indices de stress chez les mollusques marins sont nombreux et répondent à une préoccupation grandissante au sein de la communauté scientifique. Utilisée comme modèle d'étude, ils ont permis la mise en évidence de biomarqueurs de la pollution environnementale. Ainsi, Borcovic *et al.* (2005) et Meknachi (2010) ont montré que la production d'enzymes antioxydantes chez la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* était influencée par la présence de polluants dans l'environnement. Rappelant aussi que la moule a été proposée au cours des années 70 pour l'évaluation des niveaux et des tendances de la contamination chimique des eaux côtières (Goldberg, 1975), notamment dans le cadre du « Mussel Watch » américain et du Réseau d'Observation de la Qualité du Milieu Marin (RNO) français (Cossa *et al.*, 1998).

Chez *Mytilus galloprovincialis*, le stress oxydatif, induit par les radicaux libres entraîne la formation de malondialdéhyde (MDA) dans la glande digestive, les branchies et le manteau et des concentrations importantes de glutathion dans le manteau. Le malondialdéhyde est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés.

Pellerin *et al.*, (2007) dans leurs travaux n'observent pas de différences de distribution des molécules de défense selon le sexe chez *Mytilus galloprovincialis*.

Viarengo *et al.* (1990) observent une augmentation de la peroxydation lipidique dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* exposés à Cu (40 µg l⁻¹ Ind⁻¹) durant six jours. La même observation est formulée par Torres *et al.* (2002) chez *Mytella guyanensis* exposé à des concentrations élevées de Cu et Mn (Tab. 2).

Certains auteurs (Viarengo *et al.*, 1990 ; Cossu *et al.*, 1997) rapportent, chez le mollusque d'eau douce *Unio tumidus* exposé à des polluants (hydrocarbures aromatiques polycycliques et métaux), que la diminution du glutathion est associée à celle des activités enzymatiques de la glutathion peroxydase dépendant du sélénium et de la glutathion réductase, suggérant ainsi une déficience de la défense anti-oxydante. Ces auteurs suggèrent que ces paramètres, telle que la diminution du glutathion, soient considérés comme des biomarqueurs de dommage.

Viarengo *et al.* (1991), indiquent nettement chez *Mytilus edulis* L. que les processus de peroxydation des lipides sont plus importants chez les moules plus âgées, la GSH et la vitamine E étant présentes en concentrations moins grandes chez les moules plus âgées. Sensiblement influencées par l'âge les individus de plus de 10 ans ont des capacités antioxydants significativement plus faibles, ce qui explique un taux de lipoperoxydation plus élevé. Dans le même registre les travaux de Livingstone *et al.*, (1990) démontrent que les

capacités de défense anti-oxydante chez *Mytilus edulis* peuvent être influencées par une variété de facteurs tels l'âge, le niveau de nutrition, les variations de facteurs abiotiques, l'état de contamination de l'environnement.

Di Giulio *et al.*, (1989 in Aarab, 2004) observent une réduction de la catalase *in vivo* chez les organismes aquatiques, par contre une inhibition est observée par Labrot *et al.* (1996). Une des hypothèses retenue est que cette activité enzymatique serait très sensible aux facteurs environnementaux d'origine anthropique ou naturelle (Pellerin-Massicote, 1994 in Aarab, 2004), corroborée par les résultats obtenus par Pellerin-Massicotte *et al.* (1997), observant une induction de l'activité catalase dans un endroit non pollué qui pourrait être due à un stress physiologique comme une répétition de la ponte. Selon ces auteurs, la catalase pourrait être sensible à des variations subtiles des conditions environnementales, alors que le MDA serait plus représentatif d'une condition de stress non compensée par les forces anti-oxydantes.

Chez *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* les activités antioxydantes dans la glande digestive sont influencées par la teneur en oxygène, les facteurs climatiques et physiologiques. Ainsi de faibles conditions d'oxygénation temporaire, provoquée expérimentalement, provoque une diminution des activités antioxydantes et de la lipoperoxydation (Viarengo *et al.*, 1989). La ponte chez *Mytilus galloprovincialis* entraîne une augmentation des activités antioxydantes en mars-avril, suivie d'une diminution progressive au printemps alors que la disponibilité en nourriture et la température augmentent (Solé *et al.*, 1995 in Letendre, 2009). Les modifications de l'activité des enzymes antioxydantes en fonction de la saison sont observées chez de nombreux bivalves. Santovito *et al.* (2005) observent un maximum d'activité chez *Mytilus galloprovincialis* le mois de février et novembre de la SOD, CAT et GPx au niveau des branchies et de la glande digestive, le minimum d'activité est observé le mois de mai et août. L'augmentation de la demande en oxygène entraîne une activité enzymatique antioxydante (SOD, CAT, GPx) importante. Au niveau des branchies, une diminution de la température de l'eau en février et novembre entraîne une hausse de la respiration et donc l'augmentation des EAO. Dans les glandes digestives les activités enzymes varient avec le statut physiologique (reproduction et disponibilité nourriture) (Tab. 3).

Aussi, certaines sources de stress peuvent causer des modifications de la structure des populations par une mortalité différentielle. C'est par exemple le cas des mortalités estivales, observées à partir des années 80 chez l'huître *Crassostrea gigas* sur la côte atlantique française, particulièrement en été. La cause est imputée à une combinaison des plusieurs facteurs environnementaux et biologiques.

Pellerin-Massicotte (1997) observe chez le pétoncle d'antarctique transplanté d'un site sain et soumis dans un autres site aux effluents domestiques d'une station d'observation en Antarctique a entraîné des diminutions importantes des activités catalasiques et des glutathion-S-transférases. Ceci indique sans conteste une perte des propriétés antioxydantes du pétoncle, contrairement à d'autres résultats qui démontraient la capacité de moules à capter le surplus de production des espèces réactives de l'oxygène, par une augmentation de l'activité catalasique. Ces résultats sur le pétoncle viennent renforcer certaines observations sur la perte de la capacité immunitaire des bivalves en réponse à une exposition aux métaux (Sauvé *et al.*, 2002).

Pellerin-Massicotte (1997) observe aussi chez la moule bleue qu'en milieu naturel les processus oxydants sont induits par des températures plus froides. Chez la même espèce les températures chaudes estivales et les variations de salinité tout au long de l'exposition en mésocosmes n'ont pas induit de production de radicaux libres. Chez *Mya arenaria*, on observe une corrélation significative entre la réponse de la catalase et les changements de salinité et de température, autant en milieu naturel qu'en mésocosmes.

Plusieurs auteurs ont travaillé sur l'activité des enzymes antioxydantes lors d'une contamination de bivalves par le cadmium (Prakash et Rao, 1995 ; Regoli *et al.*, 1998) mais aucune « règle » quant à l'action du cadmium sur l'activité de ces enzymes n'a pu être dégagée. Chez la moule *Perna viridis* une exposition au cadmium s'accompagne d'une augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes comme le superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase dans le manteau (Prakash et Rao, 1995). Il en est de même chez la telline *Macoma balthica* soumise à une exposition polymétallique, cependant une augmentation de l'activité de la catalase n'est pas observée (Regoli *et al.*, 1998). A l'inverse, chez la moule des sources hydrothermales (*Bathymodiolus azoricus*), une exposition au cadmium provoque une diminution de l'activité de la catalase et de la glutathion peroxydase et d'autre part une augmentation de la peroxydation lipidique dans les branchies (Company *et al.*, 2004). Une inhibition de la glutathion peroxydase est observée dans les branchies de la palourde *Ruditapes decussatus* exposée au cadmium (Geret *et al.*, 2002 in Achards-Joris, 2005).

Sifi *et al.* (2007) indiquent une augmentation de l'activité spécifique de la GST chez des individus de *Donax trunculus* (L., 1758) de Sidi Salem dans le golfe d'Annaba. Les auteurs expliquent cette augmentation par une forte activité de détoxification de l'organisme par la GST liée à une exposition à un milieu pollué tel que Sidi Salem. Des résultats similaires sont observés par Khati *et al.* (2007) chez *Perna perna* sous l'effet du Cd issu du Golf de Annaba.

Sous l'influence des facteurs abiotiques du lac El Mellah (El kala-Est Algérien), Khati et Nouacer (2006) observent les mêmes résultats chez la palourde *Ruditapes decussatus*. Aussi les métaux lourds tels le cuivre et le mercure ainsi que certaines substances organochlorées provoquent, d'après les données de la littérature, une modification de l'activité GST (augmentation) et du taux de GSH (diminution). En 2006 Abbes et *al.* observent des niveaux de réponse de l'acétylcholinestérase chez la palourde *Ruditapes decussatus* du lac El Mellah traduit probablement par une exposition à des agents polluants de type agents chimique ou bactériologiques, aux fluctuations spatio-temporelles et aux variations saisonnières des paramètres physico-chimiques du milieu et aux apports des oueds.

Tab. 2 : Modification de l'activité des enzymes anti oxydantes chez des organismes exposés au cadmium (Cd) ou au cuivre (Cu) : augmentation (↑), diminution (↓) par rapport aux témoins. GD : glande digestive, BR : branchies, h : heure, j : jour (Bigot, 2009).

Métaux	Concentrations	Temps	Organismes	Tissus	Réponses	Références
Cd	0,5 mg/L (CL50)	1, 7, 15, 30 j	<i>Perna viridis</i>	GD, BR, manteau	↑ SOD, CAT et GST SOD plus ↑ dans manteau, CAT et GST plus ↑ dans GD	Prakash et Rao, 1995
Cd	200 mg/L	7 j	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	GD	↑ MT (x10 par rapport au témoin), pas de variation de SOD, CAT, GSH	Viarengo et al., 1999
Cu	45µg/l	6 j	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Cellules	↑ MT-10h (x 7 par rapport au témoin), ↑ MT-20h (x 2 par rapport au témoin)	Dondero et al., 2005
Cu	40µg/l	6 à 72 h	<i>Mytilus edulis</i>	BR	Pas de variation de MT	Lemoine et Laulier, 2003
Cu	40µg/l	4 à 21 j	<i>Mytilus edulis</i>	BR, GD, manteau	Pas de variation de MT	Lemoine et al., 2000
Cd	0,9 mM	24 h	<i>Bathymodiolus azoricus</i>	BR	Inhibition SOD, CAT et GPx totaux. Pas de variation de Se-GPx	Company et al., 2004
Cu	0,4 µM				Inhibition SOD et CAT	

Tab. 3 : Modification d'activités des enzymes anti oxydantes en fonction de la saison chez des bivalves : augmentation (↑), diminution (↓). GD : glande digestive, BR : branchies, T° : température (Bigot, 2009).

Organismes	Tissus	Paramètres	Variations		Interprétation	Références
			Activité Max	Activité Min		
<i>Perna perna</i>	GD	SOD, CAT, GST	Mai, décembre		↑ T° et ↑ activité de reproduction donc ↑ consommation en O ₂ : génération de EAO	Wilhelm Filho et al., 2001
				Mars, septembre		
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	BR	SOD, CAT, GPx	Février, novembre	Mai, août	Dans BR : T° de l'eau baisse en février et novembre donc ↑ respiration et ↑ EAO Dans GD : activités enzymes varient avec le statut physiologique (reproduction et disponibilité nourriture) Quand ↑ de la demande en oxygène , ↑ activités de SOD, CAT, GPx	Santovito et al., 2005
	GD	CAT, GPx	Février, novembre	Mai, août		
		SOD	Février, novembre, mai	Août		
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	BR et manteau	SOD	Printemps	Été, automne et hiver	Activités de SOD et CAT plus élevées dans BR que dans Manteau	Vlahogianni et al., 2007
		CAT	Hiver et printemps	Été et automne		
<i>Mytilus sp</i>	GD	SOD, CAT	Été		↑ peroxydation lipidique durant l'hiver	Viarengo et al., 1991
				Hiver (novembre à mars)		
<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Crassostrea sp.</i>	GD	SOD, CAT	Juillet			Orbea et al., 2002
		GPx	Pas de variation	Février		
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Tissus mous	SOD, GST	Février		Plus forte sensibilité au stress oxydant pendant l'hiver	Manduzio GD et BR et al., 2004
				Mai		
		CAT	Mai		↑ activités métaboliques en relation avec ↑ T° (consommation O ₂) et l'activité reproductive	
				Février		

Partie expérimentale

Chapitre III

Matériels et méthodes

Les expériences menées pour caractériser les mécanismes de réponse précoce au stress oxydant chez la moule *Mytilus galloprovincialis* ont consisté à développer des approches complémentaires de terrain et de laboratoire.

A cet effet, une expérimentation de biosurveillance utilisant l'avantage et la possibilité de transplantation d'une population de moule au niveau des ports de pêche de Khemisti, de Bouharoun et de Gouraya est menée ainsi que des tests de toxicité au cuivre. Parallèlement aux mesures de biomarqueurs de stress (catalase) un suivi des paramètres physico-chimiques (T°C, pH, O₂ dissous) et biométrique sont réalisés. Le présent travail s'est étalé sur une durée de cinq mois, du mois de mars au mois de juillet. Les différentes expérimentations ont été conduites et réalisées dans les laboratoires du CNRDPA.

III. 1. Choix du matériel biologique : la moule *Mytilus galloprovincialis*

III.1. 1. Systématique

Embranchement :	Mollusca
Classe :	Bivalva (Linné, 1758)
Sous-classe :	Pteromorpha (Beurlen, 1944)
Ordre :	Filibranchia (B.B. Woodward, 1892)
Sous-ordre :	Anisomyaria
Super-Famille :	Mytiloidae (Rafinesque, 1815)
Famille :	Mytilidae (Rafinesque, 1815)
Genre :	<i>Mytilus</i> (Linné, 1758)
Espèce :	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarck, 1819)
Nom commun :	Moule méditerranéenne

III.1. 2. Répartition géographique

Les moules sont des animaux avec une très large répartition autour des continents. Elles constituent généralement une composante importante des écosystèmes marins littoraux. Leur biotope s'étend de la limite haute de l'étage médiolittoral supérieur jusqu'à des profondeurs de 6 à 9 m. La moule méditerranéenne, comme son nom l'indique, est principalement répartie dans cette région le long des côtes européennes et maghrébines. Elle se rencontre aussi sur les côtes atlantiques *i)* du sud de l'Irlande et la Cornouaille, *ii)* de l'Europe et de l'Afrique du Nord. Cette espèce cohabite avec *Mytilus edulis* en atlantique Nord jusqu'à la Manche (Lubet, 1973 ; Dradignac- Corbeil, 1976 in Barnabé, 1991) et avec *Perna perna* (Fig.7).

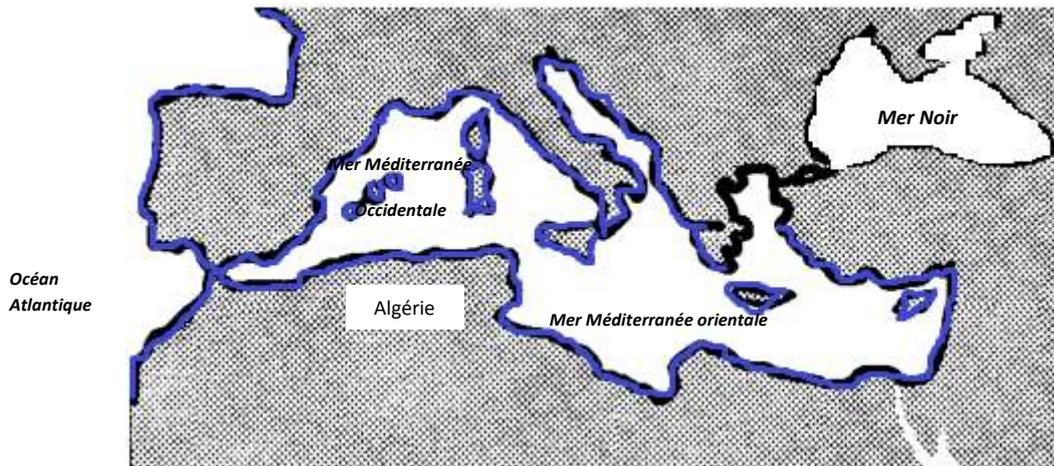


Fig. 7 : répartition géographique de la Moule *Mytilus galloprovincialis*

III.1. 3. Nourriture

La nourriture des moules est très diverse elle est à base de diatomées, dinoflagellés, bactéries, flagellés, protozoaires, divers spores, fragments d'algues et de débris inorganiques. L'eau contenant ces éléments est filtrée à travers les branchies (deux paires de feuillets hémibranchies) 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.

Le taux et la vitesse de filtration varient en fonction de l'âge, de facteurs internes (système neuroendocrine) et externes (conditions du milieu). Le volume d'eau filtré est de l'ordre de 40 et 100 ml par minute et par gramme de poids sec pour un individu d'une taille de 50 à 60 mm. La croissance des moules dépend de plusieurs paramètres biotiques et/ou abiotiques.

III.1. 4. Reproduction

La fécondation chez les moules est externe et a lieu en pleine eau. Les développements embryonnaires et larvaires se déroulent dans les dix premiers mètres de la zone littorale. Lors de la métamorphose, les larves se transforment en jeunes benthiques. Leur fixation a lieu souvent sur des algues filamenteuses.

Le cycle des moules est qualifié de pélogo-benthique dans la mesure où les larves sont planctoniques et les adultes fixés à un substrat. Les moules sont dioïques et matures vers l'âge d'un an, pour une durée de vie d'environ 10 ans. Les deux sexes expulsent les gamètes dans l'eau lors de la période de ponte. Cette période est légèrement variable selon la latitude car elle va du printemps à la fin de l'été et on observe parfois une ponte supplémentaire en automne. Elle est déclenchée par l'augmentation de la température et de la

disponibilité en nourriture, les blooms phytoplanctoniques permettant l'accumulation de réserves énergétiques et la maturation des gamètes.

Le corps de la moule est protégé par une coquille formée de deux valves égales (équivalve) de nature calcaire (carbonate de chaux), 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, délimites une cavité palléale qu'est remplie d'eau de mer. La moule est aussi constituée de pied, de byssus, de 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 (Fig. 8).

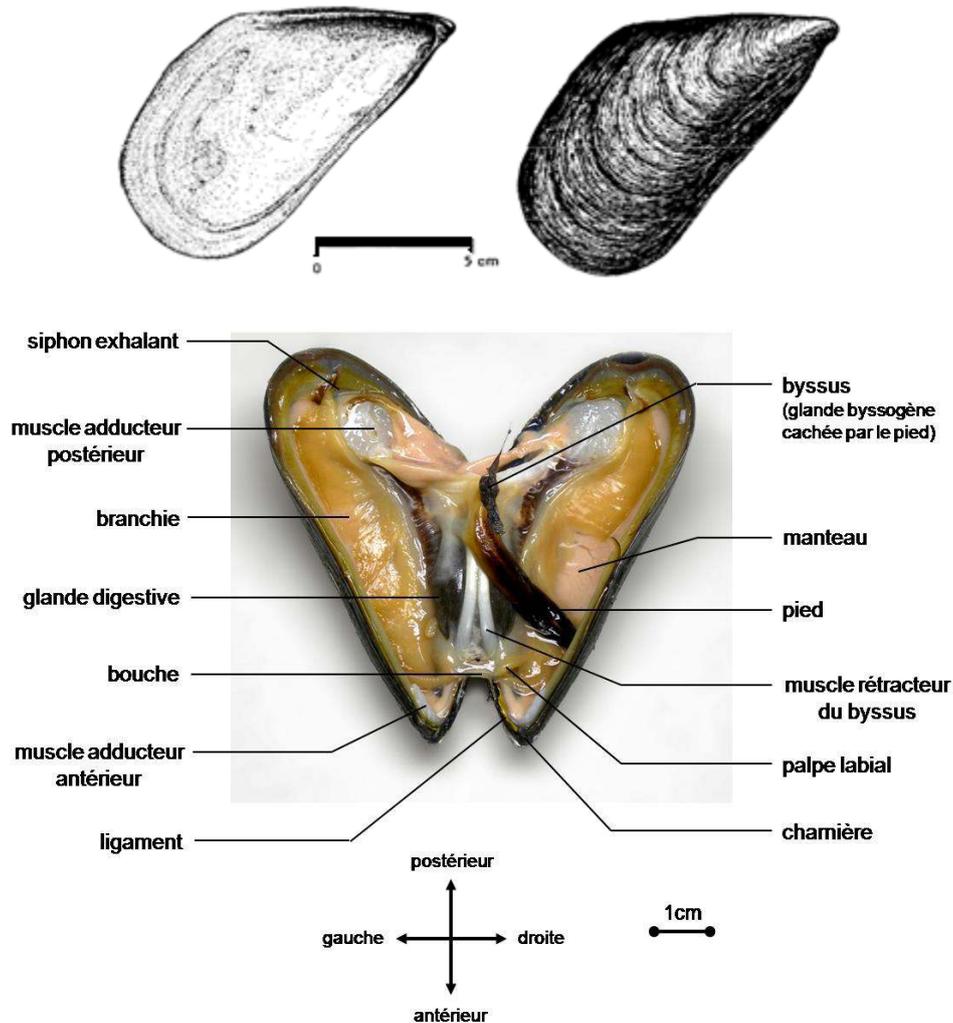


Fig. 8 : La moule *Mytilus galloprovincialis*.

III. 2. Avantage du modèle moule

En effet, ces bivalves présentent des caractéristiques qui en font d'eux de bons bioindicateurs en raison de :

- Leur large répartition géographique allant des régions tempérées aux régions subarctiques ;
- Leur mode de vie sessile et euryhalin ;
- Leur aptitude d'accumuler des métaux présents dans l'environnement avec un facteur de concentration de l'ordre de 10^3 à 10^5 par rapport à l'eau environnante ;
- La stabilité de leur population ;
- Leur tolérance aux divers stress ;
- La possibilité de les transplanter ;
- Vecteur de contamination par leur consommation par l'homme.

III. 3. Collecte des moules *Mytilus galloprovincialis*:

Une moulière naturelle, située au niveau de la baie de Bou ismail (Douaouda Marine), est utilisée pour l'approvisionnement en matériel biologique (Fig. 9).

Les moules, ainsi récoltées, sont transportés dans une glacière étanche et hermétique remplie d'eau de mer du milieu où elles vivaient et, une fois au laboratoire, elles sont rapidement transférées dans un aquarium rempli de cette même eau de mer filtrée et aérée, pour une phase de stabulation de 24 h afin de réduire l'effet du stress dû au transport.

1. Après mensuration, prise de poids et répartition en trois classes de tailles : [3, 4[, [4, 5[et [5, 6[cm, une partie des moules collectés est immédiatement traité et analysée.
2. Une seconde partie des moules répartie en trois classes de tailles subissent les tests suivants :
 - Les moules de la classes de taille [4, 5[cm font objet de tests de toxicité de trois jours au cuivre à 5, 15, 25 et 35µg de Cu²⁺/l suivi d'une phase de décontamination de 10 jours;
 - Les moules de la classes de taille [5, 6[cm ont subis une transplantation maximale de 30 jours au niveau du port de khemisti ;
 - Les moules de la classes de taille [3, 4[cm ont subis des transplantations simultanée au du port de Khemisti, Bouharoun et de Gouraya pour une durée maximale de 30 jours suivi une décontamination dans la région de Gouraya de 10 jours.

A chaque étape des tests réalisés, une pesée et une mensuration systématique des moules est faite. L'indice de condition est ainsi mesuré. Il représente 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, aussi bien que pour suivre les effets délétères de divers contaminants et/ou maladies. Il est généralement calculé de la façon suivante:

$$IC(\%) = \frac{\text{Poids de la masse viscérale + liquide palléal}}{\text{Poids total de la moule}} \times 100$$

III. 4. Expériences réalisées

III. 4. 1. Expérience de transplantation de moule (Expérience *In situ*)

La transplantation dans les sites impactés à savoir les ports de pêche de Khemisti, de Bouharoun et de Gouraya (Fig. 9) sont faite dans des filets de maille 28mm et de dimension 50 cm × 30 cm renfermant une quarantaine de moules. Cette poche est rigidifiée par deux tubes PVC de diamètre 40 mm fendus dans leurs longueurs et enfilés sur les parties supérieure et inférieure de la poche (Fig. 10)

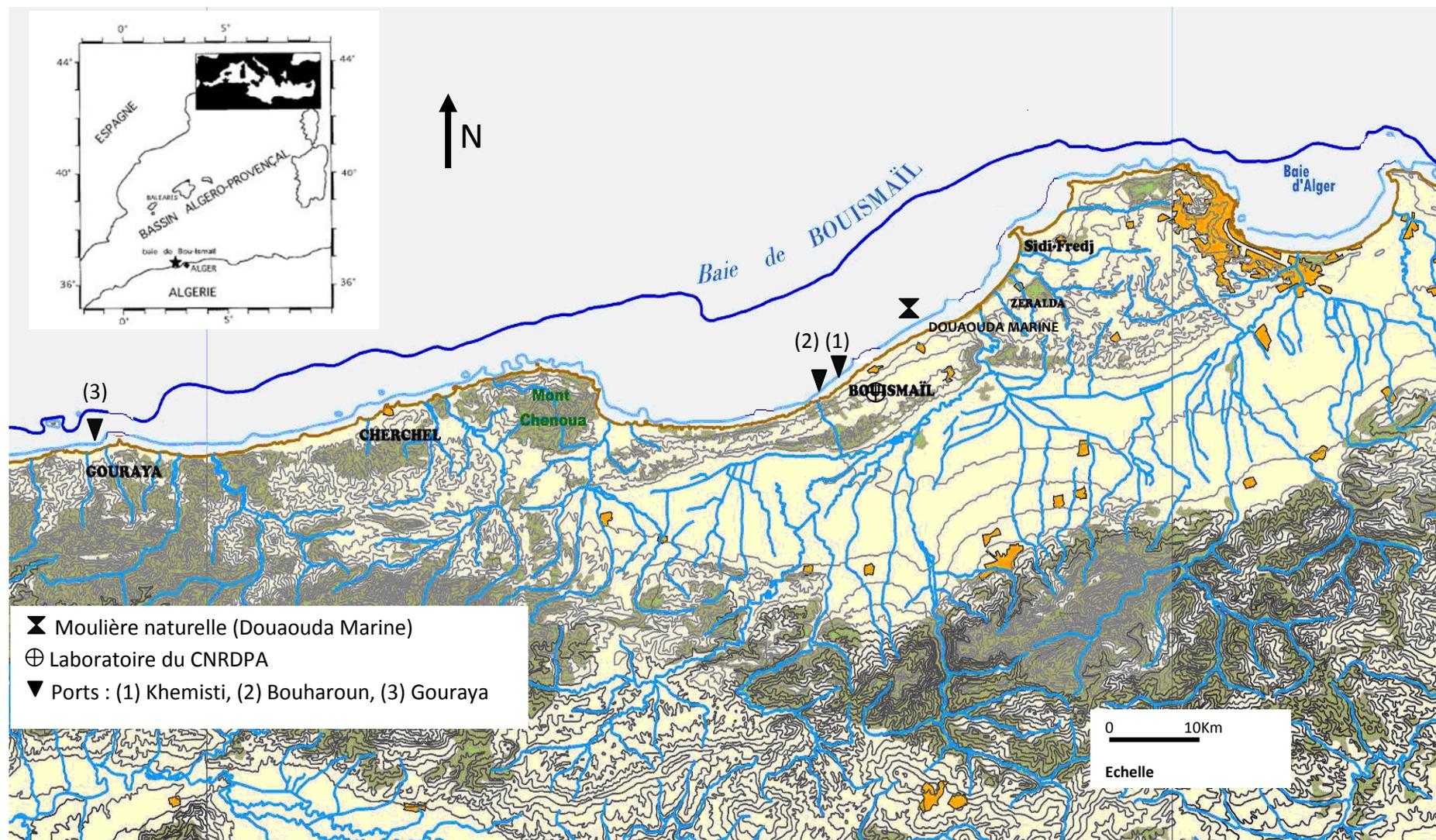


Fig. 9 : Zone d'étude.

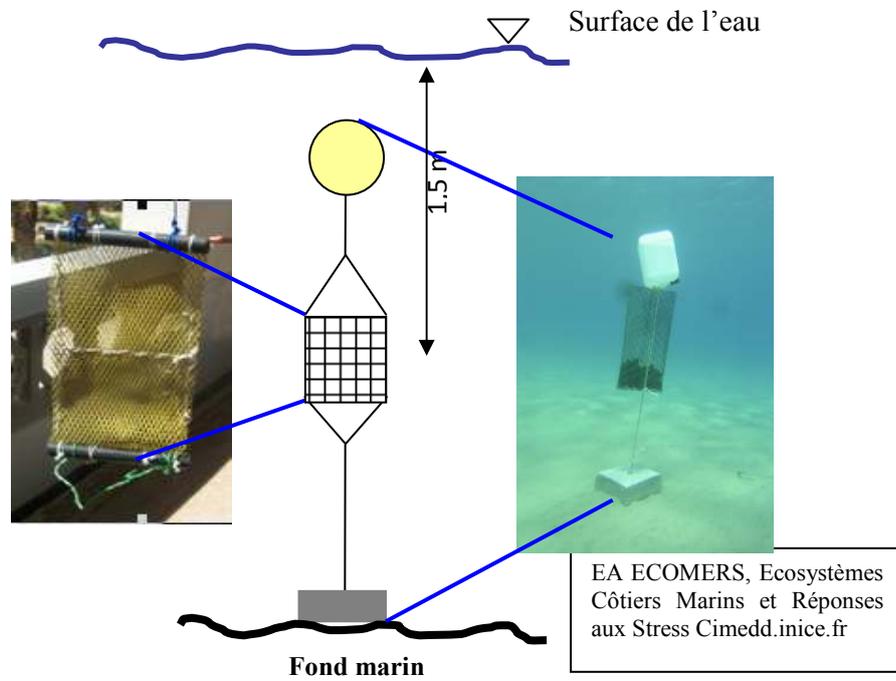


Fig. 10 : Station artificielle pour la transplantation des moules

III. 4. 2. Expérience au laboratoire

L'expérience au laboratoire se résume en une exposition d'une population de moule, réparties en quatre lots de 10 individus de la même classe de taille, à différentes concentrations de cuivre. La solution métallique est préparée à partir de chlorure de cuivre d'une pureté analytique de 97% ($\text{CuCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$). Les tests de toxicité sont de courtes durées (72 heures) réalisés dans des bacs d'élevage en plastique d'une capacité de 20 litres (Fig. 11)

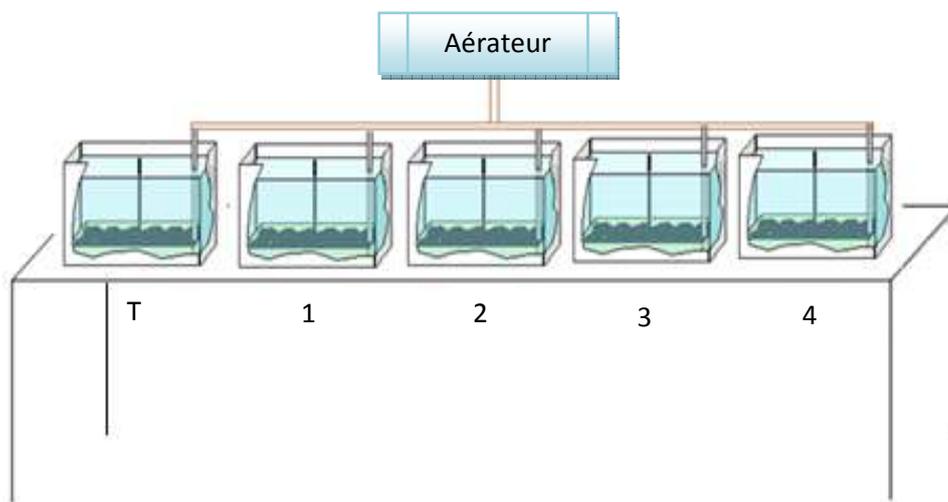


Fig. 11 : Dispositif expérimental

Conditions opératoires :

- Nombre d'individus : 10
- Classe de taille (cm) : [4, 5[
- Température ambiante
- T : bac témoin
- 1, 2, 3, 4 : bac contaminé

Une phase de stabulation de quelques jours précède chaque test de toxicité. D'une durée de 72 heures, la phase de contamination est suivie d'un essai de décontamination de 10 jours. Une mesure quotidienne des paramètres physico-chimiques ($T^{\circ}\text{C}$, pH, O_2 dissous, S‰) est réalisée.

L'analyse des protéines et de la catalase est réalisée au niveau de la chaire totale et des branchies après exposition à 5, 15, 25 et $35\mu\text{g}$ de Cu^{2+}/l .

III. 5. Analyses biochimiques

III. 5. 1. Préparation des échantillons tissulaires

Les dosages biochimiques du biomarqueur Catalase et des protéines nécessitent une homogénéisation et d'un fractionnement subcellulaire. L'ensemble de ces procédures se déroulent dans des tampons adaptés. Les propriétés physico-chimiques de la solution tampon permettent la stabilité des molécules ou organites à étudier. Le pH doit faire objet d'une surveillance particulière.

Les tissus sont homogénéisés à raison de (1/10 P/V) dans le tampon TRIS (tris(hydroxyméthyl)aminométhane) (20mM ; pH 7,8) en utilisant un mixeur déchiqueteur. La centrifugation de l'homogénat est faite à 10 000g pendant 10min à 10°C. Le surnageant ainsi obtenu (Fraction S9) est utilisé pour doser les protéines et la catalase (Fig. 12).

III. 5. 2. Dosages des protéines par la méthode de Lowry

1. Principe

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour le dosage des 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.* (1951) 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.

2. 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 1 ml. Le tube de blanc contient 01ml d'eau distillée.

05 ml de réactif Lowry (annexe) sont ajoutés à chaque tube. Une homogénéisation et 10min de repos sont nécessaires. 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 à 7,6g de protéines dans 100 g de solution (7,6G%). Les étalons filles sont ainsi obtenus par dilution de la solution mère.

III. 5. 3. Dosages de la Catalase par mode Cinétique

1. 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).

2. Mode opératoire

L'équation de la réaction catalysée par la catalase étant $2 \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$, l'activité catalase est estimée en mesurant la disparition du peroxyde d'hydrogène à 240 nm selon une méthode adaptée de celle de Claiborne (1985 *in* Devier, 2003).

2,5ml du substrat (100µl solution de H_2O_2 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, le suivi de la décomposition du peroxyde d'hydrogène durant 60s sur un spectrophotomètre (UV-Vis de type Jenway 6405) de. Les résultats sont exprimés en U/mg de protéines.

L'activité catalase est calculée selon la formule suivante:

$$\text{CAT} = [(\text{Abs}_{t_0} - \text{Abs}_{t_{60s}})/\text{min}] / [\text{P}] * 0,04$$

- où $(\text{Abs}_{t_0} - \text{Abs}_{t_{60s}})/\text{min}$ est la variation de densité optique par minute,
- 0,04 coefficient d'extinction molaire du peroxyde d'hydrogène à 240 nm en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,
- [P] concentration en protéines dans le milieu réactionnel en $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

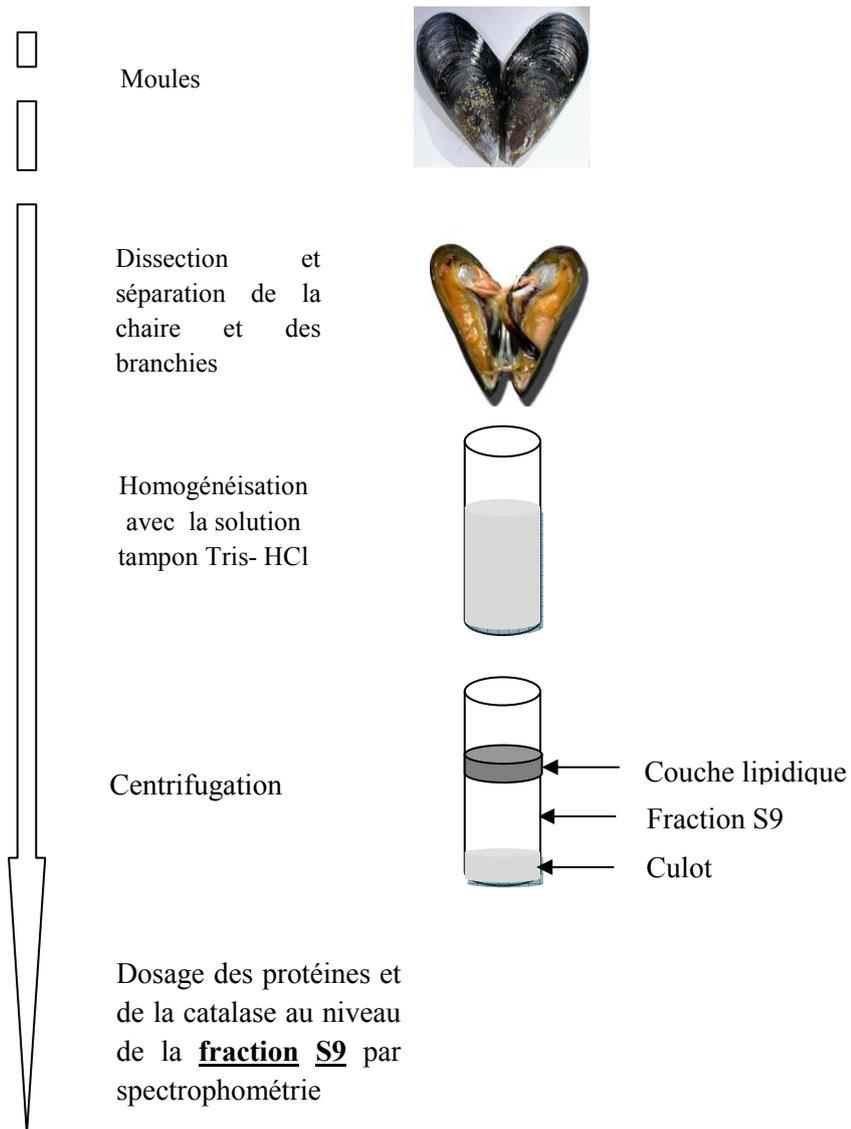


Fig. 12 : Procédures expérimentales (dosages biochimiques).

Chapitre IV

Résultats et discussions

IV. Résultats et discussions

IV. 1. Résultats

L'examen de l'effet de la pollution de l'environnement et du cuivre au laboratoire, sur le stress oxydatif et de sa défense chez la moule *Mytilus galloprovincialis* est développé ci dessous à travers les résultats sur l'activité de la catalase.

IV. 1. 1. Mesure de la catalase au niveau des moules du site de référence

Les résultats des analyses biochimiques réalisés sur les trois classes de tailles : [3, 4[, [4, 5[et [5, 6[cm de la station de référence réputée non polluée, révèlent une différences d'induction de la catalase en fonction de la taille des individus. La variation ainsi observé est inversement proportionnelle à la taille (Fig.13). La valeur maximale est enregistrée pour les petites classe de taille ([3, 4[cm) : 38,49 U/mg de protéine. L'indice de condition (IC) est proportionnel à la taille des individus (Fig. 14). Rappelant que l'indice de condition est généralement utilisé pour évaluer les variations saisonnières des réserves nutritives et l'état de santé des populations de moule.

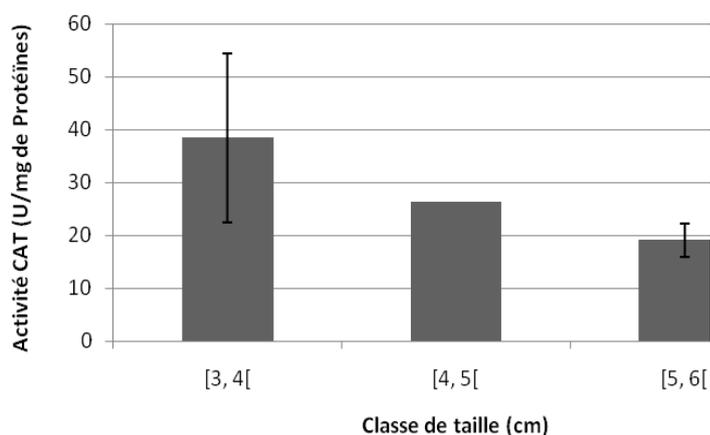


Fig.13 : Variation de l'activité CAT en fonction des classes de tailles

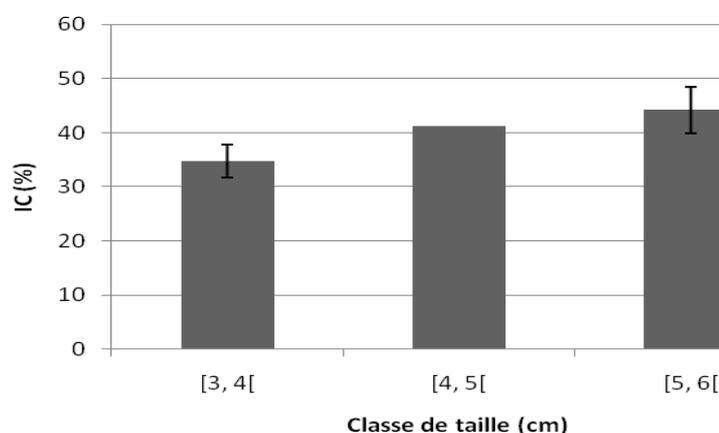


Fig. 14 : Variation de l'IC en fonction des classes de tailles

L'emploi d'indices permettant d'évaluer cette condition est d'un usage courant dans les études concernant les populations exploitées (Mann, 1978; Berthome et *al.*, 1979 *in* Bodgy et *al.*, 1986) ou bien lorsqu'il s'agit de suivre une évolution physiologique se traduisant par des fluctuations des réserves énergétiques, qu'il s'agisse d'engraissement ou d'amaigrissement (Cabson et Walker, 1971 *in* Bodgy et *al.*, 1986).

Cette dépendance vis à vis des conditions d'environnement se traduit essentiellement par des variations de la quantité des tissus organiques présents, quantité correspondant à la "condition" de l'animal en question. Les résultats d'une étude réalisée en 2007, font apparaître clairement une fluctuation saisonnière de l'IC pour les différentes classes de tailles (Annexe 1). Il est à noter que les valeurs de l'IC obtenu dans la présente étude semblent comparables aux mesures de 2007.

Les conditions physico-chimiques des eaux de la station de référence présente une variation saisonnière de la température. Le pH reste dans une gamme de valeur normale en milieu marin, le système de carbonates confèrent à l'eau de mer un état tampon (Aminot et Chaussepied, 1983). Zone de forte agitation les zones côtières, notamment la zone d'étude, présentent une oxygénation proche de la saturation ($5,985 \pm 0,49$ mg/l) (Tab. 4).

Tab. 4 : Conditions physico-chimiques de la station de référence

pH	$7,63 \pm 0,26$
T°C	$19,96 \pm 3,12$
O ₂ dissous (mg/l)	$5,985 \pm 0,49$
S‰	$36,33 \pm 0,38$

IV.1. 2. Résultats du test de transplantation de moule (Expérience *In situ*)

L'expérience sur la transplantation de moules de la classes de taille [3, 4[cm au niveau des ports de pêche de Khemisti, Bouharoun et de Gouraya pour une durée maximale de 30 jours présentent des réponses différentes selon le port (Fig.15). L'induction la plus importante de la CAT est enregistrée au niveau du port de Khemisti ($157,72 \pm 19,6$ U/mg de protéines) après 20 jours de transplantation. La plus faible induction est observée au niveau du port de Gouraya ($40,62 \pm 6,87$ U/mg de protéines après 10 jours de transplantation).

La transplantation des moules est suivie d'une phase de décontamination de 10 jours dans la région de Gouraya, zone réputée non polluée de part sa situation géographique et l'inexistence d'importante source de pollution. L'opération s'avère intéressante, Ainsi nous

avons observés une diminution de l'induction de la CAT. Concernant l'indice de condition, la durée de la transplantation considérée semble peu l'influencée (Fig. 16).

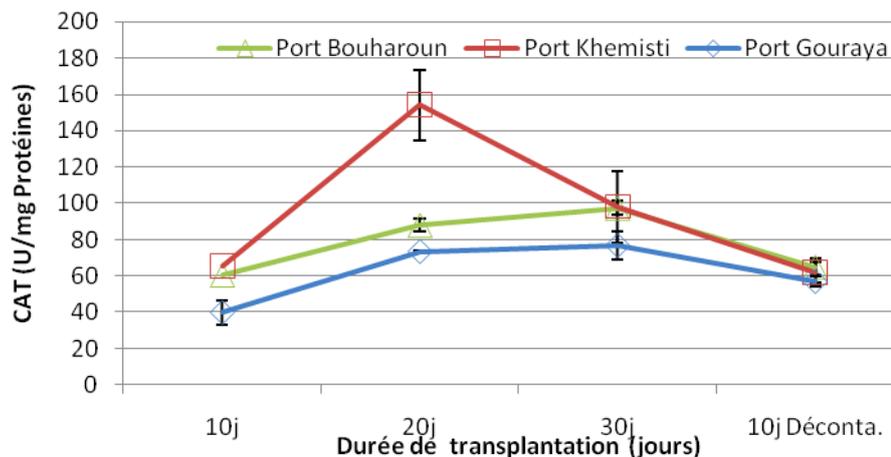


Fig. 15 : Variation de l'activité CAT en fonction du temps de transplantation Classe de taille [3, 4[cm)

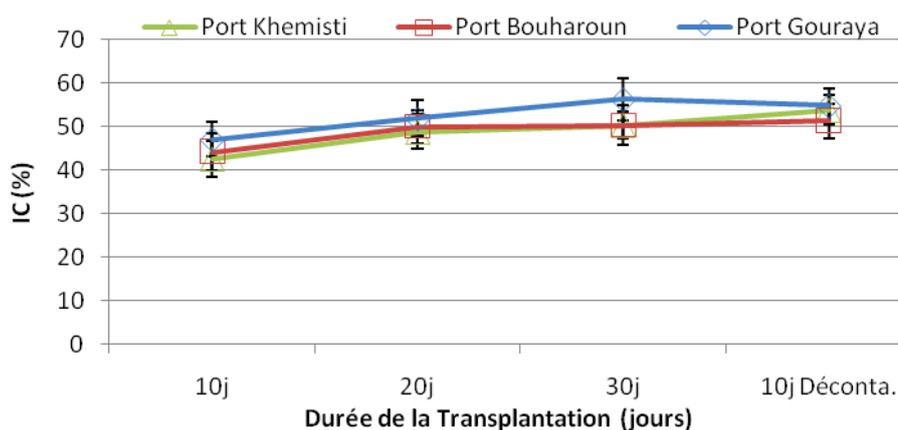


Fig. 16 : Variation d'IC en fonction du temps d'exposition. Classe de taille [3, 4[cm

Il est à noter que les moules transplantés au niveau du port de Gouraya présentent une croissance néanmoins plus intéressante que celles transplantés au niveau des ports de Khemisti et Bouharoun qui semble avoir la même vitesse de croissance (Fig.17).

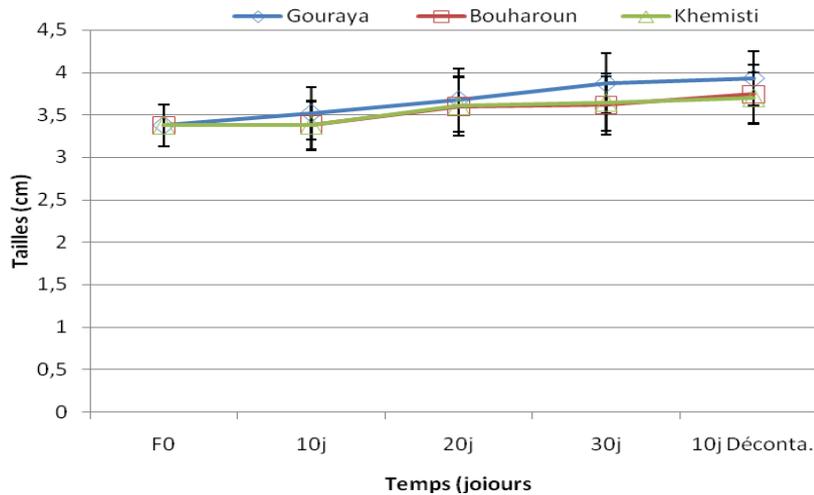


Fig. 17 : Variation de la taille en fonction du temps de transplantation.

L'induction maximale de la CAT des moules de la classe de taille [5, 6[cm transplantées au niveau du port de pêche de Khemisti est enregistrée au jour 20 (Fig.18).

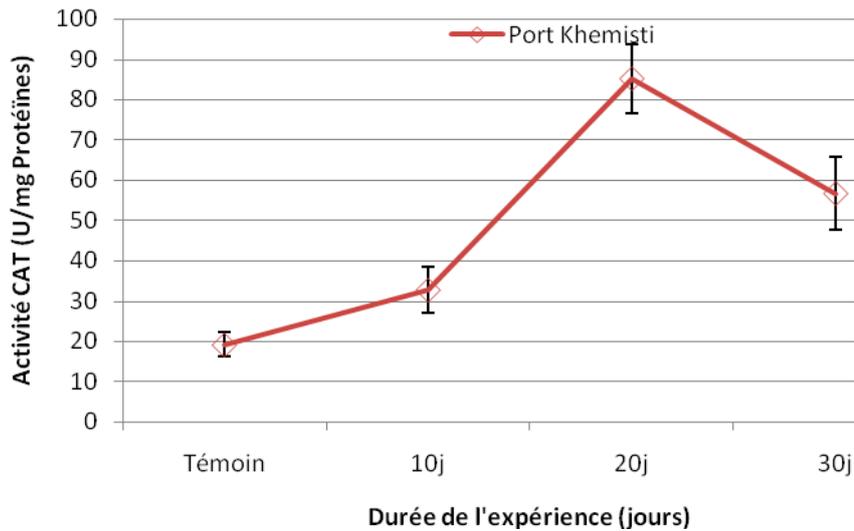


Fig. 18 : Variation de l'activité CAT en fonction du temps de transplantation. Classe de taille [5, 6[(cm)

Les variations de la CAT pour les classes de tailles [3, 4[et [5, 6[cm sont identiques. Présentant le maximum d'induction au bout de 20 jours. Néanmoins l'induction est nettement plus importante pour les moules de la classe de taille [3, 4[cm (Fig. 19).

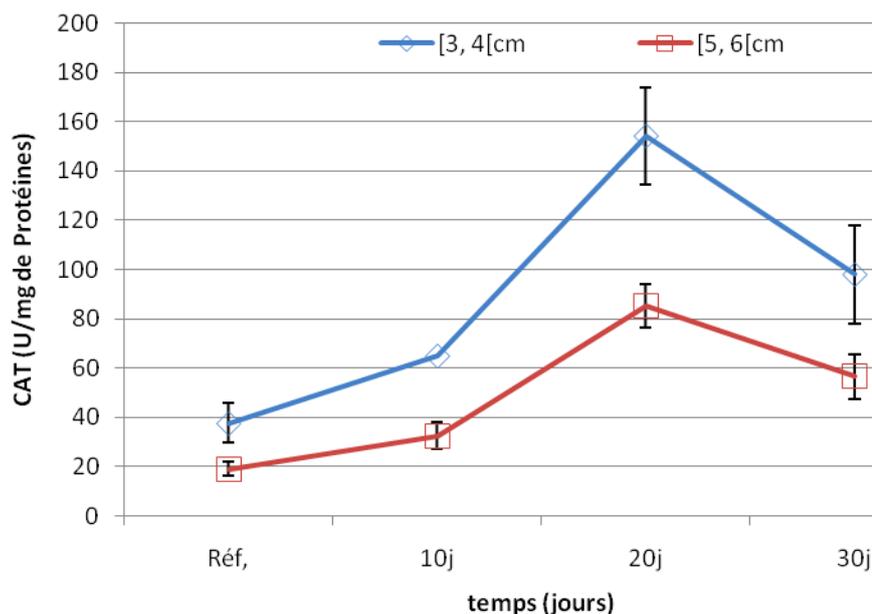


Fig. 19 : Variation de l'activité CAT en fonction du temps de transplantation. Classes de tailles [3, 4[et [5, 6[(cm)

IV. 1. 3. Résultats des tests de toxicité au cuivre

Les tests de toxicité de courte durée réalisés au laboratoire sur les individus de la classe de taille de [4, 5[(cm) présentent des inductions significatives au niveau des branchies qu'au niveau de la chaire totale. Au niveau de la chaire totale une induction maximale ($113 \pm 9,06$ U/mg protéines) est observée pour une teneur maximale de $35 \mu\text{g}$ de cuivre /l (Fig. 20). Au niveau des branchies l'induction maximale est de $162 \pm 19,5$ U/mg protéines et est enregistrée pour une teneur de $5 \mu\text{g}/\text{l}$ (Fig. 21).

Après une phase de décontamination de 10 jours, une diminution significative de la CAT est observée (Fig. 22).

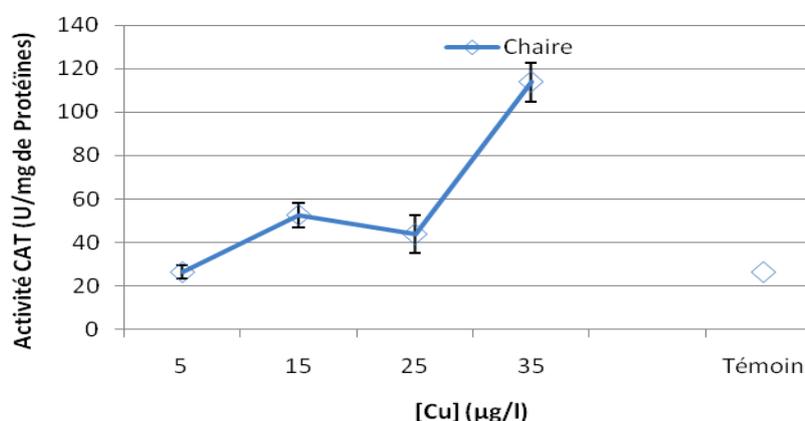


Fig. 20 : Variation de l'activité CAT au niveau de la chaire en fonction de la concentration du Cu pour la classe de taille [4, 5[(cm).

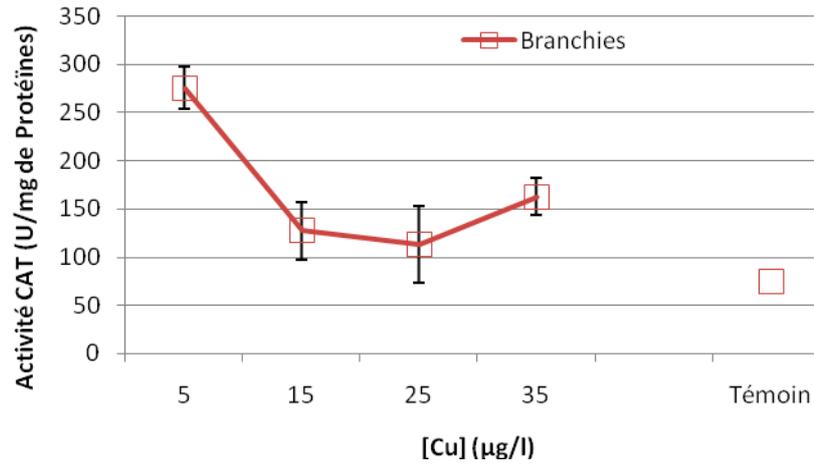


Fig. 211 : Variation de l'activité CAT au niveau des branchies en fonction de la concentration du Cu pour la classe de taille [4, 5[(cm).

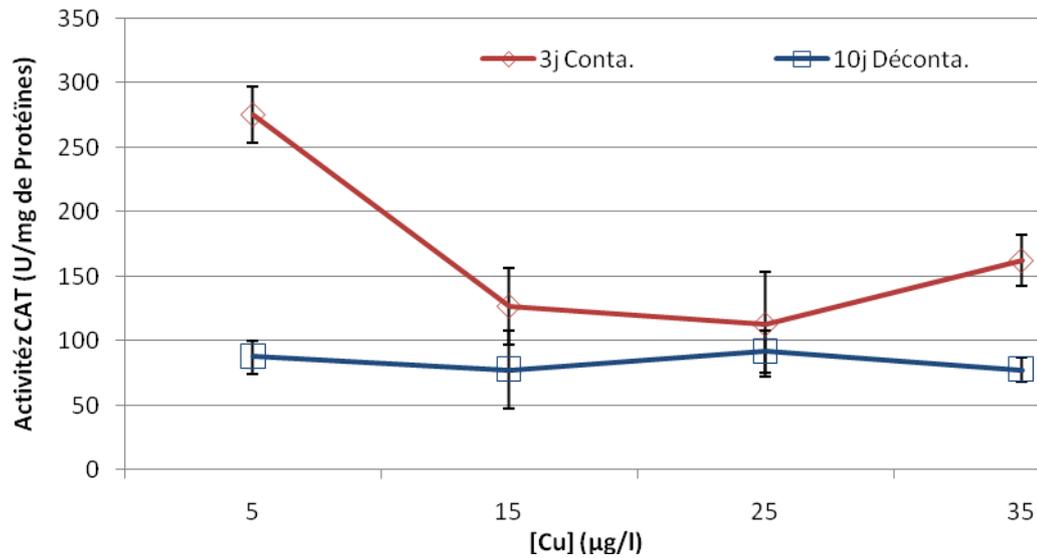


Fig. 222: Variation de l'activité CAT au niveau des branchies : phase d'exposition et phase de décontamination.

3 jours d'exposition
 10 jours de décontamination
 Classe de taille [4, 5[(cm)

IV. 2. Discussions

IV.2.1. Discussions des résultats du test de transplantation

Le maximum de synthèse de la CAT, observé au niveau du port de Khemisti laisse supposé que ce dernier présente un degré de pollution élevé suivi du port de Bouharoun. Le degré d'anthropisation du port de pêche de Khemisti est probablement due à son caractère de port « confiné », ainsi que les eaux usées déversés au niveau du bassin. L'évolution de la CAT au niveau du port de Bouharoun et du port de Gouraya semble augmenté jusqu'au 30^{ème} jour d'exposition (Fig. 15, Titre IV.1.2), contrairement au niveau du port de Khemisti le maximum d'induction est enregistrée au 20^{ème} jour de transplantation pour les classes de tailles [3, 4[et [5, 6[cm représentées sur la figure 19 (voir titre IV.1. 2) semble montré l'existence d'un seuil de résistance au stress oxydant caractérisé par un point de rupture. Il semble que l'inhibition de la CAT, au 30^{ème} jour de transplantation, pourrait s'expliquer par l'amélioration de la prise en charge du stress oxydant des organismes. Cependant, Canesi et Viarengo (1997) suppose que l'épuisement du glutathion dans les tissus sénescents peut résulter d'une réponse cellulaire à une augmentation du taux d'oxydation et de dégradation, ou diminué la synthèse du glutathion. Christie *et al.* (1984 in Letendre, 2009) aboutissent aux mêmes conclusions. Aussi, les individus de [3, 4[cm semblent avoir des capacités d'expression au stress oxydatif plus élevées que les individus de [5, 6[cm (Fig. 19, titre IV.1.2). Viarengo *et al.* (1991), indiquent nettement chez *Mytilus edulis* L. que les processus de peroxydation des lipides sont plus importants chez les moules plus âgées, la GSH et la vitamine E étant présentes en concentrations moins grandes chez les moules plus âgées. Sensiblement influencées par l'âge les individus de plus de 10 ans ont des capacités antioxydantes significativement plus faibles, ce qui explique un taux de lipoperoxydation plus élevé. Dans le même registre les travaux de Livingstone *et al.* (1990) démontrent que les capacités de défense anti-oxydante chez *Mytilus edulis* peuvent être influencées par une variété de facteurs tels l'âge, le niveau de nutrition, les variations de facteurs abiotiques, l'état de contamination de l'environnement.

Par ailleurs, différentes études ont montrées que des facteurs physiologiques et naturels tel que le cycle saisonnier peuvent causer des variations de l'expression ou de l'activité des biomarqueurs. Ces études ont notamment permis de mettre en évidence des variations de l'activité de la SOD, de la CAT, de la GPx et des GST chez *Mytilus galloprovincialis* en fonction de la saison. Les activités les plus élevées de la CAT ont été notées au mois de février et novembre au niveau de la glande digestive et des branchies, par contre l'activité minimale a été observée en mai et août (in Letendre, 2009). Santovito *et al.* (2005 in Bigot,

2009) explique l'activité maximale au niveau des branchies par l'augmentation de la respiration due aux basses températures et par conséquent l'augmentation des EAO. Au niveau des glandes digestives, la demande en oxygène augmente ce qui entraîne une activité maximale des SOD, CAT et GPx. Au niveau des tissus mous l'activité de la CAT est maximale en mai. Cette augmentation est liée avec une activité métabolique importante en relation avec l'augmentation de la température (consommation de l'O₂) et l'activité reproductive (Powen et Sheehan, 1996 *in* Bigot, 2009).

Chez *Mytilus edulis*, les activités les plus élevées de la CAT et des GST sont observées en mai et pourraient être corrélées avec une augmentation de la formation des EAO. En effet, cette période correspond à une forte activité métabolique : abondance alimentaire, croissance, période de reproduction (Leinio et Lehtonen, 2005 *in* Bigot, 2009). Kono et Fridovich (1982) observent que l'anion superoxyde inhibe la catalase, grâce à la présence de superoxyde dismutase l'induction de la CAT est stimulé évitant un stress oxydatif. Cette observation supporte l'idée d'un synergisme entre les activités CAT et SOD observées *in vivo*.

La production de radicaux libres par le métabolisme des bivalves démontre les capacités de ces organismes à exprimer un stress oxydatif.

Les situations d'hypoxies constituent également un facteur d'induction de la CAT (Abele et Puntarulo, 2004 ; Ferreira *et al.*, 2003 ; Hermes-Lima *et al.*, 1998 *in* Letendre, 2009). Dans notre étude l'O₂ dissous enregistrés au niveau des ports ne semble pas être un facteur d'induction de la CAT. En effet une teneur maximale est notée dans le port de Gouraya 5,90 mg O₂/l, par le port de Khemisti enregistre une valeur minimale de 4,41 mg O₂/l.

De l'analyse et le traitement des résultats, une première constatation laisse supposé que le port de Khemisti présente le degré de pollution le plus élevé suivi du port de Bouharoun. Meknachi (2010) dans son étude relève le même constat. La différence de croissance observée dans les trois ports conforte cette hypothèse. La croissance la plus importante est observée au niveau du port de Gouraya. Steinert *et al.* (1998 *in* Larno, 2002) observent chez des moules *Mytilus edulis* collectées dans la baie polluée de San Diego une réduction de la croissance des individus.

Pellerin *et al.* (2007) expliquent que l'évolution d'un stress se termine par la récupération, retour à l'état physiologique initial, ou la mort. Après un séjour de 30 jours au niveau des trois ports de pêche, un essai de décontamination d'une durée de 10 jours est réalisé dans une région salubre de Gouraya. Une baisse significative de l'induction de la CAT est observée. La plus importante est observé pour les moules issues du port de Khemisti

(36,97%) et la plus faible diminution est obtenue pour les moules issues du port de Gouraya (26%) ceci est probablement due à l'amélioration des conditions environnementales (Fig. 15, Titre IV.1.2).

IV.2. 2. Discussions des résultats des tests de toxicité au cuivre

Les tests de toxicité au cuivre, d'une durée de 72 heures, montrent une induction de la CAT au niveau de la chaire pour les concentrations adoptées (5, 15, 25 et 35 μg de Cu^{2+}/l) et présente une évolution positive en fonctions des teneurs en cuivre (Fig. 20, Titre IV.1.3). Le stress oxydant provoqué par le cuivre semble être pris en charge par l'induction croissante de la CAT impliquant un bon état physiologique des moules.

Exposés à 40 μg de cuivre/l pendant six jours, Viarengo et *al.* (1990), montrent une augmentation de la peroxydation des lipides dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis*. Rappelant que la peroxydation des lipides est principalement provoqué le radical hydroxyle. Torres et *al.* (2002) observent une forte corrélation entre une augmentation de la peroxydation lipidique et une concentration plus élevée de Cu et Mn dans la glande digestive du *Mytella guyanensis*.

Géret et *al.* (2002) montrent que le Cu et le Cd affectent les systèmes antioxydants, ils provoquent une augmentation de la peroxydation lipidique chez *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis* et *Crassostrea virginica*.

Concernant les mesures effectuées au niveau des branchies, on remarque une importante induction de la CAT relativement à la chaire totale.

Bien que la formation des radicaux libres se produit pratiquement dans tous les organes et que la glande digestive soit un lieu de métabolisation des ressources énergétiques et autres composés, et de ce fait lieu de formation privilégiée de radicaux libres, les branchies organe de filtration, représente un site majeur de stress oxydant car elles sont exposées directement aux changements environnemental. D'autre part, les branchies sont négativement chargées, elles représentent des sites privilégiés d'interaction pour les polluants cationiques (Blanquet et *al.*, 2004b).

Après une phase de décontamination de 10 jours, une diminution de la CAT est observée. Ainsi une réduction de 68% est enregistrée pour la teneur de 5 $\mu\text{g}/\text{l}$. La plus faible diminution est notée pour la teneur de 25 $\mu\text{g}/\text{l}$ (18%) (Fig. 22, Titre IV.1.3). L'essai de décontamination s'avère concluant, les individus semblent retrouvés un état physiologique normal et récupérés d'une situation extrême.

La diminution des défenses anti-oxydantes pourrait refléter un haut niveau de toxicité pour les organismes alors que l'induction signifie qu'ils sont capables de s'adapter au stress chimique (Vasseur et Leguille, 2004). Une diminution de l'expression de la SOD et de la CAT dans les branchies et de la MT dans la glande digestive a également été observée avec les plus fortes concentrations en Cu et en Cd.

La quantité de CAT induite sous l'effet du cuivre est semblable voir supérieur à celle induite au niveau du port de Khemisti, le plus pollué suivi du port de Bouharoun. Les interactions de synergismes et d'antagonismes dus aux mélanges de substances et les contaminations multiples peut impliquer de tels résultats.

Conclusion

Conclusion

L'impact de la pollution sur les écosystèmes et la santé humaine n'est plus à démontrer. Développer des outils de détection précoce et de prédiction des conséquences d'un stress environnemental constitue un enjeu majeur et essentiel. L'une des solutions probables à ce problème réside dans la détection de modifications au niveau moléculaire et cellulaire qui précèdent les effets directement observables sur une population.

Au cours de ce travail, nous avons essayé de comprendre comment les espèces aquatiques, ici les bivalves, « réagissent » à un environnement pollué, on étudiant certaines de leurs réponses biochimiques. Face aux effets toxiques des contaminants, les bivalves mobilisent des mécanismes de défenses enzymatiques dont la composante majeure est le stress oxydant.

Malgré les réponses générées par l'induction de la catalase face au cuivre, elles restent complexes et ne répondent pas toujours à une logique de proportionnalité dose/effet. Le même constat est fait en milieu portuaire. Cela suppose que la moule développe des systèmes de défense plus complexe.

Les résultats obtenus après transplantation au niveau des ports de pêche de Khemisti, de Bouharoun et de Gouraya montrent bien que les activités enzymatiques qu'on peut observer chez les bivalves, notamment chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, sont étroitement liées aux conditions de l'environnement ainsi que de l'état physiologique de la moule. Cependant, les situations de pollution semblent être le facteur principal déclenchant l'induction des enzymes anti-oxydantes. Ainsi la CAT, biomarqueur non spécifique, est stimulé de façon assez claire et rapide par le degré de pollution des ports étudiés.

Enfin, à l'issue des résultats obtenus il est incontestable que l'exploitation de la CAT, comme indicateur précoce de l'intoxication aux polluants, soit très intéressante. Néanmoins, si l'influence des facteurs environnementaux et anthropique peuvent être en partie limitée ou, à défaut, correctement appréhendés en conditions contrôlées, l'interprétation de la réponse des biomarqueurs du stress oxydatif devient extrêmement plus délicate en milieu naturel. Aussi une gamme de réponses pouvant être considérée comme « normale » pour un organisme s'avère difficile à établir. L'une des solutions pour appréhender toutes interprétations erronées ou loin de la réalité semble être l'approche

multibiomarqueurs. De plus la condition physiologique temporelle semble être un biais, il est donc recommandé, dans le cadre d'un programme de biosurveillance, de procéder à un suivi saisonnier des réponses biochimiques aux conditions du milieu.

Il est aussi recommandé de toujours comparer les réponses entre sites de niveaux de contamination différents avec l'emploi et la détermination de site de « référence ».

Enfin, sur la base de ces résultats, il est certains que d'autres travaux sont indispensable pour évaluer si la réponse bio marqueur diffère des conditions dites "normales".

Références bibliographiques

- Aarab N., 2004. Les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves : de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de docteur en écotoxicologie. Univ. BORDEAUX 1. 276 p.
- Abbes A., Soltani N. et Djebar A.B., 2006. Utilisation de l'activité Acétylcholinestérase chez la palourde *Ruditapes decussatus* dans la surveillance d'un écosystème lagunaire El Mellah – Algérie. 2ème Colloque euro-méditerranéen de Biologie environnementale. Mésogée Volume 62. *Bulletin du Muséum d'histoire naturelle de Marseille*.
- Achard-Joris M., 2005. Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant. Thèse de docteur en écotoxicologie. Univ. BORDEAUX 1. 226 p.
- Amiard, J-C., Caquet, T., Lagadic, L., 1998. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, edited by par L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard and F. Ramade (Paris: Lavoisier, Technique et Documentation), pp. XXI-XXXI.
- Aminot A., Chaussepied M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Centre National pour l'Exploitation des Océans, (CNEXO).395p.
- Barnabe G., 1991. L'aquaculture, Edition Lavoisier, Paris volume 1, 2^{ème} édition, Technique et documentation, 12,95p.
- Bard, S. M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 48, 357-389.
- Bauman, J. W., Liu, J., & Klaassen, C. D., 1993. Production of Metallothionein and Heat-Shock Proteins in Response to Metals. *Toxicological Sciences*, 21, 15-22.
- Beers R.F., Sizer I.W., 1952, *Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase*, *J. Biol.Chem.*, 195: 133-140
- Bigot A., 2009. Identification et étude de l'expression de gènes de détoxification chez les bivalves d'eau douce *Unio tumidus* et *Corbicula fluminea* : Approches en laboratoire et en milieu naturel. Thèse de doctorat, Univ. Paul Verlaine (Metz). 189p.
- Blanquet J.P., Bonnomet V., Coquery M., Gaudillot A., Gondelle F., Houeix N., Le Goff f., Magaud H., Meunier L. et Sanchez W., 2003a. Devenir et comportement des métaux dans l'eau : biodisponibilité et modèles BLM. Rapport Technique de l'INERIS. 85p.
- Blanquet J.P., Meunier L. et Morin A. – 2003b. Approches analytiques pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux dans les milieux aquatiques. Rapport Technique de l'INERIS. 87p.
- Bodgy A., Prou J. et Berthomeh J. P., 1986. Etude comparative de différents indices de condition chez l'huitre creuse (*Crassostrea gigas*). *Haliotis*, 15, 1986. p. 173 a 182
- Borkovic S.S., J.S. Saponjic, S.Z. Pavlovic, D.P. Blagojlevic, S.M. Milosevic, T.B. Kovacevic, R.M. Radojicic, M.B. Spasic, R.V. Zikic, Z.S. Saicic, 2005. The activity of

- antioxydant defense enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic sea. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **141C**: 366-374. (in Letellier C., 2009. Capacité antioxydante chez les hélicidés : variations intraspécifiques et interspécifiques. Master 2 EFCE. Univ. Rennes. 26p.)
- Bouchard B., 2008. Étude écotoxicologique de l'impact des rejets urbains sur un mollusque d'eau douce du Québec (*Elliptio complanata*) : Effets sur le système immunitaire et endocrinien. *Thèse Docteur vétérinaire*. Univ. CLAUDE-BERNARD - LYON I (France). 109p.
- Burgess D., Frerichs N. et George S., 1993. Control of metallothionein expression by hormones and stressors in cultured fish cell lines. *Marine Environmental Research*, **35**, 25-28.
- Myrand B., Proulx D. et Tremblay R., 2007. Atelier de travail « Indicateurs de stress chez les mollusques ». Compte rendu no 20. Publications de la Direction de l'innovation et des technologies. 76p.
- Canesi L. and Viarengo A., 1997. Age-related differences in glutathione metabolism in mussel tissues (*Mytilus edulis* L.), *Comp. Biochem. Physiol.*, **116B**: 217-221
- Casas S., 2005. Modélisation de La bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu Et Zn) Chez la moule, *Mytilus Galloprovincialis*, en milieu Méditerranéen. Thèse de doctorat. UNIVERSITE DU SUD TOULON VAR (France). 363p.
- Company R, Serafím A, Bebianno MJ, Cosson R, Shillito B, Fiala-Medioni A. 2004. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Mar. Environ. Res.* **58**, 377-381.
- Cossa D., Elbaz-Poulichet F., Gnassia-Barelli M., Roméo M., 1993. Le plomb en milieu marin biogéochimie et écotoxicologie. Ifremer. ISSN 1240 -1153.
- Cossa, D., 1989. A review of the use of *Mytilus* spp. As quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal water. *Oceanol. Acta.* **12**, 417-432.
- Cossu, C., A. Doyotte, M.-C. Jacquin, P. Vasseur. 1997. Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène, dans L. Lagadic *et al.* (ed), *Biomarqueurs en écotoxicologie*, Paris, Masson, p. 125-148.
- Deane, E. E., Kelly, S. P., Luk, J. C. Y., & Woo, N. Y. S., 2002. Chronic Salinity Adaptation Modulates Hepatic Heat Shock Protein and Insulin-like Growth Factor I Expression in Black Sea Bream. *Marine Biotechnology*, **4**, 193-205.
- Depledge, M. H. et Fossi, M. C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology*, **3**, 161-172.
- Devier M. H., 2003. Etude intégrée sur l'impact des différentes classes de contaminants (composés organostanniques, métaux, HAP, PCB) sur les moules. Bioaccumulation et réponses biochimiques. Thèse de Doctorat. Univ. Bordeaux I. 356p.

- Flammarion P., Devaux A., Nehls S., Migeon B., Noury P. and Garric J. 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle river (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51: 145-153.
- Flemming C.A. and Trevors J.T. (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, air and soil Pollution* 44 143-158.
- Forbes, V. E., Palmqvist, A., and Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in Ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 272–280.
- Galloway TS, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Jones MB, Depledge MH. 2004a. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environmental Science and Technology* 38: 1723-1731.
- Galloway TS, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Jones MB, Depledge MH. 2004b. Ecosystem management bioindicators : the ECOMAN project – a multi-biomarker approach to ecosystem management. *Marine Environmental Research* 58: 233-237.
- Gamble S.C., Goldfarb P.S., Porte C., Livingstone D.R., 1995, *Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (Mytilus edulis, Pecten maximus, Carcinus meanas and Asterias rubens)*, *Mar. Environ. Res.*, 39: 191-195
- Garric J., 2009. *L'écotoxicologie : Entre recherche et applications, quelques notions introductives*. La démarche écotoxicologique pour la protection et l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques. 5ème JOURNEE THEMATIQUE DE LA ZABR, 2009, pp 11-23.
- Garric J., Morin S. et Vincent-Hubert F., 2010. Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage. *L'évaluation du risque toxique dans les milieux aquatiques*. Numéro 1.
- Geret F, Serafim A, Barreira L, Bebianno MJ., 2002. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Biomarkers* 7, 242-256.
- Goldberg, E.D., 1975. The Mussel Watch, *Mar. Pollut. Bull.* 6, 111.
- Guerlet E., 2007. Utilisation de biomarqueurs cellulaires chez plusieurs espèces d'invertébrés pour l'évaluation de la contamination des milieux dulçaquicoles. Thèse de Doctorat. UFR Sciences Fondamentales et Appliquées. Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité et Ecosystèmes LIEBE / CNRS UMR 7146. 317p.
- Hagger JA, Jones MB, Leonard P, Owen R, Galloway TS. 2006. Biomarkers and integrated risk assessment: Are there more questions than answers? *Integrated Environmental Assessment and Management* 2: 312-329.
- Halliwell, B., Cross, C.E., 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives*, **102(10)**, 5-12.

- Kägi, J. H. R. & Schäffer, A., 1988. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, 27, 8509-8515.
- Khati W. et Nouacer S., 2006. Réponse biochimique de deux biomarqueurs du stress environnemental chez la palourde *Ruditapes decussatus*. 2ème Colloque euro-méditerranéen de Biologie environnementale. Mésogée Volume 62. *Bulletin du Muséum d'histoire naturelle de Marseille*.
- Khati W., Ouali K., Bensouilah M., Gnassia-barelli M. et Romeo M., 2007. Effet du cadmium sur certains biomarqueurs de stress chez la moule *Perna perna* du golfe d'Annaba (Algérie). Mésogée Volume 63. *Bulletin du Muséum d'histoire naturelle de Marseille*.pp. 51-57
- Kono, Y. and Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 257, 5751-5754.
- Labrot, F. R. D., Saint-Denis M., Narbonne JF, 1996. *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, 1, :21-28.
- Lagadic, L., Caquet, T., 1996. Marqueurs biologiques de pollution: des outils au service de l'écotoxicologie. *Phytoma - La Défense des Végétaux*, 480, 10-13.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions (introduction). In: Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux (Eds L. Lagadic, T. Caquet, J. C. Amiard et F. Ramade), Masson, Paris, pp 418.
- Lage, O.M., Soares, H.M.V.M., Vasconcelos, M.T.S.D., Parente, A.M. et Salema, R. 1996. Toxicity effects of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*: Influence of metal speciation. *European Journal of Phycology* - **31**(4): 341-348.
- Larno v., 2002. Réponses génétiques et physiologiques de populations de chevaine (*leuciscus cephalus*) a la contamination chimique dans le bassin du Rhône. Thèse de doctorat. Univ. Claude Bernard Lyon 1. 263 p.
- Lemaire, P., Livingstone, D.R., 1993. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, 1, 1119- 1149.
- Letendre J., 2009. Effets combinés de l'intertidalité et de la contamination chimique chez *Mytilus edulis* : Mécanismes enzymatiques anti-oxydants et approche protéomique. Thèse de Doctorat. Univ. Du Havre. 343p.
- Livingstone, D., 1993. Biotechnology and pollution monitoring : use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J Chem Technol Biotechnol* 57, 195-211.

- Livingstone, D.R., Martinez, P.G., Michel, X., Narbonne, J.F., O'Hara, S., Ribera, D., Winston, G.W., 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Funct. Ecol.* 4, 415-424.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr N.J., Randall R.J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Marie v., 2005. Etude de la réponse des métallothionéines chez les bivalves, *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas*, après exposition au cadmium et au zinc - Approches *in situ* et expérimentales – Thèse de doctorat Univ. Bordeaux I. 461p.
- Mirkes, P. E., Doggett, B., & Cornel, L., 1994. Induction of a heat shock response (HSP 72) in rat embryos exposed to selected chemical teratogens. *Teratology*, 49, 135-142.
- Morin S., 2006. Bioindication des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées benthiques. Approches *in situ* et expérimentales. Thèse de Doctorat. Univ. Bordeaux I. 302p.
- Meknachi A., 2010. Utilisation du poisson tilapia *Oreochromis niloticus* et la moule *Mytilus galloprovincialis* comme bioindicateurs du niveau de pollution par les métaux traces : modélisation de la bioaccumulation. Thèse de Magister, Université Saad Dahleb-Blida, 172p.
- Nzengue Y., 2008. Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines. Thèse de Doctorat. Univ. JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I. 299p
- Pellerin, J., S. Gauthier-Clerc, O. Assoi-Etchian, A. Siah, M. Fournier, N. Lemaire, S. Cartier, Myrand, B., D. Proulx, R. Tremblay. 2007. **Indices de stress chez des bivalves marins. Un nouvel outil : l'indice de maturation sexuelle.** Atelier de travail « Indicateurs de stress chez les mollusques ». MAPAQ-DIT, Gaspé. Compte rendu n° 20. 65 p.
- Pellerin-Massicotte, J. 1997. Influence of elevated temperature and airexposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *J. Rech. Océanographique* 22(3): pp 91-98.
- Pellerin-Massicotte, J., 1994, Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 3, pp 101-111.
- Pichard A., 2005. **CUIVRE ET SES DÉRIVÉS.** Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - INERIS. 66p.
- Prakash NT, Rao KS. 1995. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. *Mol. Cell. Biochem.* 146, 107-113.
- Prentice, H. M., Milton, S. L., Scheurle, D., & Lutz, P. L., 2004. The Upregulation of Cognate and Inducible Heat Shock Proteins in the Anoxic Turtle Brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 24, 826–828.

- Ramade F., 1998. Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau. Edi science. Paris, FRA. 785 p.
- Regoli F, Hummel H, C. A-T, Larroux C, Sukhotin A. 1998. Trace metals and variations of antioxidant enzymes in Arctic bivalve populations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 594-601.
- Sanchez W., 2007. Approche multimarqueurs chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.): Un modèle pour la surveillance des écosystèmes aquatiques. Thèse de Doctorat. *Ecole doctorale des sciences de la nature et de l'homme. Muséum National d'Histoire Naturelle.* 271p.
- Sauvé, S., P. Brousseau, J. Pellerin, Y. Morin, L. Senécal. P. Goudreau, M. Fournier. 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology* 58 (3-4): 189 – 200.
- Sierra-Rivera, E., Voorhees, G. J., & Freeman, M. L., 1993. Gamma irradiation increases hsp-70 in Chinese hamster ovary cells. *Radiation Research*, 135, 40-45.
- Sifi K., Chouahda S. et Soltani N., 2007. Biosurveillance de l'environnement par la mesure de biomarqueurs chez *Donax trunculus* (L., 1758) dans le golfe d'Annaba, (Algérie). *Mésogée Volume 63. Bulletin du Muséum d'histoire naturelle de Marseille.* pp. 11-18
- Taleb M. Z. et Boutiba Z., 2007. La moule *Mytilus galloprovincialis* : Bioindicateur DE pollution marine – Cas du port d'Oran. *Sciences & Technologie C – N°25, Juin (2007)*, pp.59-64. Réseau de Surveillance Environnementale.
- Timbrell, J.A., Draper, R., Waterfield, C.J., 1994. Biomarkers in toxicology: new uses for some old molecules? *Toxicology and Ecotoxicology News*, **1(1)**, 4-14.
- Torres M.A., Testa, C.P., Gaspari, C., Masutti, M.B., Panitz, C.M., Curi-Pedrosa, R., Alves de Almeida, E., Di Mascio, P., Filho, W. 2002. *Oxidative stress in the mussel Mytella guyanensis from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil.* *Mar. Pollut. Bull.* 44: 923-932
- Vasak, M., 1986. Dynamic Metal-Thiolate Cluster Structure of Metallothioneins. *Environmental Health Perspectives*, 65, 193-197.
- Vasseur P, Cossu-Leguille C. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International* 28: 711-717.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol.* 277, 1612-1619.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., & Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and Molecular Biology*, 46, 407-417.

Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Poli G., Moore M.N., Orunesu M., 1990, *Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of Mytilus galloprovincialis*, Comp. Biochem. Physiol., 97C: 37-42

Viarengo A., L. Canesi L., M. Pertica, D.R. Livingstone. 1991. Seasonal variations in the antioxidant defense systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels, Comparative Biochemistry and Physiology, vol. 100C, no 1-2, p. 187-190.

Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Accomando, R., Mancinelli, G., & Orunesu, M., 1989. Lipid peroxidation and level of antioxidant compounds (GSH, vitamin E) in the digestive glands of mussels of three different age groups exposed to anaerobic and aerobic conditions. Marine Environmental Research, 28, 291-295.

Vidal M.L., 2001. Etude de marqueurs biochimiques de pollution chez le mollusque bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea* (Müller) - Purification et caractérisation des glutathion *s*-transferases. Thèse de Doctorat. Univ. Bordeaux I. 285p.

Vidal, M.L., Basseres, A., Narbonne, J.F., 2002. Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. Comp. Biochem. Physiol. 132C, 93-104.

ANNEXES

Annexe 1 : Caractéristiques chimiques du cuivre et de CuCl₂

	Cu	CuCl ₂
Masse molaire (g/mol)	63,55	134,45
Solubilité dans l'eau (mg/L)	-	7,3.10 ⁵ à 20 °C

Annexe 2 : Données toxicologiques du cuivre chez les mollusques marins (*in* Pichard A., 2005)

Espèce	N/M	Substance testée	Durée	Critère d'effet	Valeur (µgCu /L)	Référence
<i>Crassostrea virginica</i>	N	-	14 j	NOEC	10	Calabrese <i>et al.</i> , 1977
<i>Mercenaria mercenaria</i>	N	-	7 j	NOEC	5	Calabrese <i>et al.</i> , 1977
<i>Mytilus edulis</i>	N	CuSO ₄	10 j	NOEC	0,5	BKH, 1995
<i>Mytilus edulis</i>	M	CuSO ₄	30 j	NOEC	1,3	BKH, 1995
<i>Mytilus edulis</i>	N	CuCl ₂	15 j	NOEC	10	BKH, 1995
<i>Mytilus edulis</i>	M	CuCl ₂	20 j	NOEC	5,6	Redpath et Davenport, 1988
<i>Pecten maximus</i>	N	CuCl ₂	15 j	NOEC	6,7	BKH, 1995

N : concentration nominale ; M : concentration mesurée.

Annexe 3 : Doses maximales admissibles (ppm P.S) et doses toxiques pour l'homme (*in* Taleb M. Z. et Boutiba Z., 2007).

	Groupe	Cadmium	Cuivre	Plomb
Doses maximales admissibles	Mollusques	5	40	0,03 ppm (b)
	Crustacés	5	40	0,3 - 6 ppm
	Poissons	1	5	0,03 - 0,05(b)
	Aliment	5 ppm (c,d)		
Doses toxiques pour l'homme		30 mg sont toxiques(a)	2,5 g sont mortels	Inf. à 1 mg/jour

a : Groupe interministériel des problèmes de pollution de la mer (G.I.P.M.), 1971

b : Société des experts chimistes (C.N.R.S.), 1971

c : O.M.S., 1971

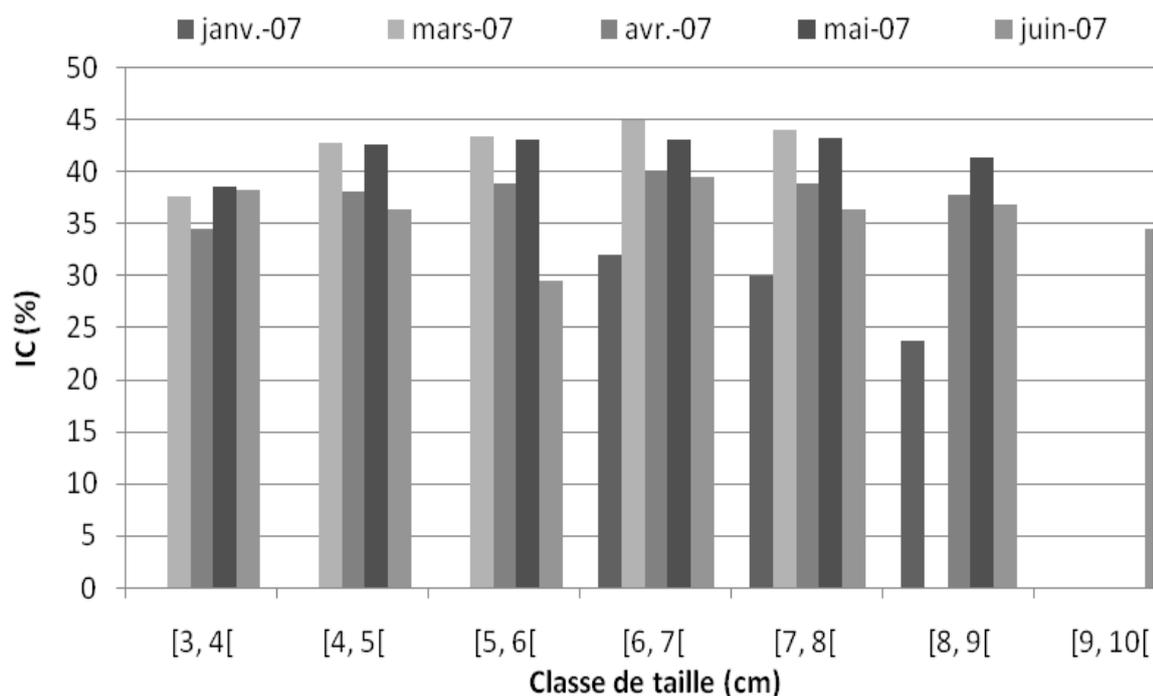
d : F.A.O., 1971

Annexe 4 : Données statistiques sur les concentrations de 5 métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) dans la chair de moules sur deux périodes (1979-1993, 1993-1999) (RNO, 1974-2004) (in Casas S., 2005)

	Paramètre	1973-1993		1993-1999	
		Manche-Atlantique	Méditerranée	Manche-Atlantique	Méditerranée
Hg (mg.kg⁻¹)	Nb.	1793	943	647	350
	Moy.	0,12	0,17	0,13	0,15
	Ecart-Type	0,06	0,1	0,09	0,09
	Min-Max	0,01-0,83	0,02-1,24	0,01-0,7	0,03-0,66
Cd (mg.kg⁻¹)	Nb.	1868	985	649	350
	Moy.	1,1	0,83	0,87	0,87
	Ecart-Type	0,59	0,37	0,73	0,86
	Min-Max	0,2-13	0,09-36,2	0,15-14,6	0,21-7,95
Pb (mg.kg⁻¹)	Nb.	1852	994	649	350
	Moy.	2,27	3,06	1,97	2,6
	Ecart-Type	1,13	2,38	1,25	2,65
	Min-Max	0,15-13,7	0,1-83,2	0,5-14,6	0,1-18,8
Cu (mg.kg⁻¹)	Nb.	1862	1015	649	350
	Moy.	7,2	7,1	7,08	8,49
	Ecart-Type	1,5	2	1,69	11,5
	Min-Max	0,9-33,9	1,3-52,2	3,7-1,6	2,3-132
Zn (mg.kg⁻¹)	Nb.	1872	1000	649	350
	Moy.	93,4	154	109	147
	Ecart-Type	38	55,2	65,4	53,5
	Min-Max	24-546	43-615	33-391	51-373

Nb: nombre d'observations, **Moy**.: moyenne exprimée par rapport au poids sec.

Annexe 5 : IC de *Mytilus galloprovincialis* en fonction de la taille et du temps au niveau de la baie de Bou ismail (2007).



Résultats obtenus dans le cadre des travaux de recherche de l'équipe de recherche « Environnement ». Intitulé du projet : Mise au point d'un intégrateur des contaminants chimiques dans les eaux côtières. Etude de faisabilité d'un réseau utilisant la transplantation de moules.

(2007)

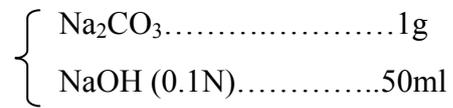
Annexe 6 : Conditions physico-chimiques de l'eau et résultats des analyses biochimique des moules de la station de référence de Fouka marine.

Paramètres physico-chimiques	
pH	7,63±0,26
T°C	19,96±3,12
O ₂ dissous (mg/l)	5,985±0,49
S‰	36,33±0,38

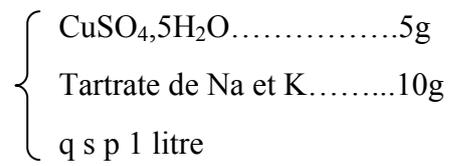
Classe de taille (cm)	IC (%)	CAT (U/mg de protéines)
[3, 4[34,756±3,114	38,49±15,99
[4, 5[41,2±	26,25±
[5, 6[44,17±4,26	19,11±3,2

Annexe 7 : Réactifs de Lowry

1- Réactif de Lowry A

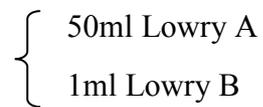


2- Réactif de Lowry B



3- Réactif de Lowry :

Mélanger le jour de la manipulation



Annexe 8 : Espèces cités

<i>Espèces</i>	Classe	Famille	Nom commun
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Bivalvia	Mytiloidae	Modioles profondes
<i>Crassostrea gigas</i>	Bivalvia	Ostreidae	Huîtres creuses
<i>Crassostrea virginica</i>	Bivalvia	Ostreidae	Huîtres creuses
<i>Donax trunculus</i>	Bivalvia	Donacidae	Telline
<i>Macoma balthica</i>	Bivalvia	Mytiloidae	Macome ou telline
<i>Mya arenaria</i>	Bivalvia	Mytiloidae	Mye
<i>Mytella guyanensis</i>	Bivalvia	Mytiloidae	Moule de Guyane
<i>Mytilus edulis</i>	Bivalvia	Mytiloidae	Moule bleu
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Bivalvia	Mytiloidae	Moule Méditerranéenne
<i>Perna perna</i>	Bivalvia	Mytiloidae	Moule africaine
<i>Perna viridis</i>	Bivalvia	Mytiloidae	-
?	Bivalvia	Ostreidae	Pétoncle
<i>Ruditapes decussatus</i>	Bivalvia	Veneridae	Palourde commune
<i>Unio tumidus</i>	Bivalvia	Unionidae	Mollusque d'eau douce