

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA**

**Faculté de Technologie**

Département de Chimie Industrielle

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Génie de l'Environnement

ETUDE DES BIOMARQUEURS DE LA BIOACCUMULATION DES  
METAUX TRACES (CUIVRE, CADMIUM ET PLOMB) CHEZ LA  
MOULE *Perna perna* Born (1780) EXPOSEE A UNE TOXIFICATION  
AIGUË

Par

**Kamel BOUDJEMA**

Devant le jury composé de :

O. BOURAS	Professeur, Université Blida 1	Président
A. AOUABED	Professeur, Université Blida 1	Examineur
M. S. HAMAI	Maitre de conférences, Université Blida 1	Examineur
M. BOULAH	Professeur, ENSSMAL, Alger	Examineur
A. BADIS	Professeur, Université Blida 1	Rapporteur

Blida, décembre 2013

## RESUME

Le présent travail a pour objectif d'étudier la toxicité des métaux lourds (Cadmium, Cuivre et Plomb) chez la moule africaine *Perna perna* Born 1780, choisie comme espèce sentinelle, *via* les mesures des niveaux de la catalase «CAT» (marqueur biochimique de défense antioxydant) et quelques paramètres physiologiques en mode aiguë et en mode chronique.

L'exposition aiguë des moules aux métaux lourds (Cu, Cd et Pb) a révélé une corrélation positive entre l'activité CAT et le gradient de contamination du milieu en métaux. De même, l'accumulation de ces métaux est proportionnelle à la concentration initiale ajoutée.

Ainsi, les résultats ont montré une perturbation physiologique pendant la période de contamination (augmentation des excrétions azotées et phosphorées). Par ailleurs, la décontamination (relargage des métaux accumulés) est remarquable et permet de réduire les niveaux d'activité antioxydante chez les moules déjà exposées aux métaux.

L'exposition chronique par la transplantation des moules en mer ont montré que l'induction de la catalase est influencée par les conditions environnementales et la pollution des milieux. En effet, une corrélation positive a été établie entre la concentration accumulée en métaux par les moules transplantées et le degré d'induction de l'activité de défense CAT. De plus, la décontamination des moules permet de réduire les concentrations des métaux bioaccumulés et l'activité CAT.

Cette étude a permis de qualifier la catalase comme biomarqueur de défense antioxydant : sensible, rapide et efficace dans l'évaluation de l'état de santé du milieu environnant et pourrait être intégré utilement dans un réseau pérenne de mesure en routine de la qualité et de la santé des écosystèmes marins.

Mots-clés : Métaux lourds, Pollution marine, Toxicité, Stress oxydatif, Biomarqueur, *Perna perna*, Biosurveillance.

## الملخص

الأعمال المنجزة و المعروضة في هذه المذكرة غايتها الرئيسية تتمثل في دراسة الآثار التسممية لبعض المعادن الثقيلة ( الكاديوم ، النحاس و الرصاص ) على نوع من ثنائية المصراع بلح البحر الإفريقي برنة برنة من خلال قياس مستويات الكتلانز ( إنزيم دفاع ضد الأكسدة الخلوية) و بعض المؤشرات الفيزيولوجية بواسطة الاختبار الحاد في المختبر وزرع أقطاف في البحر .

كشفت نتائج تعريض بلح البحر إلى المعادن الثقيلة ، وجود علاقة ايجابية بين تحريض الكتلانز و التدرج في تركيز المعادن الثقيلة في الوسط، وأيضاً تراكم هذه المعادن الثقيلة بشكل خطي بدلالة تركيزها الأولي الموجود في الوسط. وأظهرت النتائج اضطرابات فيزيولوجية تحت تأثير زيادة مستويات الملوثات المعدنية (زيادة الإفرازات في النيتروجين و الفسفور). وأظهرت نتائج أن نقل بلح البحر المتسمم بمعادن الثقيلة إلى وسط أقل تلوثاً يؤدي إلى نقص مستويات نشاط الإنزيم.

إن تحريض الكتلانز يتأثر بظروف البيئية و درجة تلوث المواقع المزروع فيها، حيث أبدت مختلف القياسات توافقاً ايجابياً بين مستوى تلوث المواقع المدروسة و درجة حث نشاط إنزيم الدفاع ضد الأكسدة الخلوية، حيث أن نسبة حث الإنزيم وجدت متناسبة مع كمية المعادن المتراكمة في جسم بلح البحر المزروع. بإضافة إن نقل بلح البحر المتسمم بمعادن الثقيلة إلى وسط أقل تلوثاً يؤدي إلى نقصها كما يؤدي في نقص مستويات نشاط الإنزيم.

هذه الدراسة تسمح بتأهيل الكتلانز كمؤشر بيوكيميائي حساس وفعال للدفاع ضد الأكسدة الخلوية بصورة سريعة وفعالة في تقييم صحة البيئة و يمكن إدماجها بشكل مفيد و فعال في إطار شبكة دائمة لقياس النوعية ومراقبة صحة الأنظمة البيئية البحرية.

الكلمات المفتاحية : المعادن الثقيلة ، التلوث البحري ، التسممية ، المؤشر البيوكيميائي ، الرصد البيولوجي ، الجهد التاكسدي.

## ABSTRACT

In this work we investigated the toxicity of heavy metals to study the toxicity of heavy metals (Cadmium, Copper, Lead) for the marine bivalve molluscs African mussel *Perna perna* (Born 1780) selected as sentinel species via the measures the levels of biochemical markers of antioxidant defense (catalase CAT) and some physiological parameters in acute and chronic mode.

Acute exposure to molds heavy metals (Cu, Cd and Pb) reveals a positive correlation between the activity of CAT and the gradient of metal contamination in the environment. Similarly, the accumulation of these metals is linear in function of the initial concentration added.

Thus, the results show a physiological disturbance as a result of metals (increased levels of nitrogen and phosphorus excretion). Moreover, the decontamination of molds is particularly interesting because it reduces activity levels of the antioxidant enzyme in mussels exposed to metals.

The induction of catalase is influenced by environmental conditions and pollution in areas where mussels were transplanted. Indeed, a positive correlation was found between the level of pollution in different localities of caging and the degree of induction of CAT activity of defense. Similarly, the antioxidant enzyme activities are found proportional to the concentration accumulated three heavy metals by mussels transplanted. In addition, mussels decontamination reduces bioaccumulated metal concentrations and antioxidant enzyme activities CAT.

This study supports the use of catalase as sensitive, rapid and effective, biomarker that can be used in water quality assessment, and could be integrated usefully in a perennial network of measurement in routine of quality and health of the Marins watery ecosystems.

Keywords: heavy metals, marine pollution, toxicity, oxidative stress biomarker, *Perna perna*, biological monitoring.

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie DIEU tout puissant qui m'a donné la volonté, la santé et la patience durant toutes ces années d'étude afin que je puisse arriver à ce stade.

Un grand merci au Professeur BADIS Abdelmalek de m'avoir accueilli au sein de son équipe et surtout de m'a confié un sujet si exaltant et à lui exprimer toute ma gratitude " toujours disponible, d'une gentillesse non mesurable, d'un dévouement inégalable et d'une patience remarquable".

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude aux membres du jury : Mr. BOURAS Omar, Professeur à l'université de Blida, Mr. AOUABED Ali, Professeur à l'université de Blida, Mr. HAMAIDI Mohamed Saïd, Maître de conférences à l'université de Blida et Mr. Boulahdid Mostefa, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral (ENSSMAL) qui m'ont honoré en acceptant de juger ce présent travail.

J'ai le grand plaisir d'exprimer ici mes reconnaissances aux personnes qui ont contribué de diverses façons à la réalisation des travaux présentés dans ce mémoire. Mes remerciements s'adressent spécialement à Monsieur S. Kourdali Doctorant et Attaché de recherche au CNRDPA, pour son aide précieuse et son encouragement, son support dans les moments difficiles, et surtout à son soutien moral et ses conseils, et les démarches administratifs pour l'organisation des campagnes d'échantillonnage des moules à Boumerdes. A Monsieur A. Meknachi Doctorant et Attaché de recherche au CNRDPA pour son aide et pour le soutien moral, les conseils et les propositions sur les expériences de contamination aux métaux et la transplantation et surtout pour toutes les discussions autour du thème des biomarqueurs. A Monsieur K. Fliti, directeur du CNRDPA pour m'avoir permis de réaliser mes travaux dans les meilleures conditions possibles. Merci également à Monsieur M.Djilali.

A tous les membres du laboratoire de CNRDPA, en particulier N. Bounakousse et S. Rebbani, pour leurs aides dans la réalisation de certaines manipulations.

Merci également à K. Khabber et Z. Abboura pour m'avoir accueillie au sein de la ferme aquacole d'Ain Tagourait pour lancer mes expériences malgré toutes les contraintes. Merci aussi au gardien au niveau de la ferme monsieur A. Mahiédine pour m'avoir facilité l'accès quelque soit le temps.

Merci également au pêcheur M. Mahieddine, pour leur collaboration lors des campagnes de transplantation et d'échantillonnage des moules à la plage Mahieddine d'Ain Tagourait, Merci beaucoup. Merci aussi à A. Azizi agent au port de Khemesti et l'unité de la marine nationale de Bouharoun.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur T. Tirèche, M. Moali et Monsieur O. Houas du laboratoire Régional Centre (ONEDD), pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et leur contribution dans la réalisation des dosages des métaux lourds.

Mes plus vifs remerciements vont à l'ensemble du département chimie industrielle de l'Université de Blida, et je tiens évidemment à accorder mon soutien et mon estime à mes collègues étudiants.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à mes parents et ma famille pour leur soutien et leur patience, en particulier mon frère jumeau Abdelkader pour son soutien moral et financier sans faille.

Enfin, un grand merci à tous ceux qui m'ont moralement ou pratiquement soutenue de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

## TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION .....	11
1. LES MÉTAUX TRACES ET STRESS OXYDATIF	
1.1. Définition de la pollution marine .....	13
1.2. Définitions, origine et importance des métaux .....	13
1.3. Niveau de contamination métallique dans certains secteurs de la côte algérienne .....	16
1.4. Comportement, distribution et devenir de Cd, Pb et Cu dans l'environnement aquatique .....	18
1.5. Effets de la pollution métallique sur les organismes aquatiques.....	20
1.6. Les métaux lourds et les moules des sites contaminés .....	21
1.7. Le stress oxydatif et les métaux lourds .....	24
2. L'ECOTOXICOLOGIE ET BIOSURVEILLANCE	
2.1. Ecotoxicologie .....	28
2.2. Moyennes d'évaluation du stress dans le milieu marin.....	28
2.2.1. Biosurveillance .....	30
2.2.2. Essais écotoxicologiques.....	31
2.2.3. Les indicateurs de stress oxydatif en tant que biomarqueurs de la pollution .....	32
2.3. Modèle biologique.....	35
2.3.1. Choix des mollusques bivalves.....	35
2.3.2. Biologie et écologie de <i>Perna</i> .....	36
2.3.3. Les rejets métaboliques des moules.....	37
3. MATERIELS ET METHODES	
3.1. Démarches expérimentales.....	40
3.1.1. Échantillonnage des moules.....	41
3.1.2. Acclimatation des moules.....	41
3.1.3. Test d'écotoxicité aiguë.....	42
3.1.4. Test de Contamination/Décontamination .....	43

3.1.5. Etude au terrain : Technique de transplantation.....	44
3.1.6. Méthodes analytiques.....	47
3.1.6.1 Analyses physicochimique et bactériologique.....	47
3.1.6.2 Analyses physiologique.....	49
3.1.6.3 Analyses biochimiques.....	50
4. RESULTATS ET DISCUSSION	
4.1. Test de toxicité de toxicité aiguë .....	53
4.1.1. Résultats des paramètres physicochimiques .....	53
4.1.2. Etude de l'effet des ETMs sur l'excrétion Azotée et Phosphorée.....	60
4.1.3. Résultats des dosages biochimiques et bioaccumulation.....	74
4.2. Résultats des tests contamination/décontamination.....	87
4.3. Résultats du test de transplantation des moules.....	92
4.3.1 Paramètres hydrologiques .....	92
4.3.2 Résultats bactériologique.....	97
4.3.3 Résultats des dosages biochimiques (CAT).....	99
4.3.4 Résultats des mesures biométriques.....	106
CONCLUSION .....	110
APPENDICES	
A. LISTE DES SYMBOLES ET ABRIVIATION	
B. DISPOSITIFS EXPERIMENTAL	
C. MODES OPERATOIRES, REACTIFS ET SOLUTIONS CHIMIQUES	
D. COURBE D'ETALONNAGES	
E. DESCRIPTION DES SITES D'ETUDES	
F. METHODE D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE	
G. RESULTATS	
REFERENCES	

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Séquence des effets éco-toxicologiques d'un polluant depuis les individus exposés jusqu'à l'écosystème pris dans sa totalité	16
Figure 1.2	Toxicité des métaux lourds et le stress oxydatif	26
Figure 2.1	Utilisation des bio-marqueurs pour évaluer l'intégrité de l'écosystème	29
Figure 2.2	Enzymes impliquées dans la défense oxydative	32
Figure 3.1	Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale et les différents types d'analyses effectuées	40
Figure 3.2	Dépositif expérimental	42
Figure 3.3	Schéma de déroulement de l'exposition et décontamination des moules aux métaux	43
Figure 3.4	Localisation de site de prélèvement et sites de transplantations	44
Figure 3.5	Compagnes d'échantillonnage (fréquence de visite, mesures <i>in situ</i> et analyses au laboratoire)	46
Figure 3.6	Schéma montrant les différents compartiments utilisés pour les différents dosages réalisés	52
Figure 4.1	Excrétion moyenne d'azote ammoniacal par les moules	61
Figure 4.2	Excrétion moyenne en nitrite par les moules	64
Figure 4.3	Excrétion moyenne en nitrate par les moules	66
Figure 4.4	Excrétion phosphorée moyenne par les moules	68
Figure 4.5	Variation des concentrations en protéines de <i>P. perna</i>	76
Figure 4.6	Variation des activités catalase de <i>P. perna</i>	78
Figure 4.7	Variation de l'activité CAT des moules en fonction des concentrations et le temps aux phases cont / décont	87
Figure 4.8	Variation des teneurs en sels nutritifs dans les sites de contamination	96
Figure 4.9	Variation de l'activité CAT durant la période d'étude	101

Figure 4.10	Variation de l'indice de condition (IC) dans les différentes localités de tests en fonction du temps	107
Figure 4.11	Variation de la croissance des moules durant la période d'étude	107
Tableau 1.1	Classification des métaux et des métalloïdes en fonction de leur toxicité et de leur disponibilité	14
Tableau 1.2	Flux d'éléments trace métalliques d'origine naturelle et anthropogénique entrants dans les océans, en millions de kg par an	15
Tableau 1.3	Concentrations d'éléments trace métalliques d'origine	17
Tableau 1.4	Classification du degré de pollution des ports algériens	17
Tableau 1.5	Les valeurs guides des métaux lourds dans les sédiments marins, dans l'eau de mer et chez la moule commune dans la zone OSPAR	18
Tableau 1.6	Distribution de quelques espèces chimiques du Cd, Pb, Cu dans l'eau de mer	19
Tableau 1.7	Quelques travaux de bioaccumulation de cadmium	22
Tableau 2.1	Modification de l'activité des enzymes antioxydantes chez <i>Perna viridis</i> exposés Cd, Cu, Pb	33
Tableau 2.2	Quelques facteurs hydrologiques optimaux pour le genre <i>Perna</i>	36
Tableau 3.1	Les concentrations choisies pour les bio-essais	43
Tableau 4.1	Concentration du Cadmium, plomb accumulé par les spécimens <i>Perna perna</i>	74
Tableau 4.2	Concentration du cuivre accumulé par les spécimens <i>Perna perna</i>	74
Tableau 4.3	Caractéristiques physico-chimiques des sites d'étude	92
Tableau 4.4	Valeurs moyennes des sels nutritifs en (mg/L) mesurés dans le site de référence et l'élevage en laboratoire	96
Tableau 4.5	Concentration des métaux accumulés par les spécimens	103

## INTRODUCTION

La pollution métallique est l'une des formes de pollution anthropique les plus dangereuses menaçant la zone côtière en Algérie dont les origines sont des industries de métallurgie et d'électrolyse (Zn, Hg, Pb), de tannerie et de papeterie (Cd, Zn, Cu, Hg, Cr et Ni), des eaux usées et du trafic maritime (Hg Zn, Cu, Cd, Pb et Ni), ainsi que de l'agriculture par usage abusif des pesticides (Cu, Zn et Hg) [1-3]. Sachant que ces métaux lourds sont des micropolluants qui peuvent affecter la salubrité du milieu marin, car ils ne subissent pas de dégradation biologique ou chimique. Ils peuvent, de ce fait, s'accumuler dans les différents compartiments des écosystèmes tels que les sédiments, et les biotes (animal ou végétal) [4-6].

La surveillance des écosystèmes aquatiques est exercé depuis plusieurs années afin d'éviter les conséquences parfois graves de la pollution. Les méthodes d'analyses physico-chimiques, bien que toujours plus performantes, atteignent leurs limites en tant qu'outils d'aide à la gestion environnementale. L'analyse chimique des polluants présents dans les différents compartiments des écosystèmes aquatiques n'est pas toujours possible du fait de la multiplicité des molécules présentes, et ceci souvent à des concentrations inférieures aux limites de détection analytique. Par ailleurs, une telle approche ne renseigne pas sur les risques encourus sur les populations animales ou végétales exposées aux polluants, et ne peut, à elle seule, prédire les effets biologiques des mélanges de contaminants (synergies), ni quantifier simplement la biodisponibilité des polluants pour les organismes vivants, et également ne pas tenir compte des phénomènes de spéciation, propres aux conditions physicochimiques du milieu marin [6-9].

De ce fait, le gestionnaire manque d'informations sur l'urgence des mesures à prendre pour améliorer l'état de santé de ces écosystèmes, ou protéger la biodiversité et l'intégrité des écosystèmes. Il est donc apparu nécessaire de compléter ces mesures par des données biologiques permettant d'évaluer de façon précise l'état des milieux et l'effet potentiel global des substances présentes dans le milieu vivant [7,8].

À l'heure actuelle, deux approches complémentaires, basées sur l'étude des organismes vivants, sont utilisées : les « bioindicateurs » et les « biomarqueurs ». Ainsi, les expérimentations en conditions contrôlées ont largement démontré que les biomarqueurs peuvent être utilisés pour évaluer l'exposition des individus à des xénobiotiques et, dans certains cas, les effets de ceux-ci sur les structures et les fonctions vitales de l'organisme. Ces bases expérimentales ont permis d'envisager l'utilisation des biomarqueurs dans le milieu naturel d'une façon complémentaire aux réseaux de mesures physico-chimiques [7,8]. Ces biomarqueurs ont déjà été largement utilisés lors des programmes de surveillance de la qualité des eaux littorales et l'évaluation de la pollution et préconise l'utilisation de moules, huîtres et palourdes comme espèces sentinelles de la pollution métallique à l'échelle mondiale, tels que : le RNO ( Réseau National d'Observation, 2004), le Mussel Watch (1986), le programme européen BIOMAR (1999-2006), "Biochemical Markers of Environmental Contamination in Marine Ecosystems", Med Pol : programme de surveillance pour la méditerranée (1988) [7, 9].

C'est dans cette optique que l'équipe de recherche « Environnement et Pollution » du laboratoire d'Ecosystème Aquatique au centre national de recherche et de développement de la pêche et de l'aquaculture (CNRDPA), s'est inscrit pour évaluer l'état de santé de la baie de Bouismail à travers le développement d'un programme de gestion des écosystèmes aquatiques. Des travaux ont été réalisés au niveau du centre sur le développement et la maîtrise des biomarqueurs au niveau des espèces bioindicatrices de pollution afin d'être utilisés dans l'évaluation de l'état environnementale des zones côtières algériennes [10-12].

Le présent travail a pour objectif principal d'étudier la toxicité des métaux lourds (Cadmium, Cuivre et Plomb) chez la moule africaine *Perna perna* Born 1780, choisie comme espèce sentinelle, via les mesures des niveaux de la catalase «CAT» (marqueur biochimique de défense antioxydant) et quelques paramètres physiologiques en mode aiguë et en mode chronique.

## CHAPITRE 1

### LES MÉTAUX TRACES ET LE STRESS OXYDATIF

#### 1.1. Définition de la pollution marine

La définition de la pollution marine la plus couramment acceptée est celle donnée par le groupe mixte d'expert chargé d'étudier les aspects scientifiques de la protection de l'environnement marin : " l'introduction directe ou indirecte, par l'homme, de substances ou d'énergie, dans le milieu marin (y compris les estuaires), lorsqu'elle a des effets nuisibles tels que dommages aux ressources biologiques, risques pour la santé de l'homme, entraves aux activités maritimes, y compris la pêche, altération de la qualité de l'eau de mer du point de vue de son utilisation et dégradation des valeurs d'agrément " [13].

#### 1.2. Définition, origine et importance des métaux

Les éléments traces métalliques sont des éléments dont la concentration dans la croûte terrestre est inférieure à  $1 \text{ g.Kg}^{-1}$ . Cette définition est aujourd'hui utilisée à la place du terme « métaux lourds » (métaux dont la masse volumique est supérieurs à  $4,5$  ou  $5,0 \text{ g.cm}^{-3}$ , et le numéro atomique est supérieur à 20), celle-ci étant une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni application juridique.

Les métaux sont réputés toxiques, alors que certains sont des oligo-éléments (Cu, Zn, Fe). C'est pourquoi le terme de métal lourd est souvent appliqué à tort à des éléments en raison de leur toxicité. De plus, certains éléments sont déclarés métaux lourds alors qu'ils sont des métalloïdes (Se, As) ou qu'ils ne sont pas « lourds » (Be, Al). Pour ces différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent à l'appellation métaux lourds, l'appellation « Eléments en traces Métalliques » (ETM) ou par extension « éléments traces » [6, 14-17].

Les exploitations des métaux sont très diversifiées, depuis les additifs de plomb dans les carburants jusqu'aux sels d'argent de l'industrie photographique, au nickel ou au cadmium des batteries d'accumulateurs, au zinc des gouttières ou au

chrome des aciers inoxydables, au cuivre de l'industrie électrique ou à l'arsenic des produits phytosanitaires [13].

Les phases d'élaboration, d'utilisation et/ou de recyclage de certains produits s'accompagnent de rejets, en quantité parfois non négligeable d'ETM dans les eaux continentales ou marines et dans l'atmosphère. Ainsi, ces éléments se retrouvent dans le milieu marin à la fois de façon naturelle (sources naturelles) mais aussi du fait de rejets d'origine humaine (sources anthropiques) [8,15, 18-20].

Les métaux traces essentiels sont des micronutriments essentiels à la vie et dont l'absence se traduit par un dérèglement d'une fonction de l'organisme qui ne peut être restaurée que par l'ajout du métal en question, cependant, un élément essentiel peut également être toxique lorsqu'il est présent à de trop fortes concentrations. Les métaux non essentiels (Cd, Hg, Pb) n'ont aucune fonction biologique connue (c'est-à-dire que ces métaux n'interviennent dans aucun processus métabolique). Ils sont considérés comme néfastes dès qu'ils sont présents dans le milieu et entraînent des effets biologiques délétères à de très faibles concentrations [15].

Dans un contexte écotoxicologique, Wood (1976) a proposé une classification des métaux et métalloïdes en trois catégories comme le montre le tableau 1.1 [15].

Tableau 1.1 : Classification des métaux et des métalloïdes dans un contexte environnemental [15].

Eléments Inoffensifs		Eléments très toxiques et relativement accessibles			Eléments toxiques mais insolubles ou très rares	
Ca	Na	Ag	Cr <sup>4</sup>	Se <sup>3</sup>	Ba	Re
Fe	Rb	Al <sup>2,4</sup>	Cu <sup>4</sup>	Sn <sup>4</sup>	Ga	Rh
K	Si	As <sup>3,4</sup>	Hg <sup>4</sup>	Te	Hf	Ru
Li	Sr	Au	Ni <sup>4</sup>	Tl	In	Ta
Mg		Be	Pb <sup>4</sup>	Zn <sup>4</sup>	La	Ti
Mn		Bi	Pd		Nb	W
		Cd	Pt		Os	
		Co	Sb			

Les flux de métaux entrant dans les océans et les mers constituent par la somme des rejets directs et les apports diffus (retombées), sont, tout comme les flux globaux, en majeure partie d'origine anthropique. Ainsi, d'après Glasby (1998) et Nriagu (1990) [21,22], les flux anthropiques de la plupart des métaux associés aux processus industriels dépassent les flux naturels au moins d'un facteur 10 (Tableau 1.2).

Tableau 1.2 : Flux d'éléments traces métalliques d'origine naturelle et anthropique entrants dans les océans, en millions de kg par an [21,22]

Métal	Origine naturelle	Origine anthropique	Facteur d'interférence
Cu	375	4460	11.89
Fe	25000	319000	12.76
Hg	3	7	2.33
Ni	300	358	12.83
Pb	180	2330	12.94
Sn	1.5	166	110.66
Zn	370	3930	10.62

Nriagu (1990) [22] voit dans la contamination métallique à l'échelle de la planète un problème majeur pour le futur. En effet, d'après cet auteur, chaque compartiment de l'environnement possède une capacité limitée de tolérance vis-à-vis de la toxicité des métaux, au-delà, les espèces sensibles à la pollution disparaîtront progressivement, ainsi, la difficulté d'évaluer les effets potentiels de toute perturbation sur un écosystème provient de ce que son action se manifeste simultanément à de nombreux niveaux d'organismes ainsi qu'à une multitude d'échelles spatiales et temporelles (Figure 1.1).

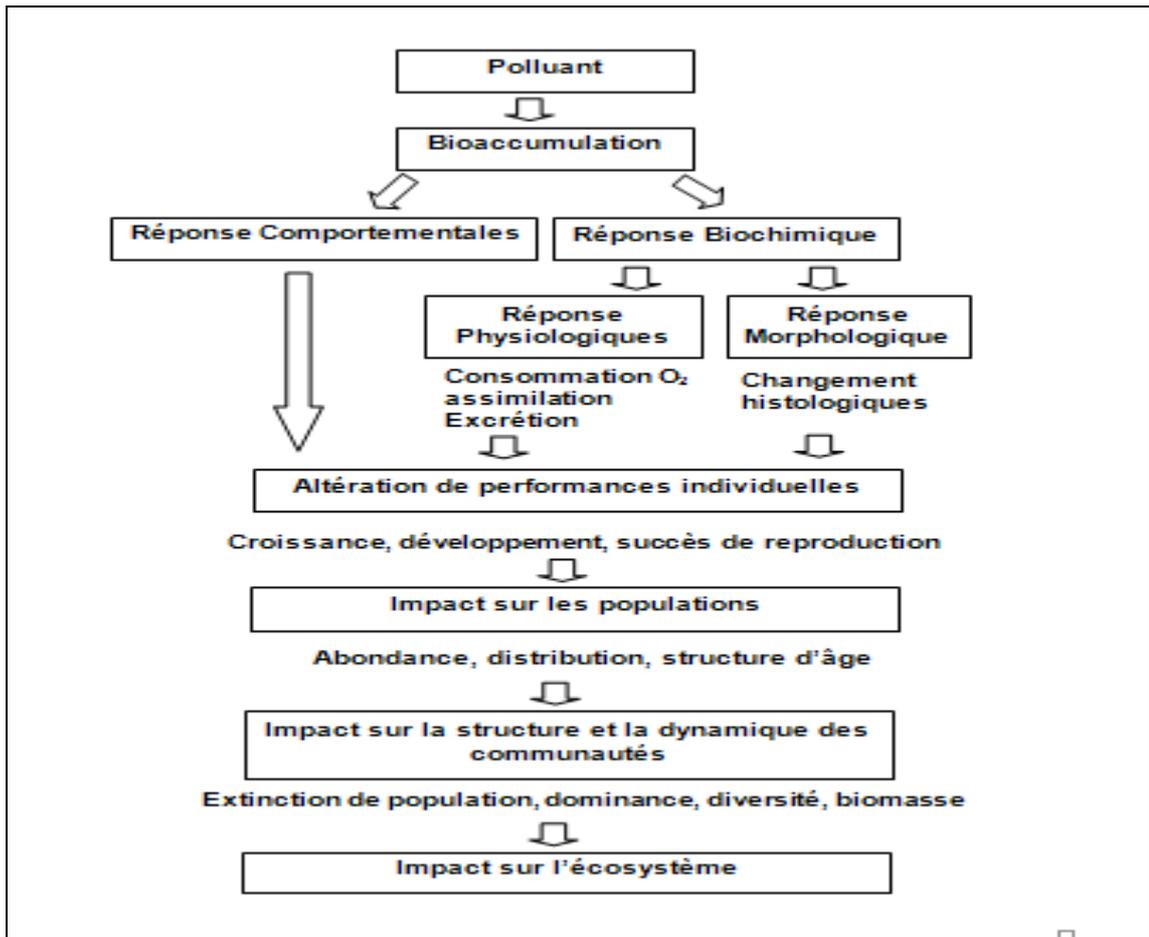


Figure 1.1 : Séquence des effets écotoxicologiques d'un polluant depuis les individus exposés jusqu'à l'écosystème pris dans sa totalité [23].

### 1.3. Niveau de contamination métallique dans certains secteurs de la côte algérienne

La synthèse réalisée par Grimes [24] dans le cadre du bilan national (MEDPOL /BDN.PASMED) à partir des données du laboratoire de chimie et de pollution marine de l'ENSSMAL, en particulier ceux de Asso [25], Chouikhi *et al.* [26], Amarouche et Debiche [27], Arar *et al.* [28], Boudjellal *et al.* [29-31], Djamaoui [32], Haliche et Sait [33], Rezzoug *et al.* [34], Sellali [35], Sellali *et al.* [36-38], révèle dans divers secteurs de la côte algérienne une pollution métallique localisée dépassant, souvent, les normes admises. Ces teneurs témoignent la présence des sources de pollution très localisées (Tableau 1.3).

Tableau 1.3 : Concentrations des métaux lourds d'origine anthropique dans les sédiments de quelques ports Algériens [3].

Ports	ETM ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sédiment)
Ghazouate	Zinc : $3540.59 \pm 1206.33$ ; Mercure : $3.87 \pm 1.79$ ; Plomb: $177.39 \pm 103.29$
Oran	Mercure : $0.83 \pm 0.31$ ; Cuivre : $88.74 \pm 23.07$ ; Zinc $217.85 \pm 41.94$
Alger	Plomb : $230.353 \pm 90.191$ ; Cuivre : $112.01 \pm 39.93$ ; Zinc : $338.342 \pm 103.737$ ; Cadmium : $0.883 \pm 0.225$ ; Mercure : 1.88 -10.74
Skikda	Mercure : $7.24 \pm 4.47$ ; Magnésium : 235.37-397.41
Bejaia	Cuivre : 22.87-25.48 ; Magnésium : 276.05-308

Le tableau 1.4 classe les ports algériens en fonction de leur degré de pollution.

Tableau 1.4 : Classification du degré de pollution des ports algériens [3].

Classification du sédiment				
Ports	ETM	HCT	PCB	Classification des eaux
Oran	***	***	***	*
Arzew	*	**	*	*
Bethioua	*	***	*	*
Mostaganem	**	**	*	**
Ténès	*	**	*	***
Alger	**	***	*	***
Bejaia	*	*	***	**
Jijel	**	**	*	*
Ancien port de Skikda	**	**	**	**
Nouveau port Skikda	***	*	*	**
Annaba	*	***	**	**

(\*\*\* : Très pollué, \*\* : Peu pollué, \* : Non pollué)

En absence de normes algériennes relatives a la qualité des eaux marines, mollusques bivalves et les sédiments marins dans les ports, nous avons pris

comme références l'arrêté du 14 juin 2000 de la France. Cet arrêté précise, des seuils pour les teneurs chimiques qui ont été établis par la France dans le cadre de la convention OSPAR (Tableau 1.5) [3].

Tableau 1.5 : Les valeurs guides des métaux lourds dans les sédiments marins, dans l'eau de mer et chez la moule commune dans la zone OSPAR.

Elément	Sédiments (mg.Kg de sédiments secs <sup>-1</sup> )	Eau de mer (ng.L <sup>-1</sup> )	Moules commune (mg.Kg-1 ww-1)
Cd	1.2-2.4	5-25	0.07-0.11
Pb	100-200	5-20	0.01-0.19
Cu	45-90	50-360	0.76-1.1

#### 1.4. Comportement, distribution et devenir de Cd, Pb et Cu dans l'environnement aquatique

Une fois arrivés dans l'environnement aquatique, les métaux se répartissent entre les différents compartiments de l'environnement aquatique (eau, solides en suspension, sédiments et biote). Les métaux lourds sont présents dans l'eau de mer sous diverses formes physiques (dissoutes, colloïdales, particulières) et chimiques (minérales ou organiques) [13].

Les principaux processus qui gouvernent la distribution et la répartition des métaux lourds sont : la dilution, la dispersion, la sédimentation et l'adsorption/désorption. Certains processus chimiques peuvent néanmoins intervenir également. Leur disponibilité change très fortement avec les paramètres environnementaux tels que la température, la salinité et le pH. La spéciation d'un métal dans le milieu marin représente un problème fondamental car sa biodisponibilité et par conséquent sa toxicité dépend de sa forme chimique. Ainsi à une salinité de 35 Psu, la majeure partie du chlorure de cadmium se transforme en un complexe neutre  $[CdCl_2]$  [9,13].

En milieu aquatique, les transformations du cadmium dans l'environnement dépendent d'un ensemble de paramètres physico-chimiques (la salinité, le pH, le potentiel redox, les caractéristiques sédiments logiques, la nature géochimique

des particules, la concentration en chlorure). En outre, en zone côtière lorsque les eaux douces rencontrent les eaux de mer, le cadmium est complexé par les chlorures ( $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CdCl}^+$ ,  $\text{CdCl}_3^-$  et  $\text{CdCl}_4^{2-}$ ). Pour une salinité faible, l'espèce  $\text{CdCl}^+$  devient majoritaire dans le milieu alors qu'en milieu marin, l'espèce  $\text{CdCl}_2$  est majoritairement présente [39, 40- 42,49].

Par ailleurs, les espèces de plomb dominantes dans l'eau de mer sont  $\text{PbCO}_3$ ,  $\text{PbCl}_2$  ou  $\text{PbCl}^+$ . Cette répartition ne tenant pas en compte la matière organique dissoute et le fait que le plomb, dans l'eau de mer, se trouverait essentiellement sous forme de complexes organiques labiles. De même que pour le mercure, le plomb peut-être méthylié par les bactéries dans les sédiments, mais ce phénomène revêt une moindre importance. Aussi, le plomb présente une forte affinité pour la matière particulaire. A peine 10 % du plomb se trouve sous cette forme dans l'océan. L'adsorption du plomb sur la matière particulaire est fonction du pH et augmente avec ce dernier [43].

Dans le milieu aquatique, le cuivre peut être présent sous différentes formes (ions libres hydratés, complexé par des ligands inorganiques ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), complexé par des ligands organiques (urée, acides aminés, composés humiques et fulviques), adsorbé sur des colloïdes inorganiques et organiques, précipité, adsorbé sur des particules organiques en suspension, inclus dans la matrice de particules minérales [6,39,42].

Dans le tableau 1.6, sont résumés quelques données sur les formes de cadmium, plomb et cuivre entre les différentes formes chimiques les plus probablement présents en l'eau de mer ( $7 < \text{pH} < 9$ , salinité 35 Psu, 25 °C, 1 atmosphère) [39].

Tableau 1.6. Distribution de quelques espèces chimiques du cadmium, plomb, cuivre dans l'eau de mer [39].

Espèces	$\text{Pb}^{2+}$	$\text{PbCO}_3$	$\text{PbCl}_2$	$\text{PbCl}^+$	-
%	2	80	3	11	-
Espèces	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{CuCO}_3$	$\text{Cu}(\text{OH})_2$	$\text{CuOH}^+$	-
%	1	8	90	1	-
Espèces	$\text{Cd}^{2+}$	$\text{CdCO}_3$	$\text{CdCl}_2$	$\text{CdCl}^+$	$\text{CdCl}_3^-$
%	2.5	> 3	51	39	6

Les métaux lourds sont absorbés tant par la faune que par la flore. Cette absorption pourrait provoquer une augmentation de la concentration du métal dans l'organisme. Si la phase d'excrétion est lente, il peut en résulter un phénomène d'accumulation biologique. Il a été démontré que quelques métaux, comme le mercure, subissent une amplification biologique au cours de leur progression dans la chaîne alimentaire [13].

#### 1.5. Effets de la pollution métallique sur les organismes aquatiques

Les métaux ont des effets divers sur les organismes aquatiques en fonction du métal et de l'organisme considéré [8, 15,44].

Le cuivre est un oligo-élément essentiel qui fait l'objet d'une homéostasie rigoureusement contrôlée. En revanche, en concentration excessive il peut se révéler toxique. Du point de vue du transfert dans les réseaux trophiques des écosystèmes, il a été généralement constaté que s'il existe une bioaccumulation non négligeable de ce métal chez les organismes aquatiques, il n'existe vraisemblablement pas de biosurveillance dans les chaînes alimentaires. Les manifestations de la toxicité du cuivre diffèrent également en fonction de sa spéciation [8, 15, 45,49].

Les effets néfastes du cuivre sur les organismes vivants se traduisent généralement par des modifications des paramètres biochimiques et des fonctions physiologiques. 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 [6,45 - 48].

Le cadmium ne possède aucun rôle biologique connu et s'avère être un toxique capable d'affecter un large spectre de composants cellulaires cibles (peptides essentiels tels que le glutathion, diverses métalloenzymes, ATPases, membranes lysosomales...). Il est susceptible d'interférer avec le métabolisme du calcium du fait de la similarité de leurs propriétés physico-chimiques. Le cadmium est également un mutagène et un cancérigène [15, 45,49]. Ce métal ne semble pas

être régulé chez les êtres vivants, à l'exception de certains microorganismes possédant un opéron spécifique contrôlé par le cadmium. Ce métal ne présente aucune toxicité aiguë pour les organismes aquatiques marins à des doses susceptibles d'être rencontrées dans le milieu (la sensibilité des crustacés serait supérieure à celle des mollusques et des poissons). Au niveau subléthal, des concentrations de 0,05 à 1,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , il n'existe pas d'intoxication en tant que tel. Cependant, il peut avoir un dysfonctionnement physiologique tel que des anomalies dans le développement embryonnaire et larvaire de certaines espèces, apparition de stress inhibant accroissance [6,49].

Ainsi, le plomb, n'a aucun rôle métabolique connu et ne semble pas être biologiquement essentiel ou bénéfique au métabolisme des êtres vivants. La toxicité des dérivés organiques du plomb est généralement supérieure à celle des formes inorganiques. Des effets sur le métabolisme respiratoire d'organismes marins ont été décrits, ainsi que des effets sur le système nerveux ou le fonctionnement des membranes biologiques [43,50].

Les doses létales du plomb, sous la forme de sel minéral, sont souvent supérieures à sa limite de solubilité dans l'eau de mer, c'est à dire 4  $\text{mg.L}^{-1}$ . Le plomb inorganique peut donc être considéré comme toxique (concentration létale de 1 à 10  $\text{mg.L}^{-1}$ ) ou modérément toxique (concentration létale de 10 à 100  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Les rapports de l'OMS fixent les concentrations inhibitrices de plomb pour la croissance des diatomées entre 1 et 4,4  $\mu\text{g.L}^{-1}$  et les teneurs létales en plomb tétralkylé sont en revanche beaucoup plus faibles: Les  $\text{CL}_{50}$  96 h sont en effet généralement inférieures à 1  $\text{mg.L}^{-1}$ , c'est à dire que cette forme va de très toxique à extrêmement toxique [8, 43,50].

#### 1.6. Effets des métaux lourds sur les moules dans les sites contaminés

L'aptitude des mollusques à accumuler les métaux lourds, à des concentrations plus élevées que le milieu environnant, de façon proportionnelle ou non à sa concentration dans le milieu, selon qu'il est essentiel ou non. Plusieurs études de terrain, comme celles de laboratoire, ont montré qu'on peut corrélérer les charges métalliques corporelles avec les concentrations dans le milieu. Ainsi, pour un métal essentiel, certains organismes peuvent maintenir sa concentration

constante dans l'organisme. C'est le cas du cuivre chez les crustacés et les poissons, et du zinc chez la plupart des organismes. Pour d'autres métaux non essentiels, cette proportionnalité ne peut être vérifiée : c'est le cas du cadmium chez les gastéropodes [7, 19,20, 51].

La bioaccumulation des métaux essentiels est donc un processus naturel, exigé par tous les organismes vivants afin de satisfaire à leurs besoins métaboliques. Chez les bivalves, toute la cavité palléale baigne dans le milieu environnant et le métal soluble est pris par le manteau et les branchies. Le métal particulaire est pris par le tube digestif. Il est difficile de faire la part entre les deux voies de prise, cela dépend de la spéciation très complexe du métal dans le milieu. Certains auteurs ont insisté sur l'importance de la voie indirecte (digestive) à cause de la capacité de filtration et d'ingestion des particules par les bivalves. Par contre, d'autres auteurs ont mis en évidence l'importance de la voie directe (branchie et manteau) [15, 41, 42, 51,52].

Le cadmium est sans aucun doute le métal le plus étudié, les connaissances le concernant sont par conséquent plus vastes que pour les autres éléments métalliques. Des recherches ont montré que l'accumulation du cadmium est linéaire en fonction du temps. Aucun plateau de saturation n'est observé dans le cas d'intoxications chroniques, même lorsque les concentrations dans le milieu expérimental sont faibles. Ceci a été vérifié aussi bien pour les bivalves marins (Tableaux 1.7) [49, 52, 53-55, 59].

Tableaux 1.7 : Quelques travaux de bioaccumulation de cadmium [55]

Concentrations ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Temps (jours)	Organismes
10 et 100	17	<i>Mytilus edulis</i>
100 et 200	7	<i>Perna viridis</i>
2000 et 4000	4	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
50, 75, 100 et 150	20	<i>Cerastoderma glaucum</i>
5 et 25	28	<i>Anodonta cygnea</i>
33 et 10	10	<i>Dreissena polymorpha</i>

En revanche, lors d'expériences non chroniques, la quantité de cadmium accumulée ne dépend pas seulement de l'intensité et du temps d'exposition mais également du régime d'intoxication et varie selon l'organe étudié. Ainsi, pour une même concentration moyenne dans le milieu, *Mytilus edulis* a accumulé plus de cadmium lors d'une exposition courte à une concentration élevée que lors d'une exposition prolongée à une concentration plus faible [15, 55].

Après intoxication expérimentale, le cadmium a pu être localisé dans la plupart des organes [55,56]. Chez *Ruditapes decussatus*, les études de contamination en Cd effectuées au laboratoire, ainsi que les études menées *in situ* ont montré d'une part, que les concentrations en Cd augmentaient avec sa teneur dans le milieu environnemental et d'autre part que l'ordre d'accumulation était : glande digestive > branchies > reste [55].

Le cas du cuivre est très différent de celui du cadmium pour deux raisons essentielles : Il s'agit d'un élément physiologique soumis à un contrôle métabolique efficace et le cuivre, sous sa forme cationique divalente, est très toxique vis-à-vis des mollusques bivalves [15, 55,57].

Des travaux de laboratoire ont montré que l'accumulation de cuivre, tout comme celle du cadmium, est linéaire en fonction du temps (la durée d'exposition), lorsque l'exposition est chronique. Cependant, il n'y a pas d'augmentation des concentrations dans les tissus pour de faibles niveaux dans l'eau. Pour des teneurs extérieures variant de 0.12 à 1 mg.L<sup>-1</sup>, et des durées de contact variant de 24 à 96 h, certaines espèces de mollusques atteignent des concentrations en cuivre de 50 à 113 mg. Kg<sup>-1</sup>. Ainsi, *D. polymorpha* n'a pas accumulé de cuivre pour des concentrations inférieures à 13 µg.L<sup>-1</sup>. La même caractéristique a été vérifiée dans le cas du zinc chez *Perna viridis* et pour ces deux métaux essentiels chez *Mytilus galloprovincialis*, lors d'un travail de terrain [15, 55, 57].

Le taux d'absorption du plomb est linéaire au cours du temps et fonction directe de la concentration en plomb dans le milieu. Incorporés dans l'organisme, les ions Pb<sup>2+</sup> entrent en compétition avec les ions Ca<sup>2+</sup>. La voie de détoxification et d'élimination du plomb est différente de celle des autres métaux, dans ce sens qu'elle ne fait pas intervenir de métalloprotéines [15, 55,57].

Après intoxication expérimentale, Marshall et Talbot [58], ont mis en évidence chez *Mytilus edulis* du plomb associé au calcium dans des cristaux mixtes de carbonates sous forme de concrétions extracellulaires du tissu branchial. Des dépôts cristallins ont également été visualisés par histochimie chez *D. polymorpha*, notamment au niveau des cellules rénales [55].

La forme minérale du plomb constitue une voie de détoxification efficace puisque le métal piégée est inerte. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, il semble que le plomb inorganique soit relativement facilement éliminé. La décontamination était de 35 % au bout de 30 jours pour des moules zébrées exposées à 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de plomb pendant 20 jours, elle atteint même 60 % en présence d'E.D.T.A dans le milieu. La capacité, d'élimination du plomb par les bivalves est confirmée dans des travaux de terrain [55,57].

Le lien entre la bioaccumulation et la toxicité est donc complexe puisque la totalité du métal accumulé n'est pas forcément sous une forme biologiquement active. En effet, alors qu'une fraction du métal peut agir sur des cibles sensibles, une fraction peut être présente dans l'organisme sous forme détoxifiée. Le métal une fois pris doit être détoxifié par l'organisme enfin de prévenir les manifestations de toxicité qu'il est susceptible d'induire. Il est évident que si la concentration du métal dans le milieu dépasse la capacité de détoxification de l'organisme, la toxicité ne pourra être complètement évitée, l'ion métallique étant capable de réagir très vite avec des sites électro-négatifs, notamment les enzymes, groupes SH sur les protéines grâce à leurs propriétés de liaison, conduisant ainsi à des changements dans les activités enzymatiques, les synthèses organiques et le métabolisme en général. Chez les organismes aquatiques, les métaux lourds s'accumulent à des taux élevés pouvant déclencher un stress environnemental oxydant [15, 41,51].

### 1.7. Le stress oxydatif et les métaux lourds

Le stress oxydatif est causé par un déséquilibre entre la production de dérivés réactifs de l'oxygène et la capacité du système de défense à neutraliser ces espèces ou de réparer facilement les dommages en résultant, la toxicité apparaît [15,60].

L'oxygène, nécessaire à toute forme de vie aérobie, peut se révéler toxique lors de sa transformation en espèces radicalaires très réactives. Ces composés sont formés par voie endogène (métabolisme basal) en petite quantité (moins de 5 %) au cours de la respiration cellulaire ou l'activité phagocytose ; ils peuvent également être générés à la suite d'un stress oxydant ou au cours de toute réaction mettant en jeu un transfert d'électrons, et sous différentes conditions environnementales (température, salinité) et en présence des xénobiotiques [15,60].

Des données récentes indiquent que la toxicité de la pollution dans les organismes aquatiques peut être associée à une augmentation de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces dernières, une fois formés, auront tendance à attaquer les lipides polyinsaturés des membranes plasmiques en leur arrachant un hydrogène, menant à une peroxydation lipidique et à une fragilisation des membranes cellulaires, dégradation protéique, inactivation enzymatique, adduits à l'ADN, etc. [15,60].

Les ions métalliques (essentiel/ étranger) peuvent stimuler la production de ROS *via* deux différents mécanismes, directs ou indirects. Le premier est leur interaction anormale avec une biomolécule (en bloquant des groupements fonctionnels essentiels de la biomolécule souvent des groupements thiol, en déplaçant des métaux/cations essentiels de leurs sites chez la biomolécule et en modifiant la conformation de la biomolécule) [15] (Figure 1.2).

Outre ce mécanisme général de liaison de métaux « inappropriés » à des biomolécules importantes, certains métaux susceptibles de subir des changements cycliques de leur état d'oxydation (ions de fer, de cuivre, de chrome, de cobalt, d'arsenic, de titane, de vanadium et de leurs complexes) peuvent générer directement la production d'espèces réactives d'oxygène telles  $O_2^-$ ,  $HO^\bullet$  et  $O_2^\bullet$  dans le milieu intracellulaire, qui peuvent donner des électrons au  $H_2O_2$ , induire ainsi un stress oxydatif (Réaction de type Fenton) (Figure 1.2). L'ion de métal oxydé peut être réduit par une réaction avec  $O_2^{\bullet -}$  pour former l'oxygène moléculaire, il résulte de la fission homolytique de liaison O-O du peroxyde d'hydrogène et peut aussi être produit par les réactions de Fenton et de Haber-Weiss :

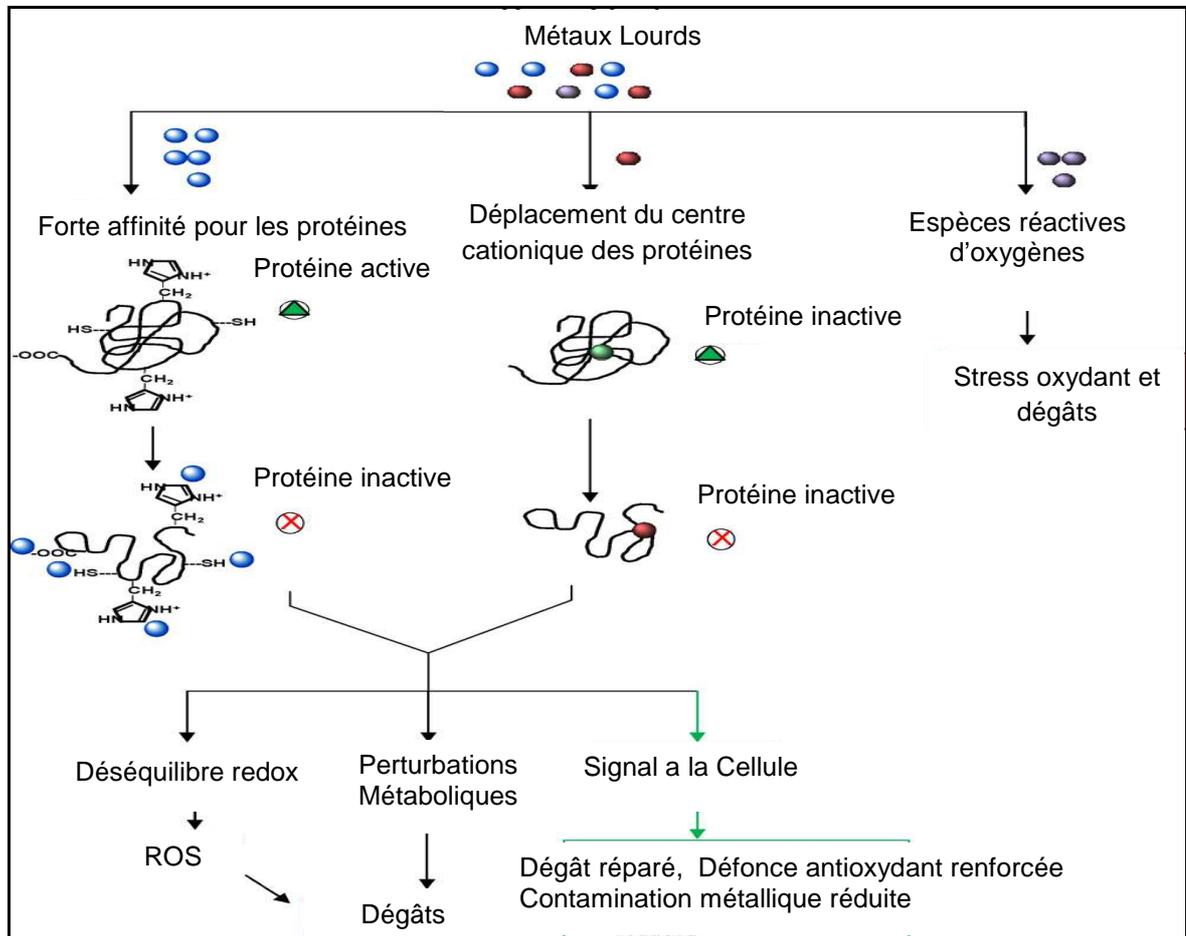
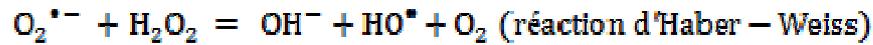
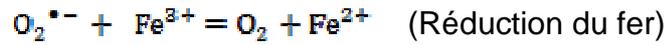
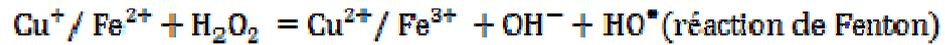


Figure 1.2. Toxicité des métaux lourds et le stress oxydatif chez l'organisme [61].

En effet, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  joue un rôle d'intermédiaire dans la production de nombreux ROS et, également, pour la formation du radical hydroxyle, *via* l'oxydation de métaux de transition (réaction de fenton), ainsi il peut réagir avec  $\text{O}_2^{\bullet -}$ , en présence de métaux de transition (catalyseurs), pour former également, *via* la réaction de Haber-Weiss, le radical  $\text{HO}^\bullet$  [15].

Le cadmium n'étant pas un métal de Fenton, (Réaction de type Fenton), il induit de façon indirecte la production de ROS et la peroxydation lipidique par interférence avec les systèmes antioxydants. Le cadmium, est connu pour générer des ROS due à leur effet inhibiteur sur le transport des électrons des

mitochondries et peuvent agir sur l'activité des enzymes mitochondriales telle que l'inhibition d'isocitrate déshydrogénase nécessaire pour la synthèse de l'ATP. En effet le cadmium peut entraîner une diminution de la quantité d'antioxydants (glutathion) ou de l'activité d'enzymes permettant de lutter contre le stress oxydant (superoxyde-dismutase, glutathion-peroxydase, catalase). Un autre mécanisme possible est l'augmentation de la concentration en fer ou en cuivre à suite de leur déplacement par le cadmium de métalloprotéines. A l'inverse du cadmium, ces deux métaux peuvent causer un stress oxydant direct par réaction de Fenton [15, 45, 60,62] .

D'autre part, le plomb induit un stress oxydatif dans les moules, ce qui suggère que le plomb, et d'autres métaux, peuvent induire la production de ROS, la peroxydation des lipides, et la dégradation de glutathion (des niveaux de glutathion bas ont été observés dans les moules exposées au plomb indiqué l'utilisation d'antioxydants pour le processus de désintoxication) [57].

L'un des effets le plus important des cations métalliques tel que le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le mercure (Hg) et l'argent (Ag) est l'inhibition de l'activité des ATP-ases Na-K dépendantes, avec des changements importants de l'homéostasie cellulaire. Les métaux lourds peuvent aussi altérer la structure de la membrane cellulaire en stimulant par exemple la peroxydation lipidique et en épuisant le contenu cellulaire en glutathion (GSH) nécessaire pour la protection contre le stress oxydatif [15, 57, 60,62].

## **CHAPITRE 2**

### **L'ECOTOXICOLOGIE ET LA BIOSURVEILLANCE**

#### 2.1. Ecotoxicologie

L'écotoxicologie se définit de façon concise comme étant la science qui traite de l'impact des composés chimiques sur les constituants des écosystèmes [15]. Elle regroupe des études physico-chimiques et biologiques, permettant de décrire le milieu étudié et de définir son niveau de contamination [15,59]. Récemment, Emilien Pelletier [15], a défini l'écotoxicologie moléculaire comme une branche de l'écotoxicologie, traite tout particulièrement des mécanismes fondamentaux de la défense cellulaire face aux stress du milieu et de l'application de la biochimie et de la biologie moléculaire aux problématiques environnementales complexes auxquelles notre société est quotidiennement confrontée.

#### 2.2. Moyens d'évaluation du stress dans le milieu marin et l'environnement

La nécessité de développer des stratégies de biosurveillance des milieux effectivement applicables par les gestionnaires conduit également à appliquer des approches raisonnées, avec un souci de ratio coût/efficacité le plus favorable possible [53]. En effet, l'utilisation d'organismes vivants, en parallèle des analyses physicochimiques, dans la surveillance de la contamination métallique du milieu marin a pris naissance jusqu'au début des années 1970. Ces organismes, considérés comme des bio-indicateurs (définis comme des espèces ou des groupes d'espèces, dont la présence et/ou l'absence, ainsi que l'abondance reflètent la qualité d'un milieu), permettent la détermination avec précision l'impact et la progression de l'action anthropique sur la vitalité des biocénoses [44,53].

Actuellement, l'utilisation de réponses biologique précoces, sensible et spécifique en écotoxicologie vis-à-vis une exposition chronique ou aiguë, à un stress environnemental est basée sur l'hypothèse que le temps de réponse biologique augmente avec le niveau d'organisation biologique [44]. Ainsi, d'après Van der Oost [63], les effets subcellulaires sont détectables avant les effets sur des

niveaux biologiques supérieurs, ainsi, les concentrations de métaux requises pour déclencher ces réponses sont bien inférieures à celles qui provoquent une crise dans l'organisme cible ou une dégradation visible de l'écosystème.

Plus récemment, en milieu marin, les biomarqueurs (défini comme une réponse au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale d'un organisme suite à l'exposition présente ou passée à un polluant) sont envisagés comme une contribution efficace à la classification des risques écologiques pour les écosystèmes, pour justifier d'une situation impactée, en partie par une pression toxique et qui peuvent apporter des informations sur la biodisponibilité des polluants et des effets qu'ils engendrent sur les organismes et les populations [15,64,65].

De plus, les biomarqueurs indépendamment de leur type (biomarqueurs d'exposition, d'effet et de dommage) doivent permettre de relier les processus des dommages moléculaires et cellulaires à des niveaux d'organisation supérieurs, afin de prédire des effets pouvant survenir au niveau populationnel et communautaire (Figure. 2.1) [44]. Afin d'obtenir une évaluation intégrée de l'impact d'effluent sur le milieu récepteur et l'écosystème, il est proposé de compléter la mesure de biomarqueurs par l'utilisation de bio-essais sur les réponses individuelles en termes de toxicité, survie et performances biologiques, le suivi d'espèces bio-indicatrices et le suivi d'indices biocénotiques et écologiques [64,66].

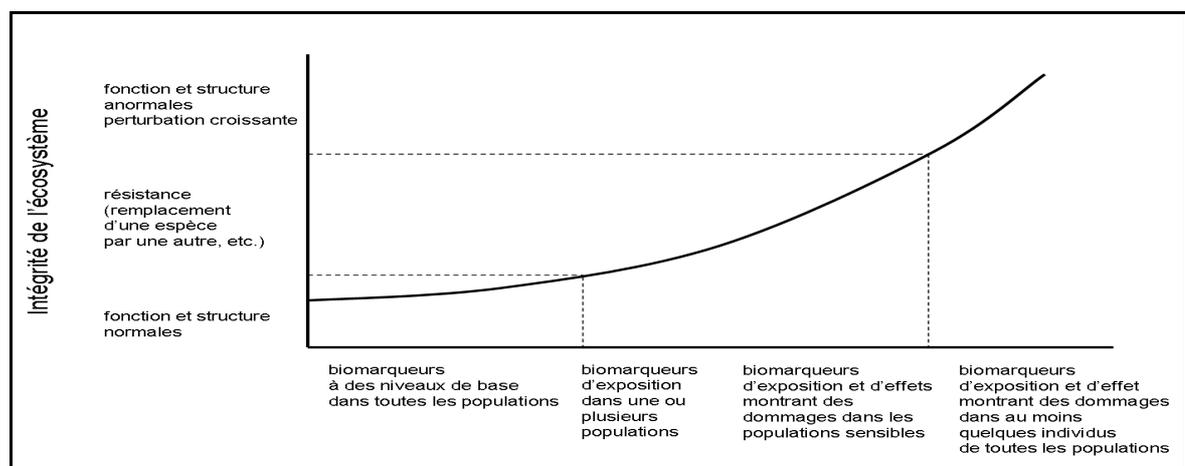


Figure 2.1: Utilisation des biomarqueurs pour évaluer l'intégrité de l'écosystème [44].

### 2.2.1. Biosurveillance

La biosurveillance peut être définie comme étant « l'utilisation à tous les niveaux d'organisation biologique d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre l'évolution ». Elle regroupe quatre concepts : biomarqueur (au niveau infra-individuel), bioindicateur (au niveau individuel), bioaccumulateur (au niveau individuel) et biointegrateur (au niveau populationnel ou communautaire) [7,64].

Les informations apportées par la mesure de biomarqueurs sur le terrain peuvent concerner des effets systématiques, générés par des causes multiples (contaminants chimiques, stressseurs biologiques, ressources trophiques, température, hypoxie...), ou des effets spécifiques, pour lesquels des hypothèses de causes chimiques peuvent être avancées. C'est sans aucun doute sur le compartiment, que le corpus de connaissances et de méthodes est le plus abondant, même si des outils et démarches similaires sont mis en œuvre sur le compartiment bactérien et algal [7,64].

Ainsi, le bioaccumulateur, situé au niveau individuel, a pour particularité de déterminer l'accumulation d'un élément à une concentration supérieure à celle du milieu sans pour autant qu'il y ait de dommages immédiats de la physiologie ou de la morphologie. Il est de fait utilisé comme matrice pour le dosage des polluants. Il peut également être utilisé pour l'étude des phénomènes biologiques résultant de l'accumulation de ces polluants [7, 42, 44].

Différentes stratégies peuvent être mises en œuvre pour la mesure de l'exposition et l'impacte de polluants sur les organismes à l'aide de biomarqueurs/bioaccumulateurs, d'une part des mesures sur des organismes autochtones (bivalves, poissons, crustacés, gastropodes), ou prélevés sur des substrats artificiels (biosurveillance passives), d'autre part des mesures sur des organismes exposés artificiellement (encagés) dans le milieu (biosurveillance active). La mise en œuvre d'organismes encagés ou prélevés sur supports introduits permet en particulier d'utiliser des individus connus (âge, maturité sexuelle.....) et de standardiser la durée d'exposition, ce qui facilite la comparaison entre organismes contrôles et exposés [44,64].

Selon Nimis [67], la biosurveillance ne prend toute sa valeur que lorsqu'elle établit une comparaison avec une situation témoin considérée comme « naturelle », évaluant ainsi un degré d'altération par rapport à une « normalité » pour une région donnée et en tenant compte des paramètres environnementaux.

Des moules ont été utilisées avec succès pour la surveillance de la contamination des milieux côtiers en polluants organiques et inorganiques et des programmes de surveillance ont été développés aux Etats-Unis [7,8], en Asie [68] et en Europe [66]. Récemment, l'étude de la bioaccumulation s'est étendue aux perturbateurs endocriniens, aux pesticides [69], substances pharmaceutiques et produits de soin [70], métaux lourds [15] et aux facteurs environnementaux qui peuvent induire le stress oxydatif dans les animaux aquatiques [15, 71-75].

### 2.2.2. Essais écotoxicologiques

Les tests écotoxicologiques au laboratoire (bioessais ou biotests) ont fait l'objet d'un développement et d'une standardisation conséquente afin de fournir des outils adaptés à l'évaluation des dangers des substances dans la démarche d'évaluation des risques et mettre en évidence les différents effets engendrés par les contaminants présents dans le milieu [6,66]. L'objet de tels essais est la mise en évidence d'effets toxiques sur des populations représentatives des écosystèmes et appartenant à des niveaux trophiques différents. Les moules présentent l'avantage d'être des organismes, de petites tailles, grégaires, communs et sessiles. Elles sont présentes en grand nombre dans de nombreux environnements et sont aisément manipulables. Ces particularités, associées à leurs caractéristiques d'espèce bioaccumulatrice, en font des organismes fréquemment utilisés pour la biosurveillance de l'environnement [6, 7,15].

Les expérimentations en conditions contrôlées ont démontré que les biomarqueurs peuvent être utilisés pour évaluer l'exposition des individus à des xénobiotiques et déterminer leurs effets sur les structures et les fonctions vitales de l'organisme [44]. Les biomarqueurs sont importants dans la détection des variations dues aux pollutions chez les organismes aquatiques. Ces perturbations peuvent être d'ordre physique (température, pH, ...), chimique (métaux lourds, pesticides, HAP, PCB...) ou d'origine climatique [20, 44,64].

Plusieurs espèces de mollusque bivalves sont utilisées dans les études de toxicologie de l'environnement comme *Dreissena polymorpha* [51], *Pyganodon grandis* [15], *Mytilus edulis* [66], *Mytilus galloprovincialis* [4,42], *Perna viridis* [57], *Perna perna* [20], *Ruditapes decussatus*, *Cerastoderma glaucum* et *Cerastoderma edule* [9].

### 2.2.3. Les indicateurs de stress oxydatif en tant que biomarqueurs de la pollution

Le rôle principal des biomarqueurs dans les études de biosurveillance est de fournir une réponse précoce à des effets délétères sur les systèmes biologiques et d'estimer les effets biologiques dus à des contaminants [64].

Pour se protéger contre le stress oxydant, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydants (Figure 2.2), qui visent : 1) à éliminer les espèces réactives et les catalyseurs de leur formation, 2) à induire la synthèse des antioxydants et 3) à augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées [15]. Les mollusques bivalves répondent à une contamination métallique par l'induction de plusieurs antioxydants, mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène telles que les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT), les peroxydases (GPx, GST) [15, 60,76].

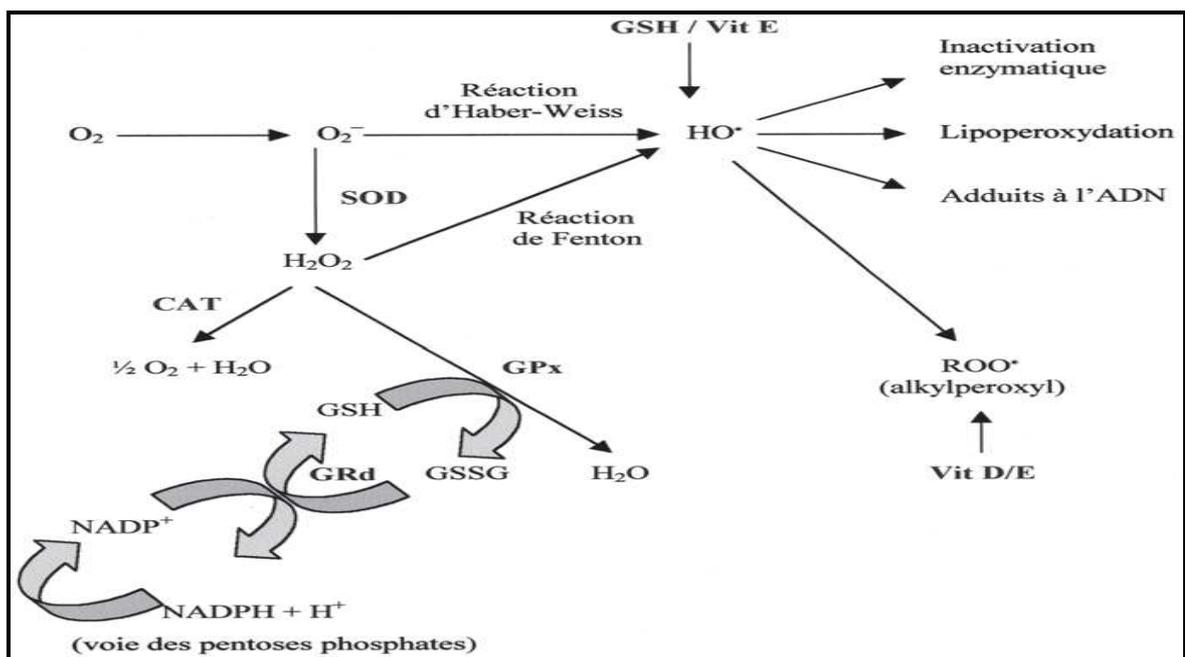


Figure 2.2 : Enzymes impliquées dans la défense oxydative [15].

Certaines études concernant le stress oxydant des bivalves (*Perna viridis*) exposés au cuivre, plomb et au cadmium sont répertoriées dans le tableau 2.1, avec le rappel des conditions d'exposition, des tissus étudiés, des paramètres contrôlés et des réponses obtenues. Ces enzymes ont été proposées comme biomarqueurs d'exposition dans des programmes de surveillance environnementale [7, 8,44].

Tableaux 2.1 : Modification de l'activité des enzymes antioxydantes chez *Perna viridis* exposés au cadmium, cuivre et au plomb [57,77].

Métaux	Temps	Organisme	Tissus	Réponses
Cd (0.5 mg.L <sup>-1</sup> ) (CL <sub>50</sub> )	1j, 7j, 15j et 30j	<i>Perna viridis</i>	GD, BR, ME	↑SOD, CAT, GST SOD plus ↑ dans ME CAT et GST plus ↑ dans GD
Cu 10 ,15 ,23 ,34 ,51 (µg.L <sup>-1</sup> )	30j	<i>Perna viridis</i>	Tissus totaux	↑ CAT, ↑GSH, ↑GST
Pb 10 ,15 ,23 ,34 ,51 (µg.L <sup>-1</sup> )	30j	<i>Perna viridis</i>	Tissus totaux	↑ CAT, ↑GSH, ↑GST

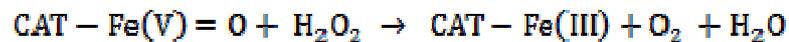
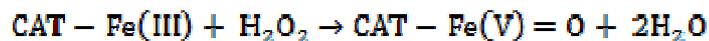
(Augmentation (↑), diminution (↓) par rapport aux témoins)

#### 2.2.3.1. Biomarqueur étudié : la catalase (CAT)

La catalase (CAT : EC1.11.1.6) est une hémoprotéine tétramérique qui possède un atome de fer par sous unité, chacune des sous unités (quatre chaînes polypeptidiques, contenant chacune plus de 500 acides aminés. Sa masse moléculaire est d'environ 240 KDa chez les mammifères. Ces groupes héminiques ferriques responsables de l'activité catalytique. Cette enzyme est présente chez tous les organismes aérobies, eucaryotes et procaryotes, et chez beaucoup d'organismes anaérobies. Chez les eucaryotes, elle est principalement située à l'intérieur des peroxysomes. Ces derniers contiennent également des oxydases, génératrices de peroxyde d'hydrogène. Le substrat de cette enzyme est l'eau

oxygénée  $H_2O_2$  [78,79-82]. Il représente un système efficace est donc afin d'éviter l'accumulation de peroxyde d'hydrogène résultant de l'activité de SOD et contenir un stress pro-oxydant. La catalase intervient lorsque la concentration en peroxyde d'hydrogène est assez importante car elle possède une faible affinité pour leur substrat, mais une très forte vitesse de réaction, catalysant la réaction [83].

La catalase, qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire, durant le métabolisme basal chez les organismes aérobies, mais aussi pour être stimulée de façon assez claire et rapide par les contaminants générateurs de stress oxydant. Elle est sensible à certains contaminants inducteurs de stress oxydatifs au niveau des membranes cellulaires, comme les HAP, les PCB, certains pesticides et les métaux, ce qui fait un biomarqueur largement utilisé. Il joue un rôle clé dans la protection des cellules contre les espèces réactives de l'oxygène, dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée selon les réactions suivantes [15, 78, 79, 84,85] :



Le stress oxydant se traduit par la formation de nombreuses espèces réactives de l'oxygène potentiellement toxiques dont l'activité CAT nous renseigne sur le degré d'altération de la cellule. Ainsi, cette activité augmente-t-elle aussi bien chez des poissons que chez des bivalves exposés à des polluants organiques. Par ailleurs, les travaux effectués sur les biomarqueurs de stress oxydant au laboratoire et surtout *in situ* montrent que le caractère aspécifique de leur réponse constitue un avantage comme indicateur d'un état de pollution mixte [65].

Certaines études ont montré que l'induction des biomarqueurs chez des bivalves témoins ou exposés à des contaminants pouvait avoir une spécificité tissulaire d'expression. Lors d'une étude réalisée pendant une période de 1 an chez la moule *Perna viridis*, il a été démontré que les activités de la CAT et des GST sont plus élevées dans la glande digestive par rapport aux branchies tout au long de l'année. Par contre, chez *Perna perna* les activités de la SOD et des GST sont

supérieures dans les blanchies et l'activité de la CAT se révèle plus élevées dans les glandes digestives [86].

### 2.3. Modèle biologique

Les mollusques, et plus particulièrement les bivalves, sont parfaitement désignés pour être employés comme espèces sentinelles dans la biosurveillance de la pollution, qui peuvent révéler précocement la présence et la toxicité d'un ou plusieurs polluants dans le milieu. On les considère parmi les organismes qui accumulent le plus de polluants dans l'environnement (un facteur de bioaccumulation de l'ordre de  $10^5$  a été rapporté dans certains cas chez *Mytilus edulis*). En effet, ces organismes sont des bioindicateurs utilisés pour révéler précocement la présence et la toxicité d'un ou plusieurs polluants dans le milieu. Ainsi, les mesures des contaminants chimiques dans les tissus de bivalves fournissent une évaluation de la biodisponibilité. En effet, celles-ci ne sont pas apparentes dans des compartiments tels que l'eau, les particules en suspension ou le sédiment [7, 8,20].

De nombreux travaux ont recommandé l'utilisation particulière des moules comme support biologique pour évaluer l'état de santé des écosystèmes aquatiques. Ces animaux ont été intégrés dans plusieurs programmes de biosurveillance comme le Mussel watch aux USA et le RNO en France [7,44].

#### 2.3.1. Choix des mollusques bivalves

Différents critères sont pris en compte pour le choix des mollusques bivalves en tant qu'espèces sentinelles, à savoir :

- Leur large distribution géographique, qui permet les comparaisons entre différents sites.
- Leur abondance, qui permet de réduire l'impact des prélèvements sur la structure et la densité de la population mais également de faciliter les prélèvements.
- Leur sédentarité, afin que l'état des individus puisse être directement corrélé avec le niveau de pollution du site [7, 8,42].

Le mollusque bivalve *Perna perna* (embranchement : Mollusques, classe : Lamellibranches, ordre : Fillibranches, famille : Mytilidae, genre : *Perna*, espèce : *Perna (Picta)*) a été utilisé pour la réalisation de notre présent travail. Cette espèce est largement répandue dans le monde puisqu'on la rencontre sur les côtes est et ou est de l'atlantique tropical et subtropical : Mauritanie, Sénégal, Congo, Angola, Amérique du sud (Antilles, Guyane, Brésil, l'Argentine) et sur les bords de méditerranée (Côte d'Afrique du Nord : Algérie, Maroc, Tunisie) [87].

### 2.3.2. Biologie et écologie de la moule *Perna*

Le tableau 2.2, résume quelques facteurs hydrologiques optimaux pour le genre *Perna*.

Tableau 2.2 : quelques facteurs hydrologiques optimaux pour le genre *Perna* [87].

Facteur	Salinité (Psu)	Température (°C)	Courants d'eau (m.s <sup>-1</sup> )	Profondeur (m)	MES (mg. L <sup>-1</sup> )
Valeur optimum	19 à 44	7,5 à 32,5	0,17 à 0,35	0 à 4	1200

Les moules sont des microphages qui se nourrissent de plancton et de particules de matière organique en suspension dans l'eau qu'elles filtrent. Les branchies constituent l'organe clé dans la mesure où elles assurent la filtration. Leur forme en lamelles et les battements de leurs cils permettent l'acheminement des divers éléments nutritifs contenus dans l'eau de mer vers le tube digestif. Le taux de filtration est sous l'influence de facteurs intrinsèques (régulation hormonale, âge, ...) et extrinsèques (conditions du milieu). On l'évalue par le volume d'eau que filtre un individu en mL.g<sup>-1</sup> de poids sec.min<sup>-1</sup> (chez un individu adulte de 50 à 60 mm = 40 à 100 mL.g<sup>-1</sup> de poids sec.min<sup>-1</sup>). Cette propriété de filtration peut être influencée par le stress environnemental exercé par le milieu et est utilisée comme un indicateur biologique témoignant d'un stress général sur ces organismes [20, 87,88].

La croissance constitue aussi un indicateur physiologique (détermination du rapport entre les niveaux de production et la croissance) qui peut être utilisé pour renseigner sur l'état de santé du milieu [20, 87,88].

### 2.3.3. Les rejets métaboliques des moules

Tous les animaux tirent leur énergie de la consommation de molécules complexes. Ces molécules sont métabolisées par l'animal qui assure ainsi ses fonctions physiologiques (croissance, reproduction...). Le rendement de ces réactions biologiques étant inférieur à 100%, une partie de l'énergie absorbée par l'animal est excrétée sous forme de déchets métaboliques sous forme dissoute et particulaire [89].

#### 2.3. 3.1. Les rejets particulaires ou égestion

C'est la fraction de nourriture consommée rejetée sous forme de pseudo-fèces et de fèces. Les pseudos-fèces, sont le résultat, à court terme, du conditionnement mécanique de la nourriture par les branchies et les palpes labiaux au cours duquel se produit un enrichissement dû à des sécrétions mucilagineuse. Les fèces, sont le résultat, à plus ou moins long terme, de la transformation résultant de l'action de la digestion, de l'absorption et de la desquamation du tube digestif. Les bio-dépôts sont l'ensemble des fèces et pseudo fèces [89].

#### 2.3.3.2. Les rejets dissous ou excrétion des métabolites

L'excrétion de substances organiques peut comporter soit des produits non anabolisés directement rejetés après l'absorption, soit des produits d'excrétion liés au catabolisme tissulaire. Ces deux fractions ne sont différenciables que dans le cas d'un jeûne strict où tous les produits d'excrétion sont issus du catabolisme qu'il soit oxydatif ou anaérobie. L'estimation de l'énergie excrétée est souvent négligée ou réduite à l'excrétion azotée [89].

L'excrétion est en partie responsable des rejets solubles. Ceux-ci sont surtout constitués de substances phosphorées ou azotées, selon les différentes voies d'excrétion dont ils proviennent. Les composés azotés sont l'un des sous-produits métaboliques majeurs, ce sont, les produits finaux de catabolisme des protéines et des acides aminés, et l'excrétion azotée des moules est principalement sous forme d'ammoniaque ( $\text{NH}_3$ ) et d'urée ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ). Parmi les déchets azotés, l'ammoniac qui est le produit d'excrétion majeure, Il est établi que l'excrétion

azotée est dominée chez les invertébrés aquatiques (bivalves, gastéropodes, céphalopodes) par l'ammoniaque, il constitué de 60-90% de l'excrément azoté total dans les bivalves. Ces sous-produits formés à l'intérieur des cellules doivent être éliminées car leur accumulation est toxique pour l'organisme lui-même [79].

C'est le cas par exemple chez *Mytilus*, qui montre des produits d'excrétion azotés dont 80 à 90% sont constitués de  $\text{NH}_4^+$ , le reste étant sous forme d'urée et d'acides aminés [41]. Bayne [81] a démontré que le taux d'excrétion d'azote sous forme ammoniacale chez *Mytilus edulis* est de 67,2 mg/Kg/jour.

D'après les travaux de Vincendeau [83], l'urée ne représente en moyenne que seulement 20% des rejets totaux chez *C. gigas*, avec toutefois des valeurs comprises entre 1 et 84%. Bien que plus faible que l'excrétion uréique, l'excrétion ammoniacale constitue la forme prédominante de l'azote inorganique dissous excrété et peut représenter pour les moules, une perte correspondant parfois à 66% de l'azote total consommé.

En milieu aqueux, il existe un équilibre entre deux formes de l'azote ammoniacal : l'ion  $\text{NH}_4^+$  et la forme non ionisée  $\text{NH}_3$  dite ammoniac libre qui est la seule forme toxique pour les êtres vivants. Aussi à des valeurs de pH de l'ordre de 7 à 8, la grande majorité de l'ammoniac est hydrolysée pour former de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). L'urée est également susceptible d'être hydrolysée (processus que l'on appelle l'uréolyse) et ainsi former de l'ammoniac puis de l'ammonium. Cet ammonium, produit de l'excrétion des mollusques, peut être utilisé ensuite en présence d' $\text{O}_2$  par les bactéries *via* le processus de nitrification pour former des nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) [79].

Par ailleurs, l'ammonium excrété par les animaux en élevage est utilisé pour effectuer ses synthèses protéiques par le phytoplancton, lui-même source principale d'alimentation des filtreurs. Toutefois, la quantité d'ammonium excrétée par les élevages, correspond à la part d'azote inorganique dissous qui retourne dans la colonne d'eau (recyclée), et qui est directement utilisable par les populations phytoplanctoniques. En effet, bien que certaines espèces d'algues soient capables d'assimiler directement de l'urée, de façon générale, l'assimilation à lieu après l'uréase, soit donc après transformation de l'urée en ion ammonium [90].

Les phosphates sont produits également par l'excrétion des mollusques, il peut en constituer jusqu'à 74% [84,91]. Les ions phosphates jouent un rôle important chez les organismes euryhalins, et les animaux ont une tendance pour la rétention des ions phosphates en réponse à diminuer la salinité [84].

L'excrétion des ions phosphate par les organismes marins contribués à augmenter des niveaux de phosphate dans l'eau [84] comme signalé Richard *et al.* [91].

#### 2.3.3.3. Facteurs influençant l'excrétion des mollusques bivalves

L'excrétion et la respiration chez les organismes marins sont considérées des facteurs important pour l'évaluation de statue physiologiques. La respiration représente un indice physiologique important, car il reflète le métabolisme et a une signification vitale pour les fournitures énergétiques cellulaires, tandis que l'excrétion est essentielle de quantifier le bilan énergétique d'un organisme [84,91]. Chez la moule, l'énergie excrétée représente moins de 5% de l'énergie total [84, 91-93].

Les activités physiologiques des organismes marins sont sujet à des variations associées à des facteurs intrinsèques (l'âge, taille) et environnementaux (saison, hydrographiques : la température et la salinité). Par ailleurs, la présence de polluants dans l'eau de mer peut affecter différents paramètres physiologiques des animaux, tel que la consommation d'oxygène et l'excrétion d'ammoniac. Ainsi, le cycle saisonnier de taux d'excrétion d'ammoniac chez *M. edulis* semble être lié à l'état physiologique et de la reproduction, contrairement au taux de consommation d'oxygène [84,85, 91, 93,94]. Dans les travaux de Masilamoni *et al.* [84], le taux d'excrétion chez *Perna viridis* a été trouvé positivement corrélé avec la température et avec le taux de respiration. Aussi, une augmentation de l'excrétion d'ammoniaque était clairement le résultat d'une augmentation du catabolisme des protéines, à son tour, être liées au cycle de reproduction. Par ailleurs, l'excrétion phosphorée chez *P. viridis* a montré une diminution de façon significative avec la diminution de la salinité.

## CHAPITRE 3

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 3.1. Démarche expérimentale

Des expositions de moules à différentes concentrations de métaux lourds au laboratoire avait pour objectif d'étudier les processus de base qui caractérisent un organisme bioindicateur, notamment ses capacités d'accumulation et ses réponses enzymatiques (activité anti-oxydante catalase) face à la présence d'un xénobiotique dans le milieu.

Une étude de bio-surveillance active par la transplantation de moules a été réalisée dans trois sites de la baie de Bou-Ismaïl pendant 35 jours dans le but d'étudier le biomarqueur en fonction des variations dues au degré de pollution. Parallèlement aux mesures de biomarqueur (catalase), un suivi des paramètres physicochimiques ( $T^\circ$ , pH, Salinité,  $O_{\text{diss}}$ ) et biométriques a été réalisé. La figure 3.1 récapitule la démarche expérimentale des différents types d'analyses effectuées.

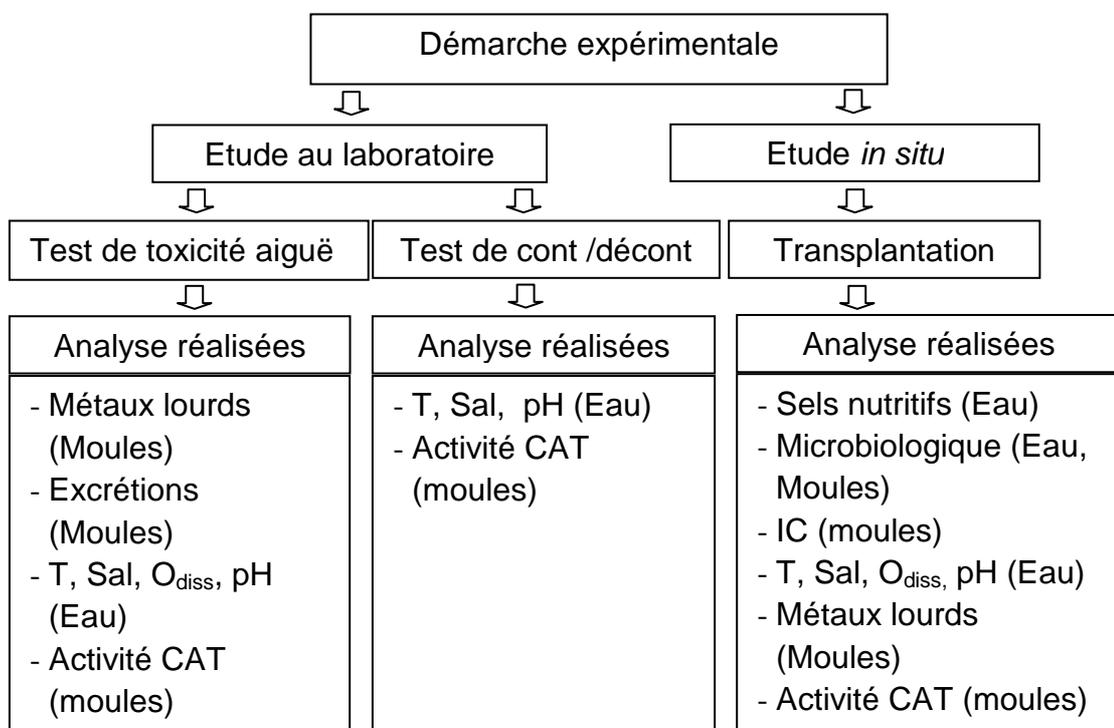


Figure 3.1 : Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale et les différents types d'analyses effectuées.

### 3.1.1. Échantillonnage des moules

L'échantillonnage des moules s'effectuait sur une moulière naturelle (gisements naturels) située près de la plage de la ville des Figuiers (Wilaya de Boumerdès). Les coordonnées géographiques de positionnement du site sont : latitude : 36°46'05.38' Nord, longitude : 3°28'37.92' Est. Ce site a été sélectionné comme site de l'approvisionnement en matériel biologique en raison, d'une part, de l'abondance de moules facilitant la collecte, d'autre part, de son éloignement d'une zone industrielle et/ou urbaine.

Les moules sont détachées de leur support rocheux, sur lequel elles se sont fixées avec un couteau en inox, sans altérer la vitalité des animaux. Une première appréciation de la taille permet de ne garder que les moules de la classe de taille 4,5 à 5,5 cm. Les critères de choix de tailles sont d'ordre biologique, mais également pratique [95]. Les moules récoltées ont été transportées au laboratoire de la ferme mytiliculture d'Ain Tagourait (Wilaya de Tipaza), (Elevage Aquacole Méditerranéen : EAM), dans une glacière étanche et hermétique contenant l'eau de mer du même site.

### 3.1.2. Acclimatation des moules

Une fois transportées au laboratoire, les moules sont soigneusement rincées au niveau du site de référence (EAM). Par la suite, les moules ont été mesurées et en gardant que celle de taille de 4.5 à 5.5 cm. Après le tri, les spécimens ont été transférées dans des bacs (en polystyrène) remplis d'eau de mer (60 individus/25 L) et aéré pour réduire l'effet du stress dû au transport (Appendice B).

Une période d'acclimatation de 15 jours a été respectée avant tout test de contamination afin d'adapter les moules aux nouvelles conditions du laboratoire. Pendant cette phase d'acclimatation, l'eau des bacs (eau d'élevage) est renouvelée chaque jour pour assurer l'apport des nutriments aux individus.

### 3.1.3. Test d'écotoxicité aiguë

Les solutions mères des métaux (Appendice C) sont préparées à  $1 \text{ g.L}^{-1}$  ou  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  (selon les concentrations recherchées pour chaque essai) dans d'eau distillée ( $\sigma < 0,05 \text{ mS.cm}^{-1}$  à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Pour chaque essai de toxicité (écotoxicité) aiguë à concentration multiples, nous avons utilisé un bac (en polystyrène :  $42 \times 28 \times 19 \text{ cm}^3$ ) témoin et des bacs d'exposition au polluant métallique (plomb, cuivre et cadmium) à différentes concentrations. Pour chaque bac, les moules sont réparties aléatoirement, à raison de 15 moules dans 20 litres d'eau de mer.

Les individus de moules *Perna perna*, sont exposés pendant 72h aux différents concentrations de solutions métalliques, dans l'eau de mer, et selon un mode statique avec un changement journalier de l'eau de mer. Le système adopté est nommé système d'intoxication statique [41]. Une aération permanente de l'eau des bacs est assurée en employant une pompe à air (aérateur : modèle : HG-090, rendement :  $12 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ , dimensions  $176 \times 206 \times 215 \text{ mm}^3$ ). Ce système offre l'avantage d'être peut coûteux et simple à réaliser. La figure 3.2 montre le dispositif expérimental.

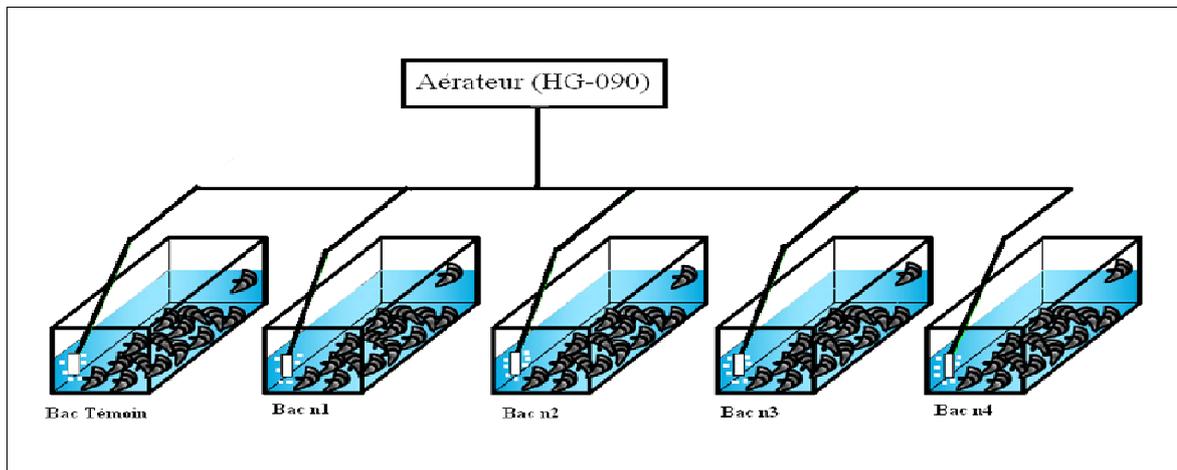


Figure 3.2 : Dispositif expérimental utilisé pour le test d'écotoxicité aiguë

Les gammes de concentrations testées sont regroupées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Les concentrations choisies pour les bio-essais.

Expositions	[Cu <sup>2+</sup> ] (mg.L <sup>-1</sup> )	[Pb <sup>2+</sup> ] (mg.L <sup>-1</sup> )	[Cd <sup>2+</sup> ] (mg.L <sup>-1</sup> )
Exposition (E <sub>1</sub> )	0.005, 0.015, 0.025 et 0.035	0.05, 0.1, 0.15 et 0.2	0.05, 0.1, 0.15 et 0.2
Exposition (E <sub>2</sub> )	0.05, 0.1, 0.2 et 0.3	0.25, 0.5, 1 et 2	0.25, 0.5, 1 et 2
Exposition (E <sub>3</sub> )	0.5 et 1	3, 4, et 8	3, 4, 6 et 8

#### 3.1.4. Test de Contamination/Décontamination

Dans cette partie, les concentrations n'ayant pas montrés un effet létal dans les tests de toxicité sont repris et testées de nouveau à d'autres individus pendant trois jours comme cycle de contamination, puis une décontamination pendant dix jours. Les concentrations étudiées sont les suivantes : cuivre à 5 et 15 µg.L<sup>-1</sup>, plomb à 0,5 et 2 mg.L<sup>-1</sup>, cadmium à 0,5 et 2 mg.L<sup>-1</sup> et un mélange de ces derniers, dont 15 µg.L<sup>-1</sup> du cuivre et 2 mg.L<sup>-1</sup> également pour le plomb et le cadmium.

Le déroulement des expérimentations s'est fait de la même manière pour les études de test d'écotoxicité. Cependant, après exposition, les moules sont transférés dans des bacs propres remplis d'eau de mer sans métaux lourds.

Le suivi des analyses de l'eau de mer (l'eau d'élevage) et des moules a été effectué au début des expérimentations (t = 0) et après 3 jours d'exposition, pour la décontamination après 1 jour, 3 jours, 7 jours et 10 jours (Figure 3.3). A chaque expérimentation, un lot de 3 moules non exposées (témoin) et 2 lots de 3 moules exposées sont prélevée et analysées (Activité CAT et Protéines).

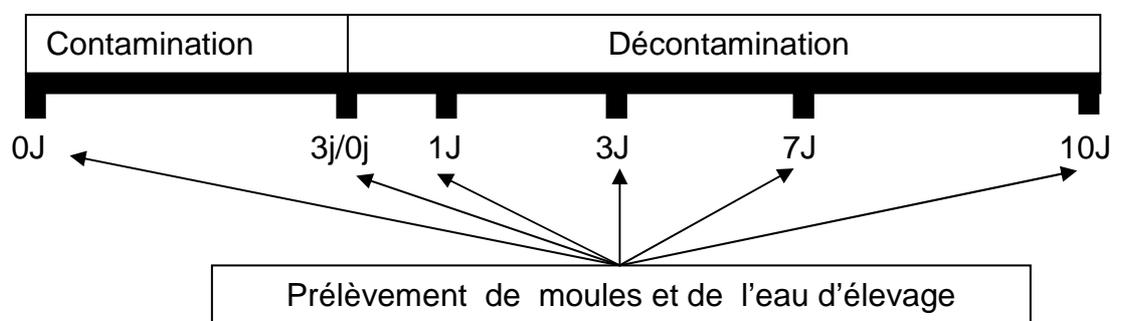


Figure 3.3 : Schéma de déroulement de l'exposition et décontamination des moules aux métaux.

### 3.1.5. Etude sur terrain : technique de transplantation

Les moules sont réparties en quatre lots de 15 individus dans des poches, et mises dans des cages rectangulaires en plastique présentant des mailles de 0,5 mm et de dimension 80cm×60cm (Appendice B). Les cages sont suspendues dans l'eau de mer à l'aide d'une corde (qui traverse le tube PVC de diamètre de 30 mm fendus au long de sa longueur et enfilé sur la partie supérieure) reliés à un flotteur. Les stations sont attachées à un support fixe au niveau du port. Nous avons veillé à ce qu'elles soient complètement immergées tout au long de l'expérience à l'aide d'un lest. La profondeur d'immersion comprise entre 1,0 m et 1,5 m.

Le transport des moules du laboratoire vers les sites d'implantations s'effectue dans une glacière remplie à un tiers avec de l'eau de mer de site  $S_R$  (site de référence dans des concessions ostréicoles d'Ain Tagourait). Les cages ont été transplantées sur deux sites portuaires contaminés ( $S_1$ : Port de Bouharoun,  $S_2$ : Port de Khemesti, Appendice E) de 25 Mars à 15 Avril 2012, et puis transférées et transplantées dans un site propre ( $S_R$ ) pour un suivi de décontamination de 15 j (15 à 30 Avril 2012). Une cage a aussi été placée sur le site de référence  $S_R$ , dans le but d'intégrer l'effet de la mise en cage sur la bioaccumulation des métaux et sur le biomarqueur des animaux témoins (25 Mars à 30 Avril). Le choix des sites portuaires (Figure 3.4) est basé sur leur degré de contamination et, aussi, sur la faisabilité de l'expérience afin de minimiser les pertes en cages (Appendice E).

Différentes campagnes d'échantillonnages (fréquence de visite, mesure *in situ* et analyse au laboratoire) vers les différents sites de transplantation sont illustrées dans la figure 3.5. En effet, un lot témoin (15 moules pour les analyses chimiques et biochimiques) a été constitué au début de l'expérience pour déterminer les conditions initiales. Ensuite, 15 individus par prélèvement sont récoltés dans chaque site de transplantation après : 7, 14, 21 et 35 jours d'exposition (d'immersion) pour l'analyse biochimique et métaux lourds. Des prélèvements de l'eau de mer ont été réalisés aux niveaux des différents sites sur les couches superficielles pour les analyses physicochimiques et bactériologiques (Figure 3.5).

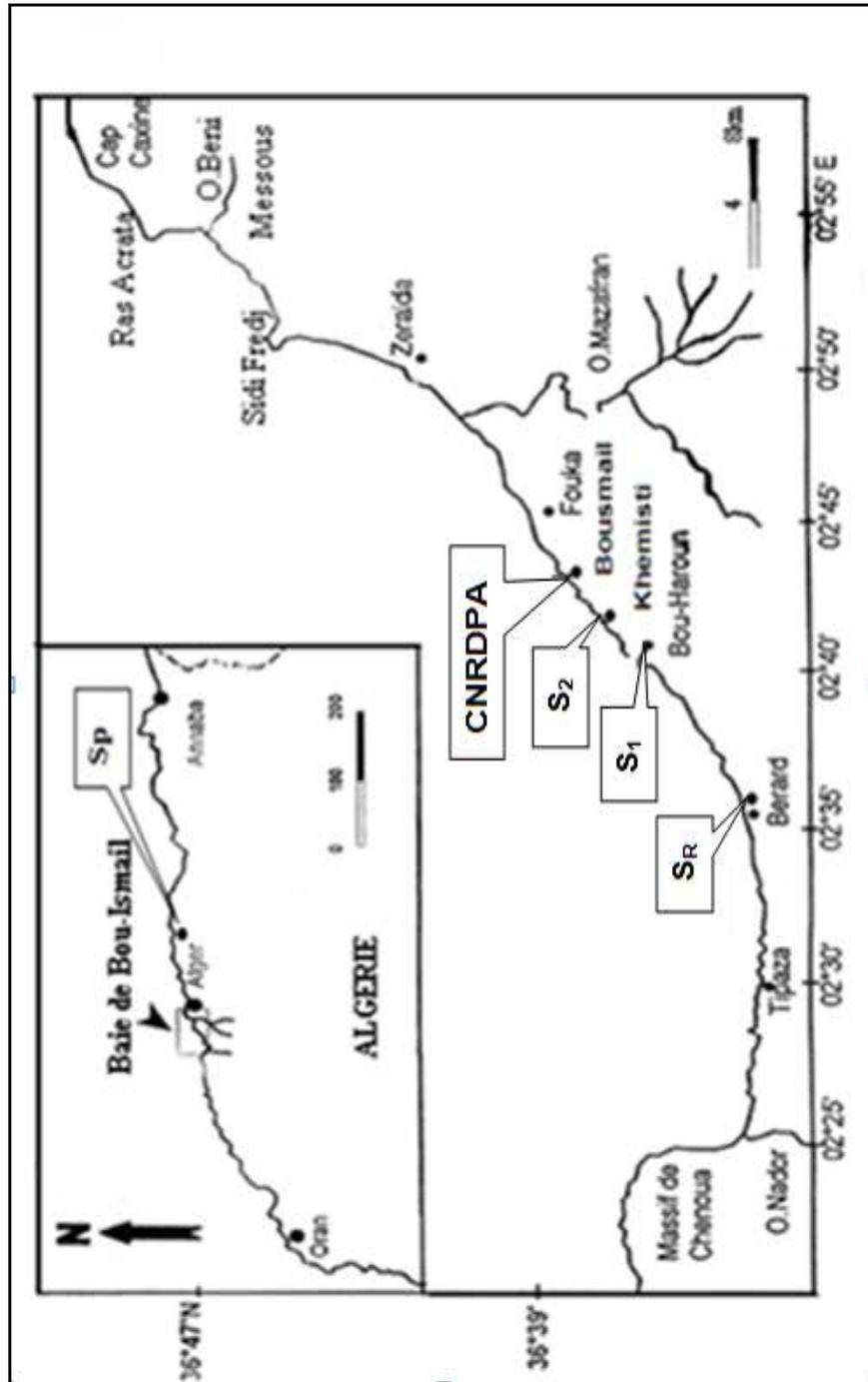


Figure 3.4 : Localisation de site de prélèvement et sites de transplantations.

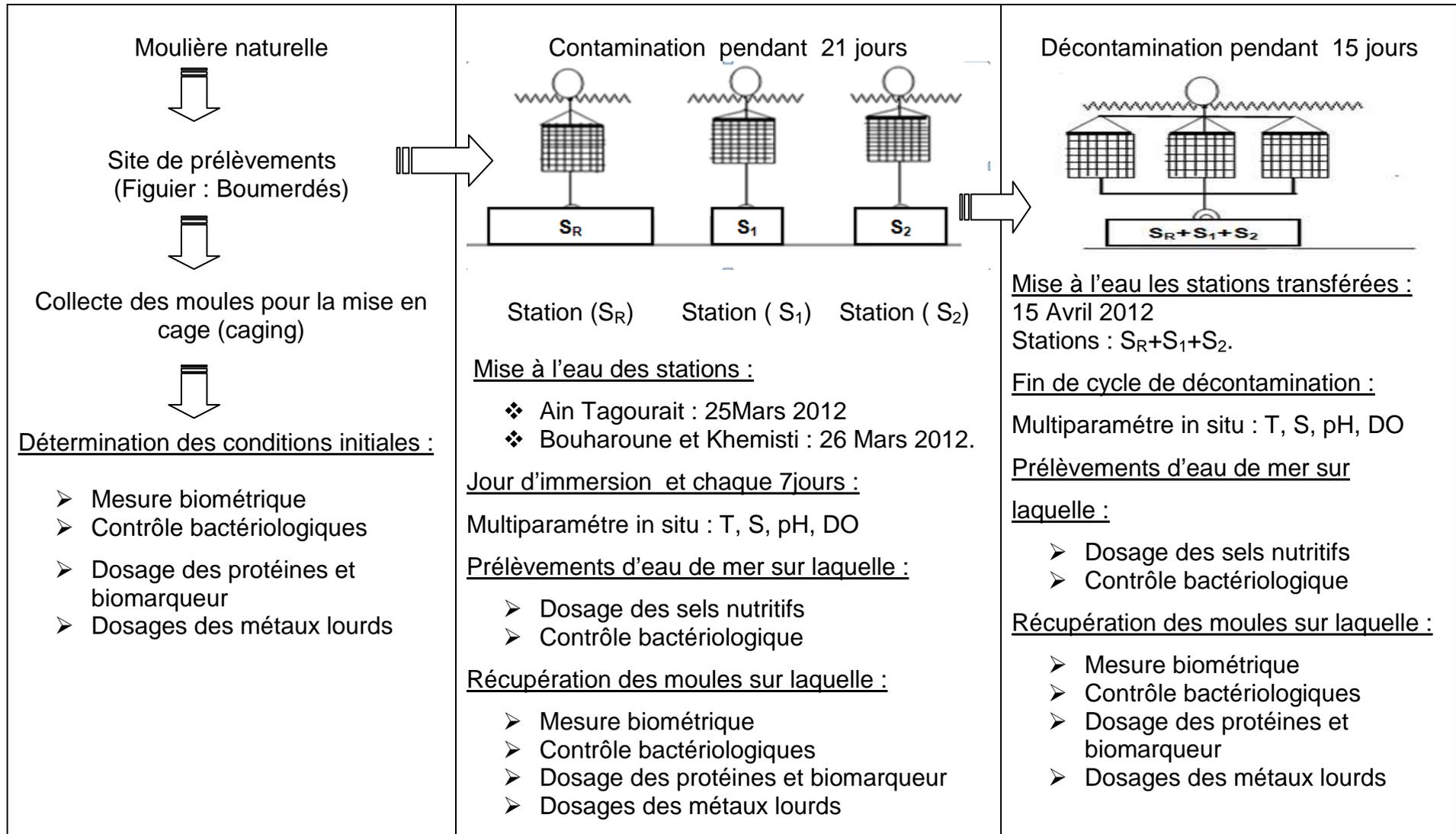


Figure 3.5 : campagnes d'échantillonnage (fréquence de visite, mesures *in situ* et analyses au laboratoire).

### 3.1.6. Méthodes analytiques

#### 3.1.6.1. Analyses physicochimiques et bactériologiques

##### 3.1.6.1.1. pH, salinité, température et l'oxygène dissous :

Les différents paramètres physicochimiques de l'eau (oxygène dissous, température, pH et salinité) concernant les tests au laboratoire, ont été suivis quotidiennement, avant et après chaque renouvellement de l'eau des bacs, par un salinomètre de type Cond 330i (salinité et température), par un pH-mètre de paillasse. Par ailleurs, le suivi *in situ* de ces derniers paramètres, s'effectuait pour chaque campagne au moyen d'un Multi-paramètre de poche modèle YSI 556.

##### 3.1.6.1.2. Sels nutritifs dans l'eau de mer

###### 3.1.6.1.2.1. Dosage de l'azote ammoniacal

Il s'agit de la méthode spectrophotométrique au bleu d'indophénol de Koroleff (1969) et dont le principe est basé sur la formation, en milieu alcalin ( $10,4 < \text{pH} < 11,5$ ), d'un composé type indophénol par réaction de l'ammoniac avec du phénol et de l'hypochlorite, en présence de nitroprussiate comme catalyseur. Dans un premier temps, l'ammoniac forme une monochloramine avec l'hypochlorite en milieu légèrement basique. Cette dernière réagit avec le phénol en présence d'un excès d'hypochlorite pour former le bleu d'indophénol absorbant à 630 nm [95] (voir le détail en appendice C).

###### 3.1.6.1.2.2. Dosage de l'azote nitreux

Les nitrites sont dosés par une méthode colorimétrique basée sur la réaction de Griess oil, les  $\text{NO}_2^-$  réagissent avec une première amine aromatique pour former un diazoïque qui est couplé à une seconde amine aromatique pour produire une coloration rose qui s'absorbe à la longueur d'onde de 543 nm [96] (voir le détail en appendice C).

#### 3.1.6.1.2.3. Dosage de l'azote nitrique

La méthode colorimétrique retenue quasi universellement est celle fondée sur le dosage des ions  $\text{NO}_2^-$  obtenus par réduction quantitative (> 95%) des ions  $\text{NO}_3^-$ . En mesurant la somme des concentrations en  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$ . Par déduction de la concentration en nitrites, déterminée sans réduction, il sera obtenu la concentration en nitrates. La réduction est effectuée par passage de l'échantillon sur une colonne de cadmium traité au cuivre [95] (voir le détail en appendice C).

#### 3.1.6.1.2.4. Dosage de phosphore

Les ions phosphates réagissent avec le molybdate d'ammonium, en présence d'antimoine(III), pour former un complexe que l'on réduit par l'acide ascorbique, cette forme réduite, de coloration bleue, a un maximum d'absorption à 885 nm. Ce composé bleu contient le phosphore. Les polyphosphates et le phosphore organique ne sont pas dosés par cette méthode [95] (voir le détail en appendice C).

#### 3.1.6.1.3. Dosage des métaux lourds

La minéralisation ou digestion est une étape importante pour la détermination d'éléments traces. Elle permet de détruire la matière organique et d'obtenir des solutions contenant la teneur totale des éléments présents dans la prise d'essai, habituellement avec une combinaison d'acides pour accroître la solubilité. Cependant, l'extraction doit être réalisée d'une telle manière que l'analyte est séparé de sa matrice sans perte ni contamination, ni destruction de la structure moléculaire de l'analyte [97]. Pour cette présente étude, la digestion humide par chauffage à reflux et la techniques d'extractions des ETMs a été utilisée pour la minéralisation de la chair des moules. L'analyse des ETMs (Cd, Pb, Cu) a été effectuée par spectrophotométrie d'absorption atomique (S.A.A) avec flamme de type Perkin Elmer Analyst 700, en utilisant comme gaz vecteur un mélange (air/acétylène) (voir le détail en appendice C).

#### 3.1.6.1.4. Contrôle bactériologique de l'eau de mer et moules

Les germes tests recherchés sont les coliformes totaux, les coliformes fécaux, *Escherichia coli*, et les streptocoques fécaux et Salmonelles. Ces germes sont révélateurs de contamination fécale et entraînent par leur abondance la présomption de contamination plus dangereuse, ces indicateurs de contamination fécale permettent d'apprécier, avec plus ou moins de sûreté ou de précocité, le risque d'une contamination par des matières fécales pouvant véhiculer des microorganismes pathogènes. Elle peut aider à déterminer, sur le plan qualité, les tendances de la pollution fécale existantes au niveau des sites de transplantation [97,98]. Les protocoles de tests microbiologiques de l'eau de mer et des moules sont détaillés en Appendice F.

#### 3.1.6.2. Analyses physiologiques

##### 3.1.6.2.1. Suivi de la mortalité

Avant chaque renouvellement du milieu d'essai, la mortalité est contrôlée dans chaque unité expérimentale pendant la période d'exposition. Une moule est considérée comme morte quand les valves sont ouvertes et ne se ferment pas en réponse à un stimulus tactile [99,100]. Les individus morts sont retirés de l'unité expérimentale et comptabilisés. A la fin de l'essai, il sera calculé la mortalité cumulée pour chaque concentration. Pour la validité de l'essai, il a été fixé la condition qu'il n'y ait pas de mortalité parmi les témoins.

##### 3.1.6.2.2. Suivi de l'excrétion azotée et phosphorés

Le principe de la mesure de l'excrétion azotée et phosphorée est basé sur le dosage de l'azote ammoniacal, les nitrates et les nitrites libérés par les organismes dans l'eau d'élevage, après un certain temps d'exposition aux métaux lourds (24h), dans un milieu fermé (bac d'exposition).

##### 3.1.6.2.3. Mesures biométriques

L'indice de condition (IC) est un indice biométrique qui est couramment utilisé en conchyliculture pour rendre compte du degré de remplissage des

coquilles des animaux. L'indice de condition est le rapport du poids de chair sur le volume interne de la coquille, et 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. Parmi les nombreuses formules proposées, nous avons choisi l'indice recommandé par l'Association Française pour la Standardisation (AFNOR, Norme Française NFV45056, septembre 1985), calculé de la façon suivante [2,4] :

$$IC (\%) = \left( \frac{PTSAP}{\text{Poids total de la moule}} \right) * 100$$

PTSAP = poids des tissus mous avec l'eau palléale.

### 3.1.6.3. Analyse biochimique

#### 3.1.6.3.1. Préparation de la fraction post-mitochondriale (S<sub>9</sub>) ou l'extrait protéique

Dès le retour au laboratoire, les animaux sont disséqués. La masse molle est séparée de la coquille, ensuite les tissus sont broyés dans un mortier en céramique à froid, à l'aide d'un mixeur déchiqueteur pendant 1 min environ à 9000 tours/min, à raison de (1/10 P/V) dans le tampon TRIS (tris (hydroxylméthyl aminométhane) (20mM ; pH 7,8). L'homogénat (broyat) obtenu a ensuite subi une centrifugation à 10000 g pendant 30 min.

Le surnageant récupéré après centrifugation correspond à la fraction post-mitochondriale (Fraction S<sub>9</sub>), contenant le cytosol, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les protéines cytosolique [65], sur laquelle le dosage de l'activité enzymatique et les protéines sera effectué (Figure 3.6).

#### 3.1.6.3.2. Dosage des protéines

La méthode de Folin-Lowry a pendant longtemps été la technique standard par excellence et demeure le test de quantification le plus utilisé pour le dosage des extraits protéiques. Cette méthode combine l'utilisation des ions Cu<sup>2+</sup> et du réactif de Folin-Ciocalteu (un mélange d'acide phosphotungastique et phosphomolybdique, en présence de protéines, il se réduit en un complexe de

coloration bleue) qui réagit avec le  $\text{Cu}^+$ . Ce dernier provient de la réduction de  $\text{Cu}^{2+}$  par des résidus des acides aminés facilement oxydables (le plus actif) comme la cystéine, le phénol de la tyrosine, l'indole du tryptophane. Le mécanisme exact de la réaction reste incertain, mais la réaction de la réduction du réactif de Folin avec  $\text{Cu}^+$  donne des dérivés excrément colorés, qui absorbent la lumière bleu (600-750 nm), dont l'intensité de la coloration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Cette méthode permet de doser des concentrations de protéine qui varient de 5 à 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  [101,102]. De notre travail, la teneur en protéine est déterminée par la méthode Folin-Lowry [103]. (Appendice C).

#### 3.1.6.3.3. Dosage de la catalase par mode cinétique

L'activité enzymatique est une mesure de la quantité d'enzyme active dans une préparation. La définition standard de l'unité d'activité enzymatique (U), selon l'Union Internationale de Biochimie : « Une unité d'enzyme représente la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute dans des conditions standards ». Dans ce cas, la température devra être mentionnée et si possible à 25 °C. Les autres conditions, telles que le pH, la force ionique et la concentration de substrat devraient, si cela est pratiquement possible, être optimales [102].

L'approche cinétique consiste à suivre en continu la quantité du composé voulu. La méthode continue de mesure dans laquelle l'avancement de la réaction peut être suivi en continu avec un appareil de mesure automatique. Par exemple, pour les réactions qui s'accompagnent d'un changement d'absorbance à une longueur d'onde facilement mesurable, la cinétique peut être suivie à l'aide d'un spectrophotomètre [102]. La méthode typique consiste donc à mélanger les réactifs et la préparation enzymatique dans une cuvette de spectrophotomètre puis à suivre la variation temporelle du paramètre mesuré (Absorbance).

Dans nos expériences, l'activité de la catalase est déterminée par la méthode adaptée celle de Lartilot décrite par Gülüzar *et al.* [104].

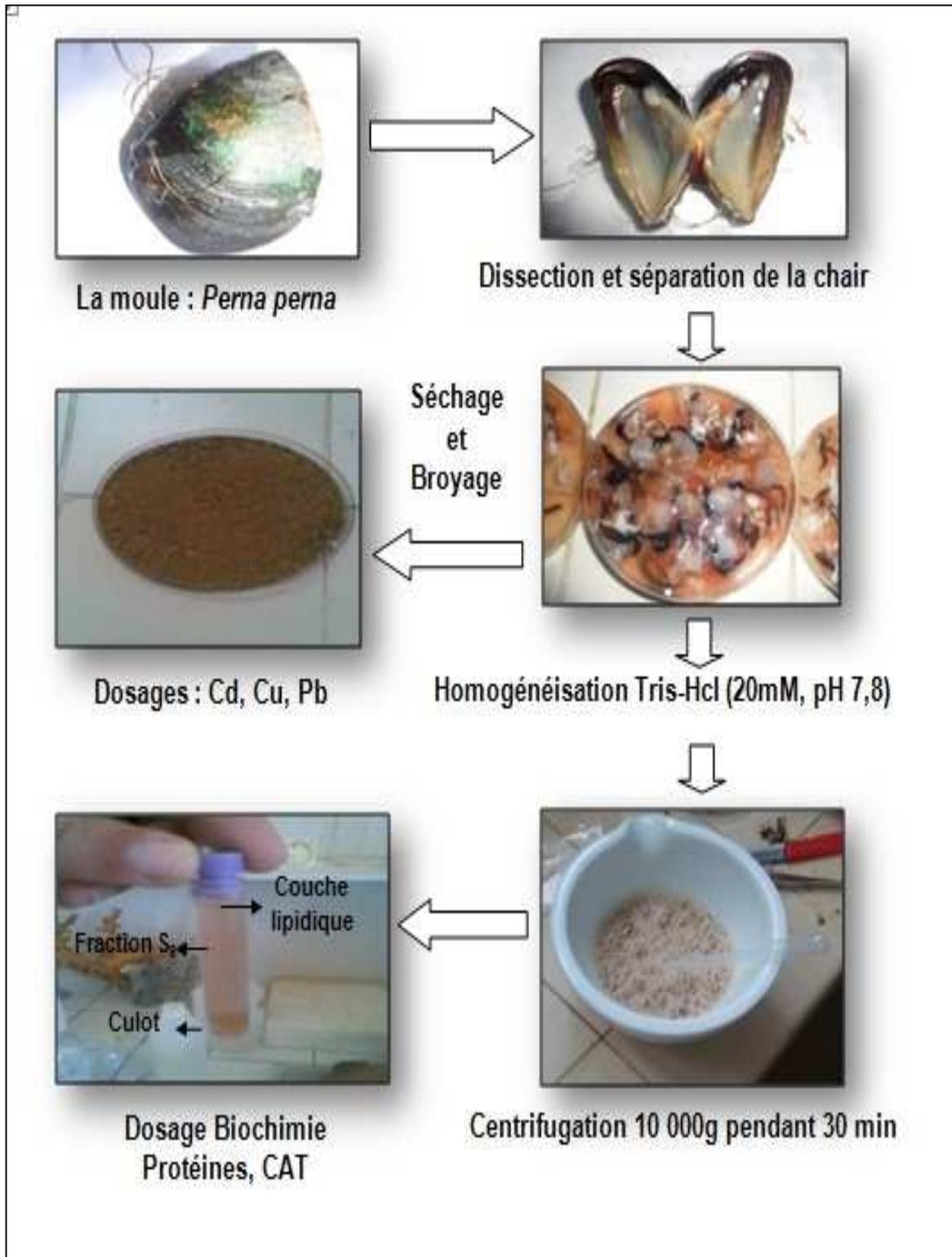


Figure 3.6 : Schéma montrant les différents compartiments utilisés pour les différents dosages réalisés.

## CHAPITRE 4

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 4.1. Résultats des tests de toxicité aiguë

##### 4.1.1. Résultats des paramètres physicochimiques (eau de mer)

Les résultats du contrôle physicochimique de l'eau de mer destinée aux tests de toxicités sont regroupés en Appendice G. Les paramètres physicochimiques de l'eau de mer ne représentent pas une source possible de perturbation pour les moules durant les tests de toxicité.

L'eau destinée pour effectuer les tests d'écotoxicité provient du site de référence d'Ain Tagourait de la willaya de Tipaza, présentant une bonne qualité physicochimique et microbiologique. De même les moules collectés du site de référence présentaient aussi une bonne qualité microbiologique. Selon le travail de Sitouah et Derrad, le suivi de la qualité microbiologique des moules du site le Figuier, montre la bonne qualité des moules [113].

Par ailleurs, les bacs employés, sont à surfaces libres en contact direct avec l'air ambiant, ce qui peut conduire à une contamination de l'eau des bacs, par les retombées de poussières en suspension dans l'atmosphère environnante. En plus, l'augmentation des teneurs en éléments nutritifs minéraux dissous tels que les composés azotés issus de l'excrétion des moules dans les bacs peut provoquer la mort des spécimens par l'effet toxiques de ces composés. Selon Reddy et Menon [114] ainsi que Ritz *et al.* [115] les teneurs en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), en nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), en ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) dans l'eau doivent être inférieures à  $0,10 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $22 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivement pendant 24 h d'exposition.

De fait, le changement d'eau journalier était nécessaire et avait pour objectif de minimiser les pertes en polluant, l'effet toxique des composés azotés accumulés et la régénération de la bonne qualité microbiologique du milieu environnant des moules. Aussi, le renouvellement de l'eau d'élevage pourra assurer la

régénération de la valeur nutritionnelle du milieu environnant à travers l'eau de mer qui constitue leur unique source de nourriture pour nos spécimens.

Comme conclusion, la qualité de l'eau d'élevage, le manque de nourriture, ou les conditions de maintien en bacs, peuvent constituer un stress moins important par rapport aux xénobiotiques testés pour nos spécimens. De fait, les différentes mesures obtenues de biomarqueur ou l'excrétions azotées ou phosphorées des moules, peuvent être corrélées directement à l'effet des polluants métalliques ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ).

#### 4.1.1.1. Température

Les tableaux récapitulatifs des valeurs de températures moyennes sont donnés en Appendice G. Les valeurs de températures mesurées restent toujours dans l'intervalle de tolérance physiologiques des spécimens *P. perna* entre 7,5 à 32,5 °C [87], durant tous les essais, pour une valeur moyenne de  $18,16 \pm 1,09$  °C dans le cas de cadmium et de  $18,59 \pm 1,33$  °C pour le plomb et dans le cas d'essai de cuivre d'été et d'automne  $22,03 \pm 0,22$  et  $20,75 \pm 0,89$  °C, respectivement. Ces valeurs moyennes de températures ne présentant aucun effet stressant peuvent perturber l'état de santé des individus. Donc, dans notre étude la température n'est pas un facteur stressant.

L'augmentation de la température stimule tous les processus métaboliques. Par exemple, il augmente la consommation d'oxygène, et par conséquent, peuvent augmenter la production de ROS comme produits secondaires du métabolisme intensifié résultant du stress oxydatif [60,78].

Plusieurs auteurs concordent sur l'importance de la température, leurs résultats montrent son influence autant que facteur abiotique sur l'activité métabolique, et l'absorption et l'accumulation des métaux et surtout des réponses enzymatiques chez les mollusques bivalves [52, 78,87]. Ainsi, Ritz *et al.* [115] ont trouvé que le taux d'accumulation du Cu, Zn et Pb par *Mytilus edulis* baisse quand la température s'élève.

Khessiba *et al.* [78] ont observé une corrélation positive entre l'activité anti-oxydante catalase mesurée chez les moules témoin (*Mytilus galloprovincialis*)

dans leurs tests et les paramètres environnementaux tels que la température, la salinité et la photopériode. Ainsi, Pellerin-Massicotte a signalé que dans la moule bleue « *Mytilus edulis* » une augmentation de l'activité anti-oxydante catalase a été associée à l'augmentation des peroxydations lipidiques lorsque les températures sont plus élevées, et où les moules ont été exposées à l'air [116]. En plus, il a été remarqué que l'augmentation de la température, induit l'augmentation de la teneur en protéines également chez les mollusques bivalves tels que les moules et les huîtres [68 ,117].

De plus, les activités physiologiques des organismes marins principalement dépendre de paramètres hydrographiques tels que la température et la salinité [68, 85,118-121]. L'effet de la température sur la réponse physiologique des mollusques a été expliqué à partir de deux perspectives différentes. Enriquez-Ocana *et al.*, suggèrent que lorsque la température augmente, la viscosité d'eau diminue, ce qui favorise la capacité de filtration des organismes [72].

Yukihira *et al.*, attribuent les modifications apportées aux combinaisons de deux effets opposés : une augmentation des réactions chimiques au cours du métabolisme en raison de l'augmentation de la température par rapport à une dénaturation des enzymes qui les catabolisent [73].

Moal *et al.*, montrent que l'augmentation de la température accroît les besoins en oxygène des huîtres alors que la solubilité de ce gaz dans l'eau de mer diminue. Ainsi, les seuils d'oxygène à partir desquels des difficultés respiratoires peuvent apparaître, peuvent être plus élevés quand la température augmente. La température augmente le risque d'hypoxie métabolique, concomitamment avec l'effort de reproduction [74].

Nakamura *et al.*, ont constaté pour la palourde *Ruditapes philippinarum*, que le taux de filtration a augmenté plus de 2,5 fois lorsque la température passe de 12 °C à 21°C, et suggèrent que ces résultats sont liés à l'abondance du phytoplancton que le changement de façon spectaculaire au cours des saisons [122].

De plus, l'excrétion chez les animaux marins est considérée comme un facteur important dans l'évaluation de l'état physiologique de ces animaux [84, 87,120].

Ainsi, Charrid-Resgalla et Salomon ont observé une augmentation des teneurs en ammonium excrété chez la moule *Perna perna* lorsque la température passe de 15 à 30 °C [71].

#### 4.1.1.2. Salinité

Les tableaux récapitulatifs des valeurs moyennes sont donnés en Appendice G. Durant tous les tests expérimentaux, il a été remarqué que la variation de la salinité moyenne était quasi-nulle, pour un maximum moyen de  $0,88 \pm 0,17$  Psu dans le cas de Cd et de  $0,80 \pm 0,44$  Psu pour le Pb et de 0,34 Psu, et  $0,43 \pm 0,17$  Psu pour les essais de cuivre d'été et d'automne respectivement, et les valeurs de salinité mesurées restent toujours dans l'intervalle de tolérance physiologiques des spécimens *P. perna* entre 19 à 44 Psu durant tous les essais. Aussi, les différences ne sont pas significativement différentes chez les groupes témoins et ceux contaminés durant tous les tests expérimentaux. De ce fait, la salinité ne peut constituer un paramètre d'interférence des activités métaboliques ou enzymatique des espèces indicatrices.

Le genre *Perna* tolère des fluctuations assez larges de la salinité. *P. perna* peut bien s'adapter à des salinités allant de 19 à 44 Psu [84,87]. La baisse de salinité aura une incidence sur la survie. La salinité inférieure à 5 Psu est mortelle pour *P. viridis* si l'exposition dépasse les deux jours, Coeroli *et al.* Ainsi que Huang *et al.*, ont également mentionné que le niveau de salinité est le principal facteur limitant la distribution de *P. viridis* dans les eaux de Hong Kong [123,124].

Chez les organismes aquatiques, les changements de salinité provoquent une variété de réponses physiologiques comme le stress hormonal, la stimulation du métabolisme énergétique et de la distribution d'équilibre électrolytique. Le stress induit par le changement de la salinité a été liée à l'augmentation de la génération des ROS, provoquant des dommages oxydatifs [60,78].

Par ailleurs, Bjerregaard et Depledge, ont montré que le taux d'accumulation de cadmium diminue avec l'augmentation de la salinité dans les parties molles de *Littorina littorea* et les parties molles des coquilles *M. edulis* et *Carcinus maenas* [127].

Liu *et al.*, ont constaté que lorsque les crevettes *Litopenaeus vannamei* ont été soumises au changement de salinité aiguë (5, 15, 30, et 50 Psu) pendant 24 h, les activités de la SOD, catalase, glutathion peroxydase et Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ont été modifiées [125].

Choi *et al.*, ont conclu que les deux enzymes étudiées (la glutathion peroxydase et glutathion-S-transférase) jouaient un rôle important dans la détoxification des ROS, et donc ceux-ci pourraient servir des indicateurs des réponses de stress oxydatif aux changements de salinité dans l'olive flet *Paralichthys* [126].

Segnini [128] a observé que la concentration en protéines chez *P. perna* était constante en augmentant la concentration de la salinité (15, 20, 25, 30, 36, 40 et 45 Psu) pour tous les tissus (glande digestive, branchies et muscles) et diminue avec la diminution de la salinité. La glande digestive a montré la plus forte baisse en protéine.

#### 4.1.1.3. Variation de pH moyen

Les tableaux récapitulatifs des valeurs moyennes sont donnés en Appendice G. Durant tous les tests expérimentaux, il a été remarqué, que les pH mesurés de l'eau de mer avant et après tout les tests ne sont pas significativement différents. Un maximum moyen de  $0,65 \pm 0,24$  dans le cas de Cd et de  $0,14$  pour le Pb et de  $0,11 \pm 0,05$  ;  $0,67 \pm 0,38$  pour les essais de cuivre d'été et d'automne respectivement. En plus, les valeurs journalières de pH mesurées restent toujours dans l'intervalle de tolérance physiologiques des spécimens mollusque bivalves marins (moule, huitres) entre 7,0 et 8,4 [129]. Les différences ne sont pas significativement différentes chez les groupes témoins et ceux contaminés durant tous les tests expérimentaux. De ce fait, le pH ne peut constituer un paramètre stressant pouvant perturber l'état de santé des individus *Perna*.

Il est connu depuis longtemps que les effets toxiques ainsi que les quantités de plusieurs métaux lourds accumulés dans divers organes des animaux aquatiques sont fortement dépendants d'un certain nombre de facteurs physicochimiques tels que le pH de l'eau et sa composition ionique. L'afflux d'ions H<sup>+</sup> peut entraîner une

irritation des tissus et stimuler la contraction du muscle adducteur, ce qui entraîne la fermeture temporelle des valves [120,130].

Les données montrent que les fluctuations de pH ont divers effets néfastes sur des organismes marins et estuariens dont bon nombre sont physiologiques. Chez la crevette marine *Penaeus monodon*, une baisse du pH entraînerait une diminution du poids de la carapace [131]. Chez la pieuvre marine *Octopus dofleini*, un pH inférieur à 7,2 déterminerait une diminution de la saturation maximale en oxygène de l'hémocyanine, un transporteur d'oxygène sanguin [132]. À un pH de moins de 7, une inhibition de la croissance, une perte pondérale, une réduction des dimensions de la coquille, une dissolution de la coquille et une inhibition de l'alimentation ont été observées chez quatre espèces bivalves. Des mortalités appréciables ont été enregistrées chez ces espèces après une exposition de 60 jours à des conditions expérimentales similaires [133].

Ainsi, Loayza-Muro et Elias-Letts ont observé que le taux de filtration a diminué à des pH faibles, ceci est expliqué par la fermeture temporelle et partielle des coquilles des moules. De même, cela a été observé pour *Anodonta cygnea* soumise à un stress acide (pH 4,0 et 5,0) pour des périodes de temps prolongées. En plus, un excès d'ions  $H^+$  peut provoquer la libération de  $Ca^{2+}$  à partir de muscles adducteurs et l'altération des modes d'activité des moules [130].

Une hausse de l'acidité peut avoir une incidence sur les processus physiques qui se déroulent dans les organismes. Chez les embryons de l'oursin (*pulcherrimus*), l'agrégation cellulaire serait inhibée à faible pH et arrêtée à un pH de moins de 4,0 [134].

Dans un milieu marin, les variations de pH peuvent également avoir une incidence considérable sur les formes chimiques et la toxicité d'autres substances. Dans l'eau, l'ammoniac existe sous deux formes : une forme non ionique : le  $NH_3$ , et une forme ionique : le  $NH_4^+$ . La toxicité de l'ammoniac pour les organismes marins est intimement liée à la concentration de l'espèce non ionique de cette substance. La concentration relative de  $NH_3$  dans l'eau de mer est déterminée en partie par le pH, une baisse d'une unité de pH réduit par un facteur de 10 la teneur de l'eau en  $NH_3$  [79,135]. Les réactions des organismes marins aux changements dans les concentrations ambiantes de  $NH_3$  causés par les variations de pH varient d'une

espèce à l'autre. Chez des mysidacés juvéniles (*Mysidopsis bahia*), la toxicité aiguë de l'ammoniac était inversement proportionnelle au pH dans la plage de 7,0 à 9,0. Chez *Menidia beryllina*, en revanche, la toxicité aiguë de l'ammoniac était maximale à des pH de 7,0 et 9,0 et minimale à un pH de 8,0 [136]. La spéciation des métaux et la solubilité de certains composés organiques sont également intimement liées au pH [134,135].

#### 4.1.1.4. L'oxygène dissout

Les tableaux récapitulatifs des valeurs moyennes sont donnés en Appendice G. Durant le cycle de contamination (0 à 3 jours) la mesure de la différence entre le taux d'oxygène dissous avant et après chaque exposition chez les groupes de tests n'est pas significative. L'écart mesuré chez les spécimens témoins ( $0,07 \pm 0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ ) était inférieur à celui enregistré chez les individus exposés au polluant ( $0,44 \pm 0,32 \text{ mg.L}^{-1}$ ). En plus le débit d'aération est constant durant le cycle de contamination. De ce fait, l'oxygène dissous ne peut constituer un paramètre d'interférence pouvant influencer le fonctionnement physiologique et enzymatique des moules *Perna*.

Le genre *Perna* tolère des concentrations, en oxygène dissous, allons de 4 à 7.8  $\text{mg.L}^{-1}$  [137,138]. Les valeurs journalières de l'oxygène dissous mesurées durant le cycle expérimental dans le cas de plomb (entre 4 et 7,8  $\text{mg.L}^{-1}$ ) répondaient aux exigences des spécimens. Aussi, Nicholson a signalé que les niveaux d'oxygène inférieurs à 4  $\text{mg.L}^{-1}$  peuvent influencer le fonctionnement physiologique des moules *Perna* [138]. En plus, les niveaux supérieurs peuvent entraîner un dysfonctionnement mitochondriale et la présence élevée de l'oxygène (ROS) menant à des dommages de tissus, pourtant de nombreux mollusques bivalves marins intertidaux sont capables de survivre dans de telles situations sans effets néfastes apparents [65,138].

Plusieurs auteurs s'accordent sur l'importance de l'oxygène dissous, leurs résultats montrent son influence autant que facteur abiotique sur plusieurs réponses physiologiques, et l'accumulation des métaux et surtout des réponses enzymatiques chez les mollusques bivalves. Ainsi, Tran *et al.*, ont noté que la prise en charge du cadmium chez le bivalve *Corbicula fluminea* augmentait dans

des conditions hypoxiques. Une réduction de la concentration en oxygène entraînait une augmentation du taux de filtration des animaux, ce qui augmentait l'accumulation du cadmium dans les branchies. De plus, les conditions hypoxiques changeaient la distribution et la charge de Cadmium dans les branchies et les viscères [139].

Par ailleurs, Volodymyr, a signalé que l'augmentation des niveaux d'oxygène est proportionnelle avec la production des ROS, en raison de la probabilité d'échappement d'électrons de la chaînes de transport d'électrons et de se combiner avec l'oxygène moléculaire. Cependant, les organismes possèdent des mécanismes d'adaptation spécifiques pour prévenir les conséquences négatives des niveaux élevés d'oxygène. Au niveau de l'organisme, ils peuvent réduire leur capacité à extraire l'oxygène de l'environnement [60].

De plus, l'exposition à l'hyperoxie induite le stress oxydatif dans différentes espèces telles que les poissons (le poisson rouge *C. auratus*, le saumon atlantique : *Salmo salar*, la sole du Sénégal *Solea senegalensis* et le pétoncle Méditerranéen et anémones de mer *Anthopleura elegantissima* [15, 60]. Vidal *et al.*, ont montré que l'hypoxie augmente les activités de catalase et glutathion peroxydase dans la palourde d'eau douce *Corbicula fluminea* [140]. De plus, la diminution de la concentration en oxygène peut diminuer le risque de production de radicaux libres dans les organismes. Dans les poissons rouges, l'exposition à l'anoxie augmente la SOD et la catalase dans le foie [60].

Par ailleurs, la variation de l'oxygène dissous dans le milieu a des effets sur l'excrétion des moules. Wang *et al.*, ont montré que l'excrétion d'azote ammoniacal augmente avec l'augmentation de la concentration en oxygène dissous, lorsque ils exposaient les moules (*Perna viridis*) à différentes concentrations en oxygène dissous (1,5 ; 3,0 et 6,0 mg d'O<sub>2</sub>/l) pendant 4 semaines [137].

#### 4.1.2. Etude de l'effet des ETMs sur l'excrétion azotée et phosphorée

##### 4.1.2.1. L'excrétion azotée

###### 4.1.2.1.1. Excrétion moyenne d'azote ammoniacal

Les résultats relatifs à l'évolution des quantités moyennes d'azote ammoniacal excrété pendant la durée d'exposition par les moules *P. perna* dans les milieux expérimentaux, en présence du : cadmium, plomb, et cuivre, sont représentés par la figure 4.1.

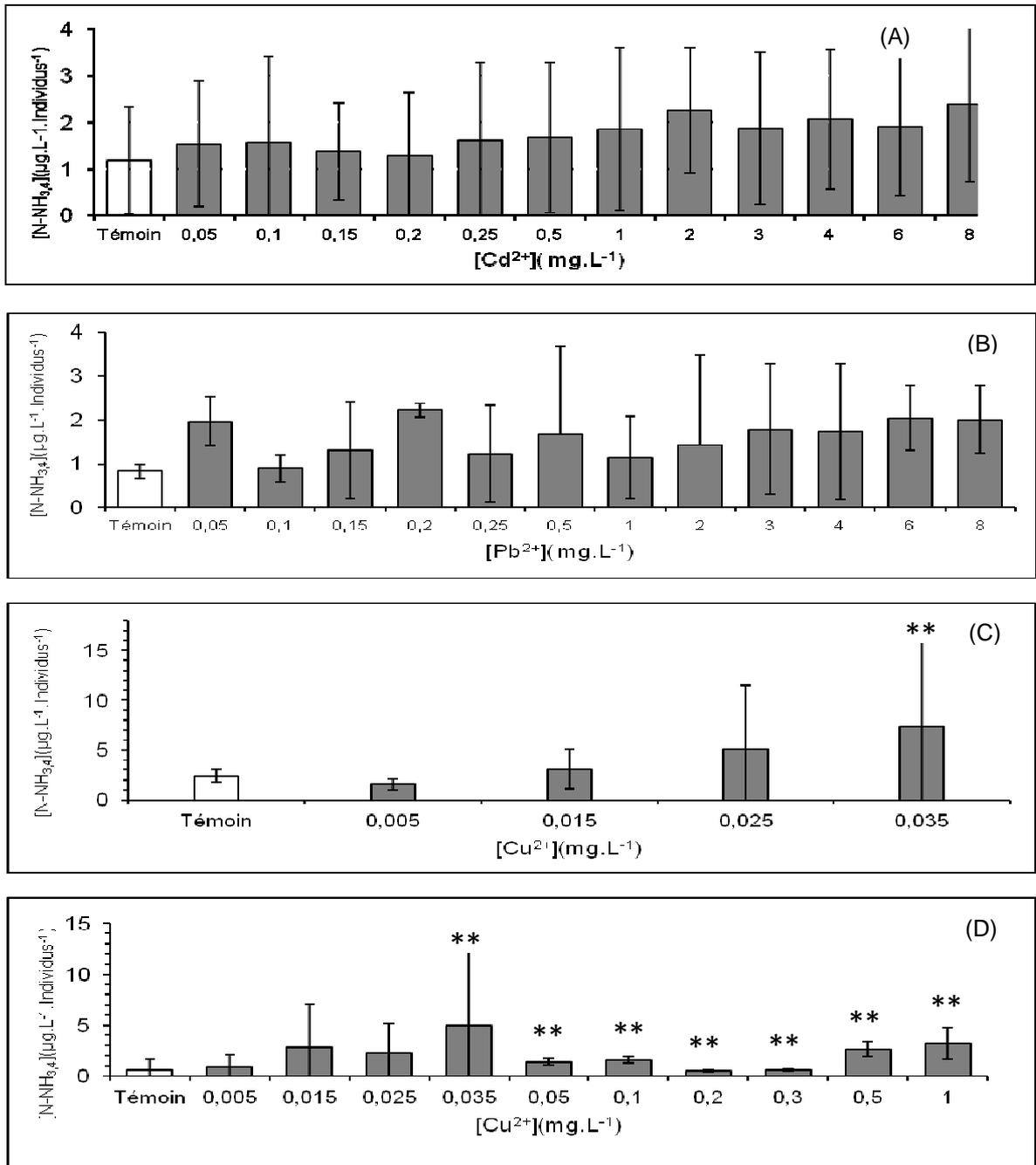


Figure 4.1 : Excrétion moyenne d'azote ammoniacal par les moules pendant trois jours et deux jours (\*\* ) d'exposition en présence du : (A) Cadmium, (B) Plomb, (C) Cuivre (essai en été), (D) Cuivre (essai en automne), (Valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types).

D'après la figure 4.1, les effets de l'exposition au cadmium, plomb et cuivre sur l'excrétion d'azote ammoniacal sont variables selon les concentrations du métal et varient entre déplétion, augmentation par rapport au témoin.

Dans les milieux contaminés par le cadmium, une excrétion d'azote ammoniacal a été observée. Ce phénomène est remarquable à fortes concentrations. Une relation positive entre la teneur en azote ammoniacal excrété par les moules avec les concentrations de cadmium testé.

En présence de  $8 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd (Figure 4.1. A), l'excrétion ammoniacale moyenne été de  $2,39 \pm 1,67 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu qui correspond à la quantité moyen maximale excrétée par les moules, comparativement au témoin ( $1,17 \pm 1,15 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu).

Les augmentations des teneurs en azote ammoniacale excrété sont observées en présence de faibles concentrations en plomb  $0,05$  et  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de Pb sont de  $1,96 \pm 0,55$  et  $2,21 \pm 0,15$  respectivement (Figure 4.1.B), comparativement au témoin ( $0,82 \pm 0,15 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu). Des concentrations plus importantes en plomb provoquent même des augmentations des teneurs en azote ammoniacale excrété dans le milieu d'élevage. L'excrétion ammoniacale moyenne été de  $2,04 \pm 0,73 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu à  $6 \text{ mg L}^{-1}$  de Pb.

Par ailleurs, dans le cas de cuivre (essai en été) (Figure 4.1.C), des augmentations des teneurs moyennes en azote ammoniacal dans les bacs de contaminations sont observée pendant trois jours d'exposition  $3,08 \pm 1,95$  ;  $5,13 \pm 6,35$  ;  $7,27 \pm 8,91 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  par individus (ce qui correspond à  $0,015$  et  $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$  en cuivre) et deux jours pour  $0,035 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $7,27 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu) à l'exception  $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $1,55 \pm 0,59 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu), comparativement au témoin ( $2,39 \pm 0,66 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu).

Pour l'essai de cuivre en automne, une augmentation de teneur moyennes en azote ammoniacal est observée en présence de  $0,005$  ;  $0,015$  ;  $0,025$  ;  $0,035$  pendant trois jours d'exposition et  $0,05$  ;  $0,1$  ;  $0,5$  et  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  pendant deux jours d'exposition au cuivre (ce qui correspond à des teneurs moyennes en nitrite excrété de  $0,91 \pm 1,57$  ;  $2,87 \pm 4,26$  ;  $2,25 \pm 2,86$  ;  $4,93 \pm 7,27$  ;  $1,37 \pm 0,32$  ;  $1,57 \pm 0,32$  ;  $2,66 \pm 0,75$  ;  $3,24 \pm 1,57 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu respectivement par rapport

au témoin ( $0,65 \pm 0,98 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu) (Figure 4.1.D). Par contre, une légère diminution est observée en présence de 0,2 et 0,3  $\text{mg.L}^{-1}$  en cuivre ce qui correspond à des teneurs en azote ammoniacal excrétées de  $0,54 \pm 0,01$  et  $0,57 \pm 0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu) pendant deux jours d'exposition.

#### 4.1.2.1.2. Excrétion moyennes des nitrites

Les résultats relatifs à l'évolution des quantités moyennes des nitrites excrétés pendant la durée d'exposition par les moules *P. perna* dans les milieux expérimentaux, en présence du cadmium, plomb et cuivre, sont représentés par la figure 4.2.

D'après la figure 4.2, les effets de l'exposition au cadmium, plomb et cuivre sur l'excrétion des nitrites sont variables selon les concentrations du métal et varient entre déplétion, augmentation ou sans effets remarquables.

Une augmentation de la teneur en nitrite est observée en présence de 0,05 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4  $\text{mg.L}^{-1}$  en cadmium (ce qui correspond à des teneurs moyennes en nitrite excrété de  $16,74 \pm 7,01$  ;  $26,61 \pm 3,18$  ;  $28,76 \pm 8,24$  ;  $16,95 \pm 4,58$  ;  $20,95 \pm 3,55$  ;  $20,6 \pm 13,74$  et  $16,18 \pm 3,52 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu respectivement) par rapport au témoin ( $14,11 \pm 0,93 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu) (Figure 4.2.A). Cependant, une diminution de l'excrétion en nitrites se traduit par la diminution des teneurs moyennes en nitrites excrétés est observée en présence 0,1 ; 0,15 ; 0,2  $\text{mg.L}^{-1}$  (ce qui correspond à des teneurs moyennes en nitrite excrété de  $12,94 \pm 2,41$  ;  $13,76 \pm 1,59$  ;  $13,49 \pm 2,19 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu). En plus, la concentration de 4  $\text{mg.L}^{-1}$  en cadmium n'as produit aucun effet sur l'excrétion des nitrites des moules et la teneur moyenne mesurées en nitrites ( $14,19 \pm 1,20 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu) était très proches de celles relevées dans les bacs témoins. Dans le cas de plomb, des augmentations de teneurs moyennes en nitrite excrété dans les bacs de contamination sont observées pour toutes les concentrations testées à l'exception de 4  $\text{mg.L}^{-1}$  comparativement au témoin ( $8,22 \pm 5,56 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu) (Figure 4.2.B). Ainsi, ces concentrations testées semblent induire une élévation de l'excrétion du nitrite pour un maximum de  $33,06 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu en présence de 0,25  $\text{mg.L}^{-1}$ . Par ailleurs, dans le cas de cuivre (essai en été), des augmentations des teneurs moyennes en nitrite dans les bacs de contamination sont observées

pendant trois jours d'exposition  $27,43 \pm 15,61$  ;  $39,56 \pm 36,42$  ;  $42,00 \pm 27,37 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu (ce qui correspond à  $0,015$  et  $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$  en cuivre) et deux jours pour  $0,035 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $36,08 \pm 27,10 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu), comparativement au témoin ( $20,05 \pm 16,04 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu).

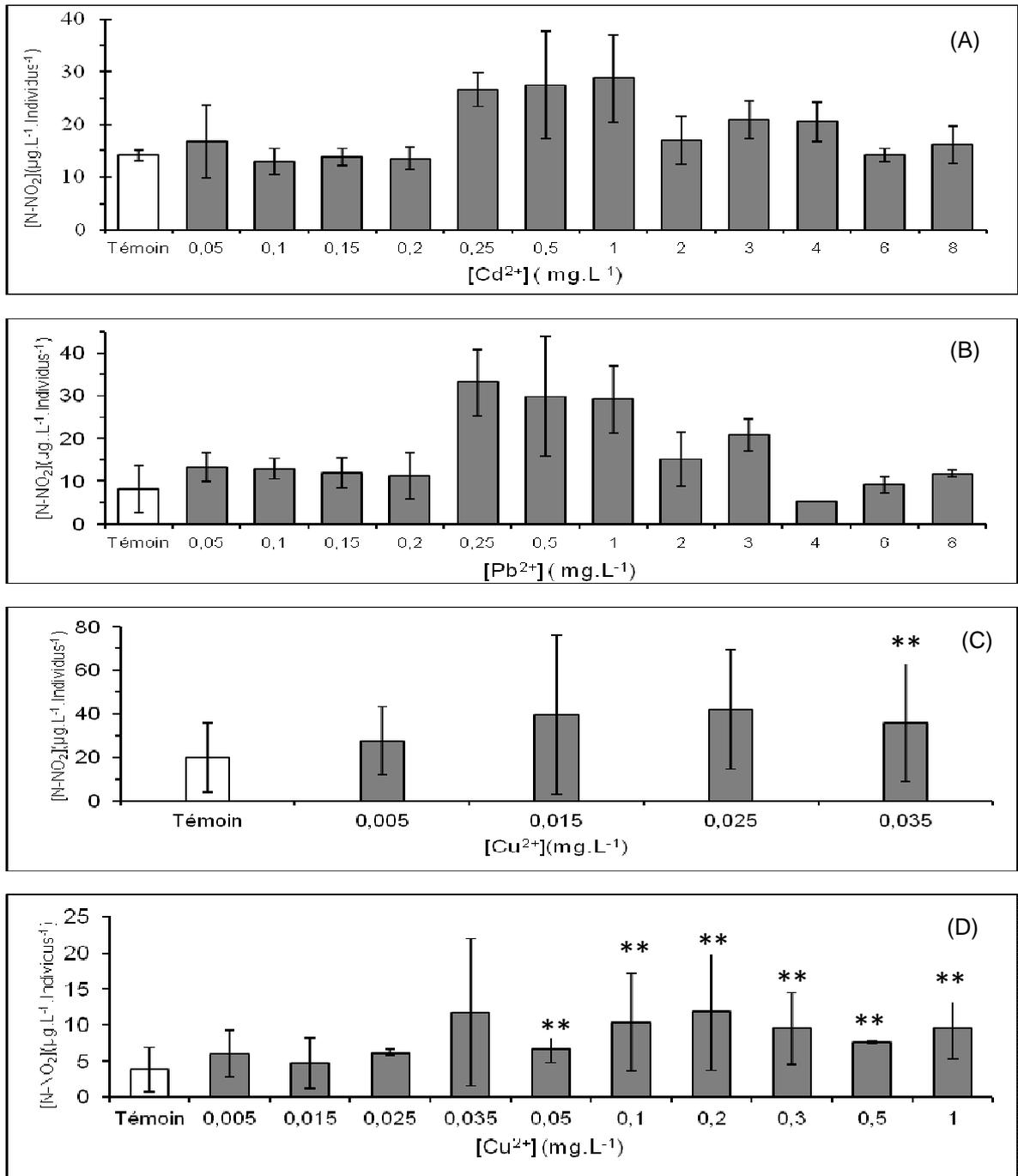


Figure 4.2 : Excrétion moyenne en nitrite par les moules pendant trois jours et deux jours (\*\*) d'exposition en présence du : (A) Cadmium, (B) Plomb, (C) Cuivre (essai en été), (D) Cuivre (essai en automne), (Valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types).

Pour l'essai de cuivre en automne, une augmentation de teneur moyennes en azote ammoniacal est observée en présence de 0,05 ; 0,015 ; 0,025 ; 0,035 pendant trois jours d'exposition au cuivre (ce qui correspond à des teneurs moyennes en nitrite excrété de  $6,01 \pm 3,25$  ;  $4,68 \pm 3,54$  ;  $6,16 \pm 0,42$  ;  $11,74 \pm 10,13$   $\mu\text{g.L}^{-1}$  par individu respectivement) par rapport au témoin ( $0,65 \pm 0,98$   $\mu\text{g.L}^{-1}$  par individu) (Figure 4.2.D). De plus, dans les milieux expérimentaux à fortes concentrations en cuivre (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5 et 1  $\text{mg L}^{-1}$ ), les quantités en nitrite excrétés restent remarquables pendant deux jour d'exposition ( $6,62 \pm 1,89$  ;  $10,36 \pm 6,75$  ;  $11,87 \pm 8,14$  ;  $9,54 \pm 4,98$  ;  $7,59 \pm 0,18$  et  $7,51 \pm 4,20$   $\mu\text{g.L}^{-1}$  par individu respectivement), comparativement au témoin  $1,96 \pm 0,24$   $\mu\text{g.L}^{-1}$  par individu) (Figure 4.2.D). Il semble donc qu'à de faibles concentrations (0,005  $\text{mg.L}^{-1}$ ) le cuivre exerce un pouvoir stimulant de l'excrétion de nitrite.

#### 4.1.2.1.3. Excrétion moyennes des nitrates

Les résultats relatifs à l'évolution de la quantité moyenne du nitrate excrété pendant la durée d'exposition, dans les milieux expérimentaux, en fonction de temps en présence de cadmium, plomb et cuivre sont représentés par la figure 4.3.

D'après la figure 4.3, les variations des teneurs en nitrates sont semblables à celles des nitrites, et varient selon les concentrations des métaux étudiés.

Ainsi, les teneurs en nitrates relevées ( $5,75 \pm 5,18$  ;  $5,64 \pm 6,09$  ;  $5,01 \pm 3,34$  et  $5,85 \pm 2,34$   $\mu\text{g.L}^{-1}$  par individu) sous l'effet des concentrations 0,25 ; 1 ; 4 et 8  $\text{mg.L}^{-1}$  en cadmium respectivement (Figure 4.3.A), sont trouvées très proches de celle mesurée dans le bac témoin ( $5,43 \pm 3,24$   $\mu\text{g.L}^{-1}$  par individu), ces concentrations ne semblent pas avoir d'effets notables sur l'excrétion des nitrates. En revanche, les concentrations 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; 0,25 ; 0,5 ; 2 ; 3 et 6  $\text{mg.L}^{-1}$  ont induit une légère augmentation de l'excrétion des nitrites ( $6,79 \pm 8,23$  ;  $9,01 \pm 7,66$  ;  $9,08 \pm 7,30$  ;  $10,59 \pm 4,22$  ;  $6,64 \pm 3,26$  ;  $6,54 \pm 0,70$  ;  $6,39 \pm 3,75$  ;  $8,31 \pm 5,92$   $\mu\text{g.L}^{-1}$  par individu respectivement). Il semble donc que le cadmium n'exerce pas un pouvoir stimulant de la l'excrétion de nitrate.

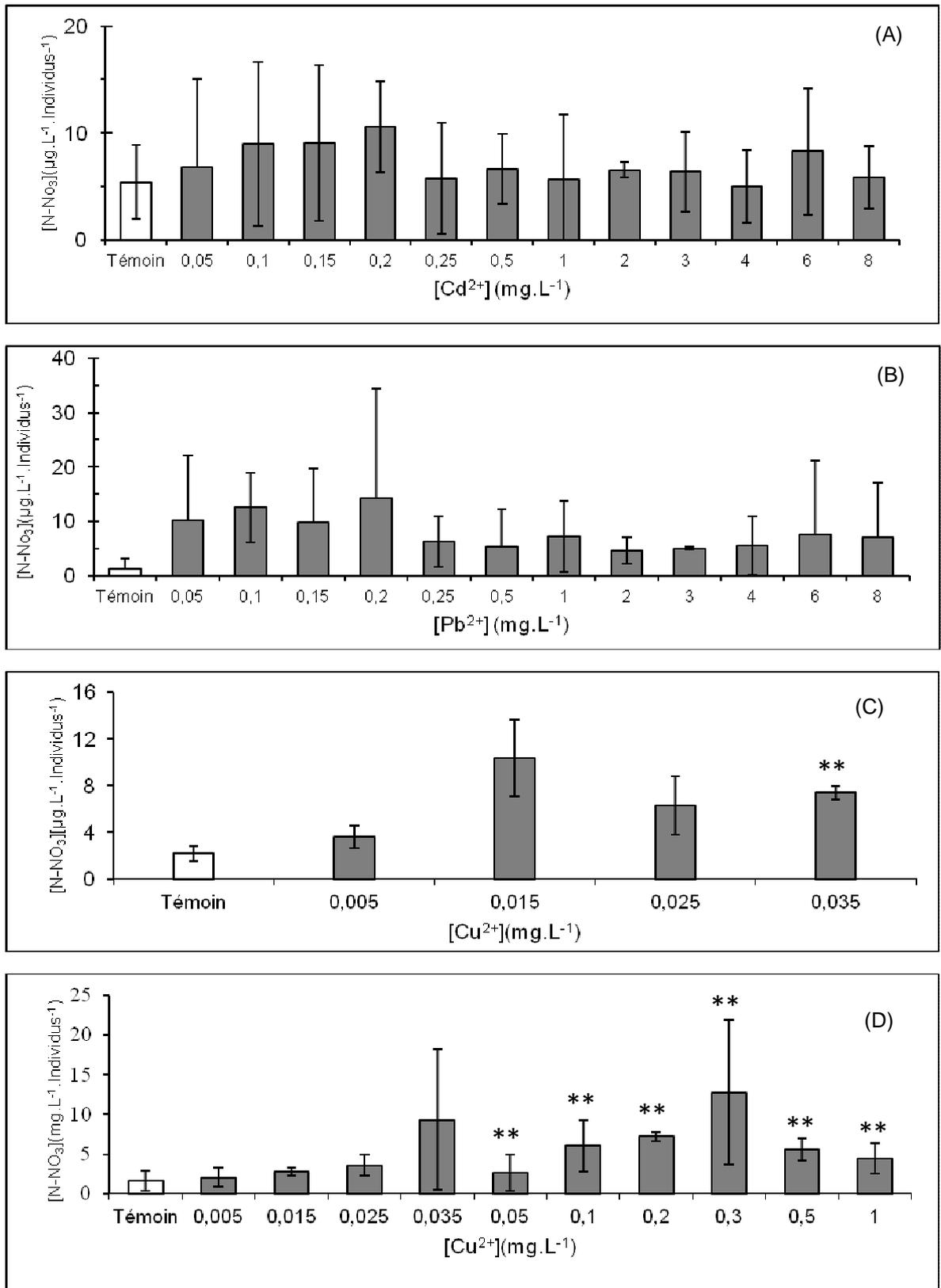


Figure 4.3 : Excrétion moyenne en nitrate par les moules pendant trois jours et deux jours (\*\*) d'exposition en présence du : (A) Cadmium, (B) Plomb, (C) Cuivre (essai en été), (D) Cuivre (essai en automne), (Valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types).

Dans le cas de plomb, des augmentations de teneurs moyennes en nitrate excrété dans les bacs de contamination sont observées pour toutes les concentrations testées comparativement au témoin ( $1,20 \pm 1,92 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu) (Figure 4.3.B). Ainsi, ces concentrations testées semblent induire une élévation de l'excrétion du nitrate pour un maximum de  $14,22 \pm 20,11 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu en présence de  $0,20 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Par ailleurs, dans le cas de cuivre (essai en été), des augmentations des teneurs moyennes en nitrate dans les bacs de contamination sont observées pendant trois jours d'exposition  $3,61 \pm 0,95$  ;  $10,39 \pm 3,31$  ;  $6,30 \pm 2,48 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individus (ce qui correspond à  $0,015$  et  $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$  en cuivre) et deux jours pour  $0,035 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $7,40 \pm 0,58 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu), comparativement au témoin ( $2,18 \pm 0,62 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu).

Pour l'essai de cuivre en automne, une augmentation des teneurs moyennes en nitrate est observée en présence de  $0,05$  ;  $0,015$  ;  $0,025$  ;  $0,035 \text{ mg.L}^{-1}$  pendant trois jours d'exposition au cuivre (ce qui correspond à des teneurs moyennes en nitrates excrété de  $2,05 \pm 1,20$  ;  $2,73 \pm 0,50$  ;  $3,60 \pm 1,39$  ;  $9,29 \pm 8,86 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu respectivement) par rapport au témoin ( $1,62 \pm 1,31 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu) (Figure 4.3. D). De plus dans les milieux expérimentaux à fortes concentrations en cuivre ( $0,05$  ;  $0,1$  ;  $0,2$  ;  $0,3$  ;  $0,5$  et  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) les quantités en nitrates excrétés restent remarquables pendant deux jours d'exposition ( $2,65 \pm 2,25$  ;  $6,05 \pm 3,23$  ;  $7,21 \pm 0,58$  ;  $12,78 \pm 9,15$  ;  $5,55 \pm 1,39$  et  $4,45 \pm 1,92 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu respectivement), comparativement au témoin ( $1,62 \pm 1,31 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu) (Figure 4.3.D). Il semble donc qu'aux faibles concentrations ( $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ ) le cuivre exerce un pouvoir stimulant de la l'excrétion de nitrate.

#### 4.1.2.2. Excrétions moyennes phosphorées

Les résultats relatifs à l'évolution des quantités moyennes des phosphores excrétés par les moules *P. perna* dans les milieux expérimentaux, et en fonction de temps en présence du : cadmium, plomb, et cuivre, sont représentés par la figure 4.4.

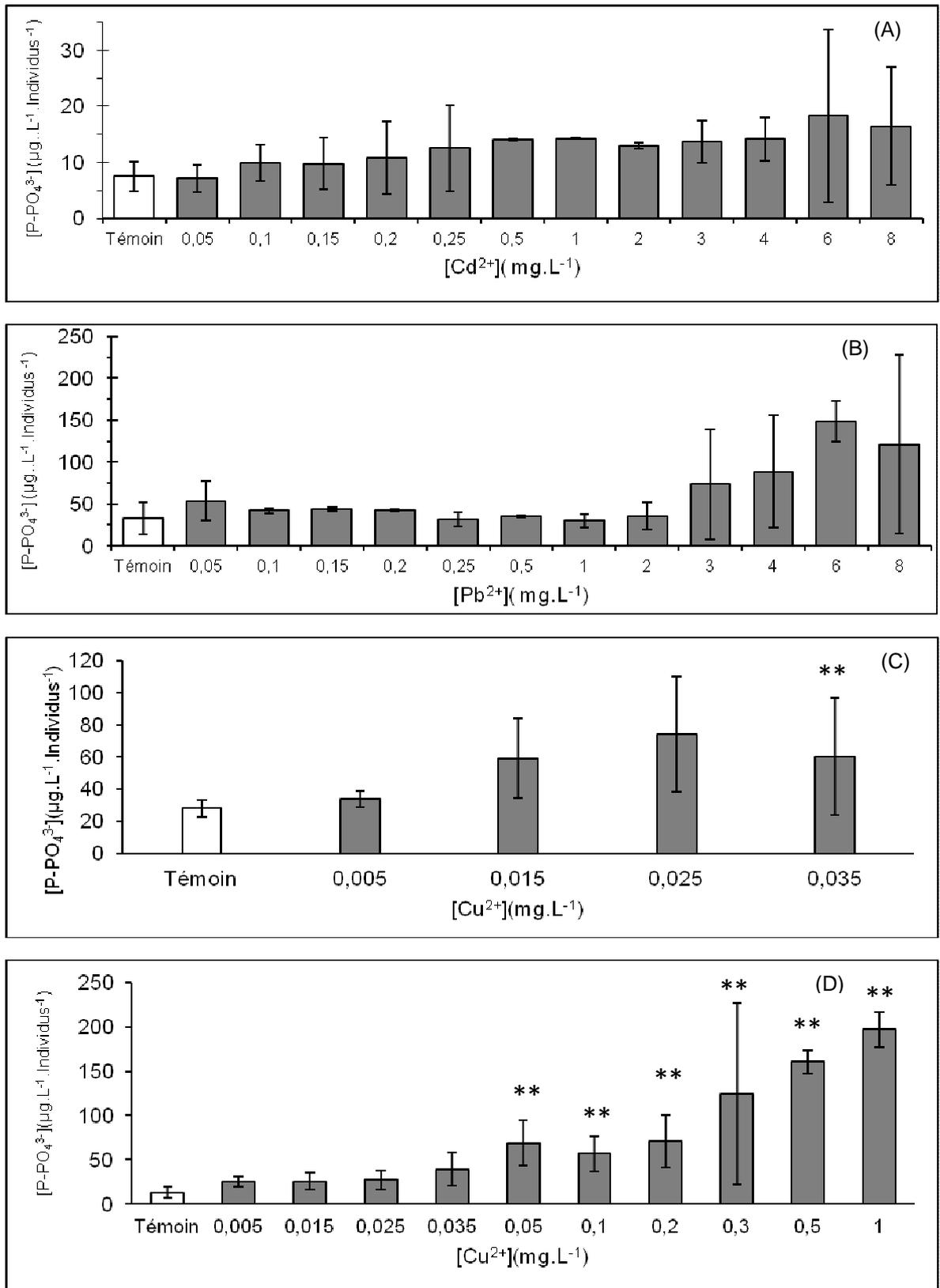


Figure 4.4: Excrétion phosphorée moyenne par les moules pendant trois jours et deux jours (\*\*) d'exposition en présence du : (A) Cadmium, (B) Plomb, (C) Cuivre (essai en été), (D) Cuivre (essai en automne), (Valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types).

Les résultats relatifs à l'évolution de l'excrétion phosphorée par les moules montrent que ce phénomène est sensible en présence du cadmium, du plomb et du cuivre. Elles varient avec les concentrations des métaux auxquels ils étaient exposés.

Dans les milieux contaminés par le cadmium (Figure 4.4.A), une relation positive est observée entre la teneur de phosphore excrété par les moules et les concentrations de cadmium testé. Ce phénomène est remarquable à de fortes concentrations. Pour un maximum de  $18,29 \pm 15,95 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu en présence de  $6 \text{ mg.L}^{-1}$  en cadmium, comparativement au témoin ( $7,56 \pm 2,61 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu).

En revanche, les concentrations  $0,05$  ;  $0,1$  ;  $0,15$  et  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  en plomb (Figure 4.4.B), ont induit une légère augmentation de l'excrétion de phosphore (ce qui correspond aux teneurs moyennes en phosphore excrété de  $53,79 \pm 23,76$  ;  $42,0 \pm 3,32$  ;  $43,55 \pm 1,99$  ;  $42,10 \pm 1,47 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu respectivement) comparativement au témoin ( $33,01 \pm 19,27 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu). Pour les concentrations  $0,5$  ;  $1$  et  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  l'excrétion phosphorée ( $34,86 \pm 1,36$  ;  $33,49 \pm 6,63$  et  $35,32 \pm 16,64 \mu\text{g.L}^{-1}$  respectivement), a été maintenue à un niveau très proche de celui des individus témoins, ce qui laisse déduire que ces concentrations n'ont eu aucun effet mesurable sur l'excrétion phosphorée des moules par rapport aux autres concentrations testées. Ainsi, il est à noter un effet inducteur de l'excrétion phosphorée suite à l'exposition aux fortes concentrations en plomb  $3$  ;  $4$  ;  $6$  et  $8 \text{ mg.L}^{-1}$  (ce qui correspond à des teneurs moyennes en phosphore excrété de  $73,53 \pm 65,86$  ;  $76,74 \pm 58,32$  ;  $139,01 \pm 22,57$  ;  $105,05 \pm 92,90 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individus respectivement) comparativement au témoin ( $33,01 \pm 19,27 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu).

Par ailleurs, dans le cas de cuivre (essais d'été) (Figure 4.4.C), des augmentations de teneurs moyennes en phosphore dans les bacs de contamination sont observées pendant trois jours d'exposition  $33,73 \pm 5,08$  ;  $59,19 \pm 24,65$  et  $74,14 \pm 35,96 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu (ce qui correspond à  $0,005$  ;  $0,015$  et  $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$  en cuivre) et deux jours pour  $0,035 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $60,08 \pm 36,58 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu), comparativement au témoin ( $27,77 \pm 5,24 \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu).

Pour l'essai de cuivre en automne (Figure 4.4.D), une augmentation des teneurs moyennes en phosphore est observée en présence de  $0,05$  ;  $0,015$  ;  $0,025$  ;  $0,035$

mg.L<sup>-1</sup> pendant trois jours d'exposition au cuivre (ce qui correspond aux teneurs moyennes en phosphore excrété de 25,25±5,48 ; 25,81±10,11 ; 27,10±10,99 et 39,49±19,21 µg.L<sup>-1</sup> par individu respectivement) par rapport au témoin (13,20±6,07 µg.L<sup>-1</sup> par individu). De plus dans les milieux expérimentaux à fortes concentrations en cuivre (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5 et 1 mg.L<sup>-1</sup>), les quantités en phosphore excrétés restent remarquables pendant deux jours d'exposition (68,99±25,57 ; 56,78±20,07 ; 71,32±29,72 ; 124,66±102,88 et 160,40±12,63 et 197,18±19,81 µg.L<sup>-1</sup> par Individu respectivement), comparativement au témoin. Il semble donc que pour toutes les concentrations testées, le cuivre exerce un pouvoir stimulant de l'excrétion phosphorée.

#### 4.1.2.3. Discussions d'excrétions azotées et phosphorées

L'exposition des mollusques bivalves marins à différentes concentrations en métaux lourds (Cd, Pb et Cu) a entraîné des changements dans la physiologie de la moule, observables à travers les modes d'excrétion étudiés (azotée et phosphorée). Plusieurs auteurs ont considéré que l'excrétion (azote ammoniacal, nitrate, nitrite, phosphate) chez les animaux marins est considérée comme un facteur important dans l'évaluation de l'état physiologique [32,84].

Généralement, l'excrétion azotée et phosphorée représentée par l'azote ammoniacal, les nitrates, les nitrites et le phosphore, en conditions d'élevage favorables, augmente dans l'eau de mer ayant servi à l'élevage, ceci est observée dans tous les bacs (les témoins et les autres concentrations) par rapport à la teneur initiale de l'eau de mer naturelle. Ces teneurs peuvent être justifiées par le métabolisme des organismes tests représenté par l'excrétion azotée et phosphorée.

Ainsi, Danilo et Halen ont observé que les spécimens *Ophiorachna incrassata* qui sont morts de faim dans le laboratoire pendant quelques jours avaient tendance à excréter plus d'ammonium que les spécimens récemment collectés [141].

D'après Masilamoni *et al.*, Valarmathi et Azariah, l'excrétion d'azote ammoniacal (N-NH<sub>3,4</sub> ou NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), est représenté par l'ammonium, (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), forme prédominante par rapport à l'ammoniac (NH<sub>3</sub>) [84,94].

L'azote absorbé par les mollusques bivalves est utilisé pour la croissance des tissus et le reste est excrété sous forme d'urine (60-90% constitué d'azote d'ammoniacal ( $\text{NH}_3+\text{NH}_4^+$ ), 0-13 % d'urée  $\text{CON}_2\text{H}_4$  et 5-21 % acides aminés) [84,94].

L'excrétion de l'azote d'ammoniacal peut être considérée comme le taux de catabolisme (dégradation) de protéine et d'acide aminés. La diffusion est le mode principal de l'excrétion d'ammoniaque dans les invertébrés marins puisque sa concentration dans les liquides corporels est considérée plus élevée que celle dans l'environnement extérieur [84].

Dans notre cas d'étude, les métaux testés exercent un pouvoir stimulant sur l'excrétion d'azote ammoniacal, et elle est variable selon les concentrations du métal et le métal lui-même. Dans le cas de cadmium, l'excrétion suit le gradient de la contamination métallique, et elle est variable (cas de plomb et cuivre). Le niveau supérieur d'excrétion chez les individus exposés a pu être attribué à la forte dégradation des protéines et des acides aminés (forte activité métabolique).

Des études à moyen et à long terme montraient que les taux d'excrétion d'azote ammoniacal des moules augmente avec l'exposition au cuivre. Ainsi, Vosloo *et al.*, ont observé une relation positive entre l'excrétion de l'ammonium et les concentrations en cuivre testé, lors l'exposition des moules *Perna perna* à cinq concentrations de 12,5 ; 25,0 ; 37,5 et 50,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  [142].

Cheung et Richard, ont montré que les taux d'excrétion d'ammoniac augmente à partir du deuxième jour jusqu'aux quatorzième, puis diminue en vingtième jours pour toutes les concentrations de cadmium testées (0,32 ; 0,70 et 1,50  $\text{mg.L}^{-1}$ ). L'interaction entre le temps et la concentration de cadmium était responsable des changements de taux d'excrétion d'ammoniac [143].

Les résultats de Bjerregaard et Depledge ont montré que le cadmium (2  $\text{mg.L}^{-1}$ ) est plus toxique pour les crevettes (crustacés décapodes) *Paulensis Farfantepenaeus* à faible salinité (36 ; 20 et 5 Psu) et induit une élévation de l'excrétion d'ammonium de 72%, 65% et 95% plus que le témoin, respectivement [127]. Ainsi, il apparait que l'effet de cuivre sur l'excrétion d'azote ammoniacal varie avec la saison (été et automne), pour les mêmes concentrations de cuivre

testé (y compris le témoin), (témoin 0,005 ; 0,015 ; 0,025 ; 0,035 mg.L<sup>-1</sup>). L'excrétion d'azote ammoniacal en été (2,39±0,66 ; 1,55±0,59 ; 3,08±1,95 ; 5,13±6,35 ; 7,27±8,91 µg.L<sup>-1</sup> par individu respectivement) est supérieure à celle d'automne (0,65±0,98 ; 0,91±1,17 ; 2,87±4,26 ; 2,25±2,86 ; 4,93±7,27 µg.L<sup>-1</sup> par individu respectivement). Il apparut qu'il y a une synergie entre le cuivre et la température sur l'excrétion d'azote ammoniacal. Ainsi, Novas *et al.*, dans leurs études, ont signalé de fortes productions des composés azotés en été qu'en hiver sous l'effet d'exposition des moules *Mytilus galloprovincialis* aux HAP [144].

La comparaison des effets séparés des trois métaux fait apparaître que l'excrétion d'azote ammoniacal est plus marquée en présence du cuivre. L'excrétion d'azote ammoniacal en présence de 0,025 mg.L<sup>-1</sup> en cuivre est de 5,13±6,35 µg.L<sup>-1</sup> par individu, alors qu'il est de 1,59±1,67 et 1,22±1,05 µg.L<sup>-1</sup> par individu en présence de 0,25 mg.L<sup>-1</sup> en cadmium ou plomb respectivement.

Par ailleurs, Masilamoni *et al.*, ont décrit l'excrétion de nitrite et de nitrate chez les mollusques bivalves marins comme le mécanisme intrinsèque pour la détoxification de l'ammoniac dans le sang et le maintien de la stabilité ionique à l'intérieur de l'animal [84].

Une grande variété de types de cellules produit de l'oxyde nitrique (NO) à partir de l'arginine par l'action de différents isoformes de NO synthéases. Cette molécule joue un rôle crucial dans la défense immunitaire de l'organisme. Le nitrite est un produit final stable de l'oxyde nitrique et de peroxy-nitrite, il apparaît donc que certains bivalves marins utilisent la NADPH-oxydase et oxyde-nitrique-synthétase pour tuer les agents pathogènes microbiens. Cela a été confirmé à un niveau expérimental où les inhibiteurs des deux voies enzymatiques bloquent la production de nitrite [145].

Dans notre cas d'étude les métaux testés exercent un pouvoir stimulant sur l'excrétion, et probablement à cause de l'augmentation de la concentration d'ammoniac dans le sang des moules, et la non-inhibition des enzymes impliquées dans la synthèse des nitrites, il s'agit entre autre de l'oxyde nitrique synthétase et de la NADPH-oxydase.

Ainsi, il apparait que l'effet de cuivre sur l'excrétion de nitrate et nitrite varie avec la saison (été et automne), pour les mêmes concentrations de cuivre testé (y compris le témoin), l'excrétion des nitrites et nitrates en été est supérieure à celle en automne. Il apparue qu'il y a une synergie entre le cuivre et la température sur l'excrétion de nitrate et nitrite.

La comparaison des effets séparés des trois métaux fait apparaitre que l'excrétion de nitrate et nitrite est plus marquée en présence du cuivre. Ainsi, en été l'excrétion de nitrite et nitrate, en présence de  $0,015 \text{ mg.L}^{-1}$  en cuivre est de  $39,56 \pm 36,42$  et  $10,39 \pm 3,31 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu respectivement, alors, qu'elle est de  $13,76 \pm 1,59$  et  $11,99 \pm 3,67 \text{ } \mu\text{g de N-NO}_3\text{.L}^{-1}$  par individu) et ( $9,08 \pm 7,30$  et  $9,77 \pm 9,87 \text{ } \mu\text{g N-NO}_2\text{.L}^{-1}$  par individu) en présence de  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  en cadmium ou plomb respectivement.

Très peu de travaux existent sur l'excrétion phosphorée des mollusques bivalves. Il est fortement probable que les facteurs stimulant cette excrétion soient les même que ceux influençant l'excrétion azotée.

Dans nos expériences, nous avons observé que l'excrétion de phosphate par les moules est bien corrélé avec les concentrations des métaux testés (Cd, Pb et Cu).

De plus, l'effet de cuivre sur l'excrétion phosphorée varie avec la saison (été et automne), pour les mêmes concentrations de cuivre testé (y compris le témoin) (témoin  $0,005$  ;  $0,015$  ;  $0,025$  et  $0,035 \text{ mg.L}^{-1}$ ), l'excrétion phosphorée en été ( $27,77 \pm 5,24$  ;  $33,73 \pm 5,08$  ;  $59,19 \pm 24,65$  ;  $74,14 \pm 35,96$  et  $60,08 \pm 36,58 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  par individu respectivement) est supérieur à celle en automne ( $13,20 \pm 6,07$  ;  $25,25 \pm 5,48$  ;  $25,81 \pm 10,11$  ;  $27,10 \pm 10,99$  ;  $39,49 \pm 19,21 \text{ } \mu\text{g de P-PO}_4^{3-}\text{.L}^{-1}$  par individu respectivement). Il est apparue qu'il y a une synergie entre le cuivre et la température sur l'excrétion phosphorée.

La comparaison des effets séparés des trois métaux fait apparaitre que l'excrétion de phosphore est plus marquée en présence du cuivre. Ainsi, l'excrétion de phosphore en présence de  $0,015 \text{ mg.L}^{-1}$  en cuivre est de  $59,19 \pm 24,65 \text{ } \mu\text{g de P-PO}_4^{3-}\text{.L}^{-1}$  par individu, alors qu'elle est de  $9,78 \pm 4,53$  et  $43,55 \pm 1,99 \text{ } \mu\text{g de P-PO}_4^{3-}\text{.L}^{-1}$  par individu en présence de la même concentration en cadmium et plomb respectivement.

Les essais de toxicité réalisés au cours de cette première partie ont montré d'importants effets des trois métaux testés sur les excréctions azotées et phosphorées. La moule *Perna perna* dans des milieux contaminés se manifeste par des excréctions du phosphore et d'azote en présence de l'un des métaux étudiés, plus particulièrement le cuivre.

#### 4.1.3. Résultats des dosages biochimiques et de la bioaccumulation

##### 4.1.3.1. Variations de cadmium, plomb et cuivre dans les chairs des moules

Les variations des concentrations de cadmium, plomb, et cuivre accumulées au niveau de la chair des moules en fonction des concentrations sont représentées dans les tableaux 4.1 et 4.2.

Tableau 4.1 : Concentrations de cadmium et plomb accumulés par les spécimens *Perna perna* (valeurs moyennes  $\pm$  écarts- types).

Lots	Cadmium (mg/Kg de poids sec)	Plomb (mg/Kg de poids sec)
Témoin	<3	<20
0,05 mg.L <sup>-1</sup>	<3	<20
0,2 mg.L <sup>-1</sup>	10,68 $\pm$ 0,0013	80,12 $\pm$ 0,0001
1 mg.L <sup>-1</sup>	72,46 $\pm$ 0,0007	325,26 $\pm$ 0,0003
2 mg.L <sup>-1</sup>	73,45 $\pm$ 0,0012	481,80 $\pm$ 0,0004
4 mg.L <sup>-1</sup>	249,01 $\pm$ 0,0016	982,14 $\pm$ 0,0002
8 mg.L <sup>-1</sup>	381,57 $\pm$ 0,0016	922,72 $\pm$ 0,0001

Tableau 4.2 : Concentration du cuivre accumulé par *Perna perna* (valeurs moyennes  $\pm$  écarts- types).

Lots	Cuivre (mg/Kg de poids sec)
Témoin	31,92 $\pm$ 0,0001
0,005 mg.L <sup>-1</sup>	51,48 $\pm$ 0,0002
0,015 mg.L <sup>-1</sup>	78,64 $\pm$ 0,0001
0,025 mg.L <sup>-1</sup>	91,99 $\pm$ 0,0001

Les trois métaux dosés (cadmium, plomb et cuivre) dans la chair des moules témoins et traitées montrent des variations en concentration accumulée,

positivement corrélée avec l'augmentation des concentrations des métaux testés dans le milieu d'élevage (Tableaux 4.1 et 4.2). En effet, les concentrations du cadmium, du plomb et du cuivre relevées dans la chair passent des valeurs : < 3 ; < 20 et  $31,92 \pm 0,0001$  mg/Kg de poids sec chez les témoins respectivement à  $381,57 \pm 0,0016$  ;  $922,72 \pm 0,0001$  et  $91,99 \pm 0,0001$  mg/Kg de poids sec à  $8 \text{ mg.L}^{-1}$  en cadmium et plomb et  $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$  en cuivre.

#### 5.1.3.1. Variations des concentrations en protéines au niveau de la chair

Les différents résultats relatifs aux dosages des protéines aux niveaux de la chair des moules sont représentés sur la figure 4.5.

D'après la figure 4.5.A, l'effet d'exposition des moules au cadmium sur la variation des concentrations en protéines au niveau des chairs de *P. perna* a été déterminé. Une légère augmentation des teneurs en protéines est enregistrée suite à l'exposition aux concentrations en cadmium ( $0,25$  et  $6 \text{ mg.L}^{-1}$ ), ce qui correspond aux teneurs moyennes en protéines de  $32,39 \pm 3,71$  et  $34,45 \pm 3,62$  mg/g de chair respectivement, comparativement au témoin ( $22,79 \pm 4,82$  mg/g de chair). Cependant, pour les autres concentrations ( $0,1$  ;  $0,25$  ;  $0,5$  ;  $2$  ;  $3$  ;  $4$  ;  $6$  et  $8 \text{ mg.L}^{-1}$ ) aucun effet n'a été révélé.

Par ailleurs, une augmentation des teneurs en protéines est enregistrée suite à l'exposition aux différentes concentrations en plomb (figure 4.5.B), pour un maximum de  $40,99 \pm 6,3$  mg/g de chair en présence de  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  en plomb comparativement au témoin ( $21,26 \pm 3,31$  mg/g de chair).

Aussi, une légère diminution des teneurs en protéines est enregistrée suite à l'exposition aux concentrations  $0,005$  et  $0,015 \text{ mg.L}^{-1}$  en cuivre chez les individus vivants pendant soixante-douze heures d'exposition, comparativement au témoin (figure 4.5.C). Par contre une augmentation des teneurs en protéines est enregistrée à une concentration de  $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$  chez ces derniers. Aussi, une augmentation des teneurs de protéines est enregistrée chez les individus morts après quarante-huit heures d'exposition aux concentrations  $0,005$  et  $0,015 \text{ mg.L}^{-1}$  en cuivre, pour un maximum de  $52,25 \pm 8,21$  mg/g de chair, comparativement au témoin ( $25,14 \pm 4,98$  mg/g de chair).

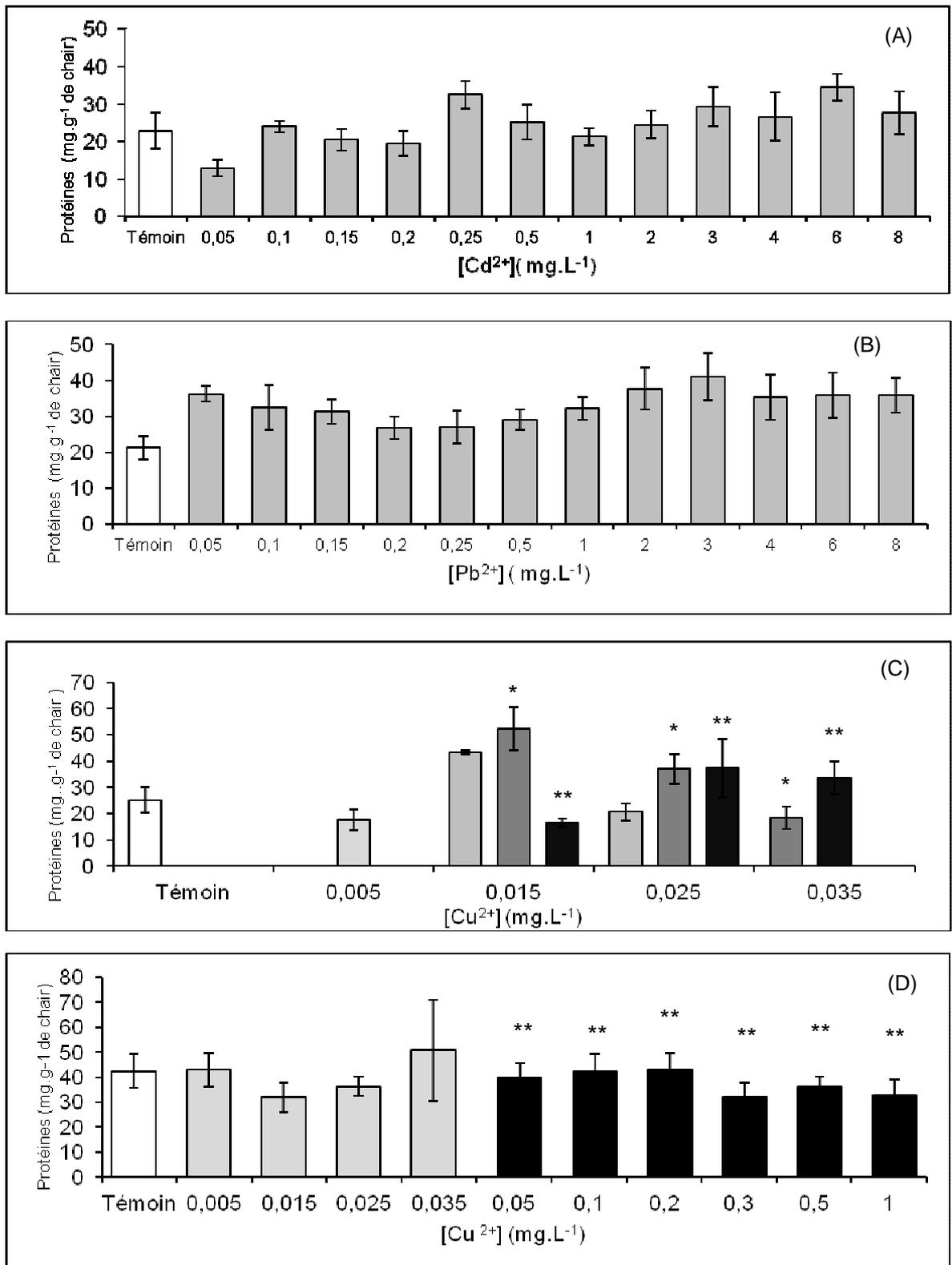


Figure 4.5 : Variation des concentrations en protéines de *P. perna* pendant trois jours et un jour (\*) et deux jours (\*\*) chez les individus morts en présence du (A) Cadmium, (B) Plomb (C) Cuivre (essai en été) et (D) (essai en automne), (valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types).

Par ailleurs, dans le cas de cuivre (essai d'automne (figure 4.5.D)), les organismes exposés aux concentrations : 0,005 ; 0,015 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5 et 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, n'ont révélé aucun changement dans leurs teneurs en protéines qui resteraient semblables à celles mesurées chez les spécimens témoins. Cependant, pour la concentration de 0,035 mg.L<sup>-1</sup>, une légère augmentation de la teneur en protéines a été remarquée.

#### 4.1.3.2. Variations de l'activité catalase chez les moules en fonction de la concentration en cadmium, plomb et cuivre

Les résultats relatifs au dosage de la catalase (CAT) chez les moules *P. perna* dans les différents milieux d'élevages contaminés par le cadmium, le plomb et le cuivre, à différentes concentrations sont représentés dans la figures 4.6.

En général, une relation proportionnelle est notée entre la réponse catalase et les concentrations des métaux testées (figure 4.6). Comparativement aux témoins, les activités catalase augmentent significativement avec les concentrations de cadmium, plomb et cuivre, résultats obtenus après 72 h d'exposition aux xénobiotiques (Cd, Pb, Cu). Cette augmentation varie linéairement avec le gradient de contamination. En effet, l'activité CAT est trois fois plus importante chez les individus exposés à 8 mg.L<sup>-1</sup> en cadmium et plomb par rapport aux témoins. Dans le cas de cuivre, (essai d'été et d'automne), la plus forte activité CAT est observée en présence de 0,025 mg.L<sup>-1</sup> en cuivre (38,55±3 U/mg de protéine en été et 58,32±2,27 U/mg de protéine en automne) comparativement aux témoins (23,02±1,33 U/mg de protéine en été et 8,4 U/mg de protéine en automne). De plus, aux faibles concentrations en cuivre (0,005 ; 0,015 ; 0,025 ; 0,035 mg.L<sup>-1</sup>), des activités catalase élevées sont observées après 24 et 48 h chez les individus morts comparativement aux individus vivants et témoins (Figure 4.6.C). Aussi, des activités catalase élevées sont enregistrées après 48 h d'exposition chez les individus morts en présence des concentrations élevées en cuivre (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5 et 1 mg.L<sup>-1</sup>), comparativement au témoin (Figure.4.6.D). Il semble donc à toutes les concentrations testées, le cuivre exerce un pouvoir stimulant de l'activité CAT chez les spécimens exposés.

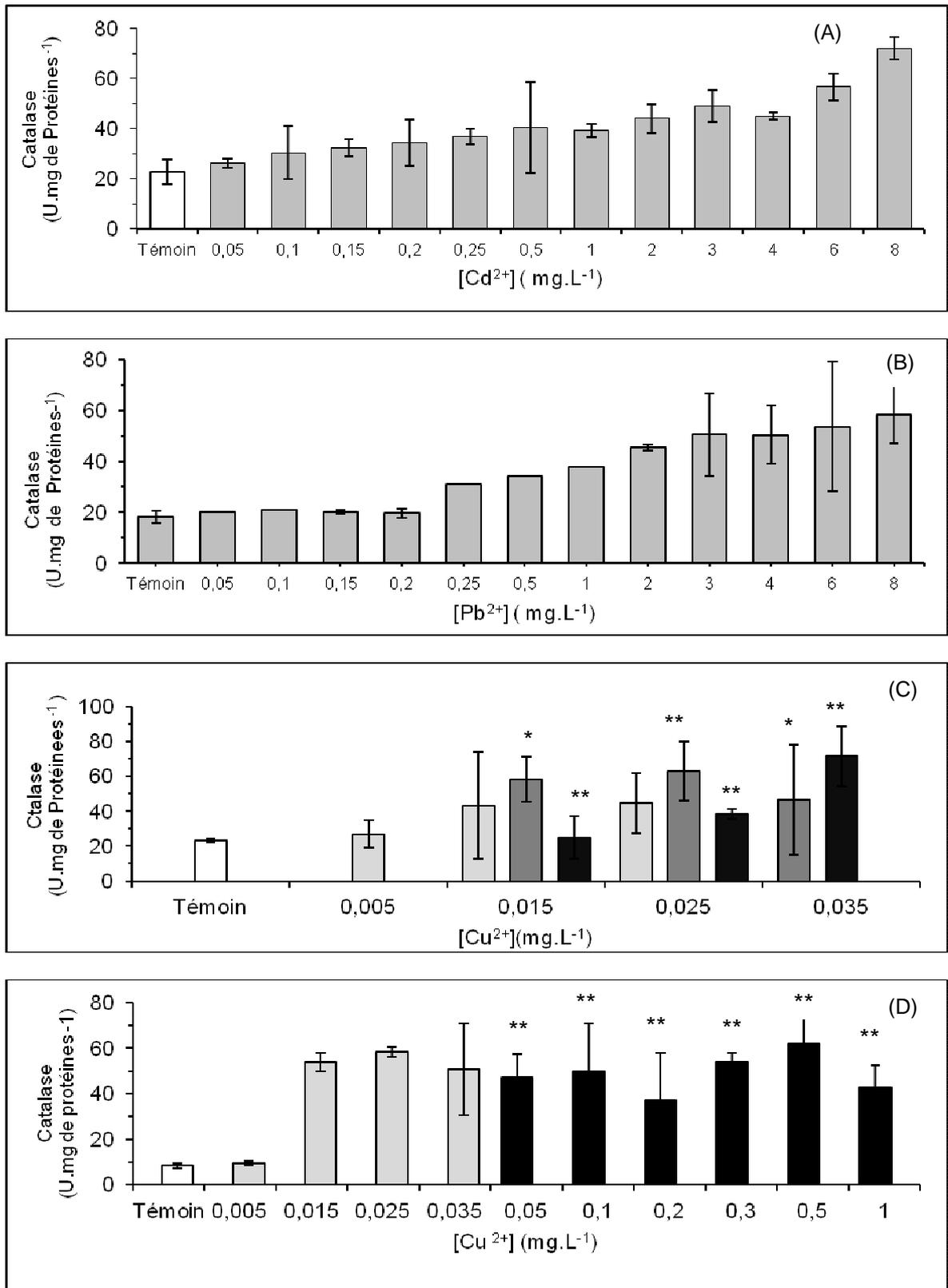


Figure 4.6 : Variation des activités catalase de *P. perna* pendant trois jours et un jour (\*) et deux jours (\*\*) chez les individus morts en présence du (A) Cadmium, (B) Plomb (C) Cuivre (essai en été) et (D) (essai en automne) (valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types).

#### 4.1.4. Discussion des résultats de la bioaccumulation, réserve en protéines et activité catalase

Pour évaluer la réponse de *P. perna* à une contamination par les métaux et pour étudier l'impact de cette contamination au niveau cellulaire, une étude au laboratoire s'avère très utile. L'exposition de la moule d'eau de mer à différentes concentrations en métaux (Cu, Cd et Zn) a entraîné des changements dans la physiologie de la moule, observable à travers les protéines et peuvent également perturber les systèmes enzymatiques de défense antioxydant à travers le biomarqueur utilisé (la catalase).

Au cours de cette étude, une augmentation de la bioaccumulation de cadmium, de plomb et de cuivre avec les concentrations de métaux testés a été observée chez les spécimens contaminés, ce qui reflète la capacité de *P. perna* à bioaccumuler ces métaux au niveau de ses tissus. La capacité bioaccumulatrice des bivalves exposés à une contamination métallique soit au laboratoire soit dans leur milieu naturel a été mise en évidence chez plusieurs espèces telles que *R. decussatus*, *C. fluminea* et *Perna viridis* [12, 41, 59].

Ainsi, sur la base des teneurs accumulés dans les chairs des moules, le classement suivant est vérifié (par ordre décroissant) :  $Pb^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$ .

Par ailleurs, une corrélation positive a été faite entre la concentration des métaux accumulés par les moules (Tableau 4.1 et 4.2) et le niveau d'induction de l'activité enzymatique CAT. De plus l'étude de l'activité CAT, dans la chair des moules (Figure 4.6), montre que cette dernière est accélérée par les métaux ( $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  et  $Cu^{2+}$ ) et cela en fonction de la concentration bioaccumulée du polluant.

Les métaux traces au niveau cellulaire sont souvent impliqués dans le stress oxydatif, ce qui entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [86]. Le stress oxydant se traduit par la formation de nombreuses espèces réactives de l'oxygène potentiellement toxiques. L'activité CAT nous renseigne sur le degré d'altération de la cellule. Ainsi, cette activité augmente-t-elle aussi bien chez des poissons que chez des bivalves exposés à des polluants métalliques ou organiques. Par ailleurs, les travaux effectués sur les biomarqueurs de stress

oxydant au laboratoire et surtout *in situ* montrent que le caractère spécifique de leur réponse constitue un avantage comme indicateur de pollution mixte [75].

La catalase est connue pour catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire, durant le métabolisme basal chez les organismes aérobies, mais aussi pour être induite par divers polluants générant un stress oxydant. Aussi, elle joue un rôle clé dans la protection des cellules contre les espèces réactives de l'oxygène, dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée [15, 65, 63, 78, 116, 146].

De plus, l'élimination de  $H_2O_2$  est une stratégie importante chez les organismes marins contre le stress oxydatif. L'augmentation des activités CAT ont été signalés dans plusieurs poissons et des espèces d'invertébrées [65]. Ainsi, la catalase est un piègeur primaire de  $H_2O_2$  dans la cellule [65]. Dans notre étude, l'augmentation de l'activité CAT sous l'effet du cadmium, plomb et cuivre à différentes concentrations dans *Perna perna*, indiquent en outre que le stress de la pollution métallique par les métaux testés implique l'élévation de taux de formation de  $H_2O_2$  dans les cellules, donc l'induction de l'activité CAT est le signe de l'exposition des moules au stress oxydatif causé par les xénobiotiques testés.

Nos résultats sont comparables à ceux de Rajkumar et John Milton [57], d'où l'activité de l'enzyme antioxydant CAT augmente au niveau des chairs des *Perna viridis* sous l'effet des différentes concentrations en métaux ( $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ). Ainsi, Géret *et al.* ont montré que le cuivre et le cadmium affectent les systèmes antioxydants, ils provoquent une augmentation de la peroxydation lipidique chez *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis* et *Crassostrea virginica* [147].

L'intérêt majeur de la catalase réside dans le caractère aspécifique de sa réponse, ce qui constitue un avantage comme indicateur d'un état de pollution mixte [65].

Par ailleurs, parmi les polluants métalliques, le cuivre est le plus toxique pour la létalité chez les bivalves, suivi du mercure. Bien qu'il soit difficile de faire un classement général à cause des différences de sensibilité entre espèces, sur la base des valeurs des  $CL_{50}$ , le classement suivant est souvent vérifié :  $Cu^{2+} > Hg^{2+} > Cd^{2+} > Pb^{2+}$  [41].

Amiard-Triquet *et al.* [148] ont noté que quel que soit l'espèce ou le paramètre toxicologique considéré la toxicité du plomb tétra-éthyle (plomb organique) est

beaucoup plus élevée que celle du plomb sous forme minérale. Ainsi, plusieurs auteurs ont noté que les concentrations létales de plomb minéral sont en général comprises entre 2,5 et 9 mg.L<sup>-1</sup>, cependant, les durées d'exposition sont variables selon ces auteurs (de 2 à 105 jours). En effet, l'augmentation du temps d'exposition provoque la diminution apparente des concentrations létales du plomb vis-à-vis des mollusques [43,149]. D'autres études ont montré que la matière organique a un rôle négligeable en eau de mer dans la chélation du plomb. Par ailleurs, Raspor *et al.* [150] ont déterminé que moins de 10 % du plomb serait complexé par les matières humiques en eau de mer.

Les lots utilisés dans nos expériences sont distribués au hasard dans les enceintes expérimentales et sont rigoureusement contrôlés pour leur bonne condition (bonne fixation au support) avant l'expérience. Il est donc peu probable que les faibles mortalités observées pour 4, 6 et 8 ppm, dans l'essai, soient le fait d'échantillons de moules en mauvaise condition au départ.

La résistance à court terme de *P. perna* au Plomb minéral est constatée pour d'autres espèces adultes de mollusques bivalves tels que *Perna viridis* (CL<sub>50-96h</sub> : 8,82 mg.L<sup>-1</sup>; CL<sub>50-186h</sub> : 4,46 mg.L<sup>-1</sup>), *Mytilus edulis* (CL<sub>50-105j</sub> : 5 mg.L<sup>-1</sup>), *Mya arenaria* (CL<sub>50-7j</sub> : 8,8 mg.L<sup>-1</sup>), *Cardium edule* (CL<sub>50-96h</sub> : 100 mg.L<sup>-1</sup>) et pour la moule d'eau douce *Dreissena* (CL<sub>50-96h</sub> : 10 mg.L<sup>-1</sup>) [41, 193]. Watling [151] a rapporté à cet égard que la CL<sub>50-96 h</sub> chez *P. perna* et *Chromomytilus* est supérieure à 10 ppm. D'autres espèces montreront par contre une sensibilité importante, c'est le cas de *Crossostera margaritacea* dont la CL<sub>50-96 h</sub> est de 0,8 ppm [38].

Dans notre étude, il est vraisemblable que le cadmium et le plomb ne provoquent pas des atteintes physiologiques ou biochimiques aiguës pour *P. perna*, il semble donc que la toxicité de ces deux métaux ne se manifeste que lors d'expositions chroniques. De ce fait, il est probable que les concentrations de métaux requises de Cd<sup>2+</sup> et Pb<sup>2+</sup> pour déclencher cette réponse enzymatique (activité CAT) sont bien inférieures à celles qui provoquent une crise dans l'organisme cible ou une dégradation visible de l'écosystème. De ce fait, ces résultats montrent que les systèmes antioxydants sont des biomarqueurs capables de révéler précocement les effets des xénobiotiques exerçant leur toxicité *via* un stress oxydant.

Par ailleurs, la toxicité élevée du cuivre chez *P. perna* n'est cependant pas surprenante, ce métal est connu pour être un molluscicide efficace [38]. Sa forte accumulation dans les tissus de la moule affecte parfois significativement plusieurs processus physiologiques et biochimiques comme l'inhibition de production des byssus, nécrose des tissus, perturbation des réserves énergétiques, ainsi que la croissance [15, 418, 58, 152, 153, 154].

Nos résultats montrent que le cuivre exerce une toxicité létale à des concentrations relativement très faibles. Le seuil de toxicité peut être situé à 0,015 mg.L<sup>-1</sup> en cuivre tandis que 0,005 est la concentration sans effet pour une exposition de 72 h. Ces niveaux seuls situent *P. perna* parmi les espèces les plus sensibles à l'action létale de cuivre. Par comparaison, les données de Scott et Major [155] ainsi que de Davenport et Maneley [156] indiquent, chez *Mytilus*, un seuil de létalité entre 100 et 200 mg.L<sup>-1</sup> pour une exposition de 4 jours. Chez d'autres espèces comme *Perna viridis* et *Chromomytilus meridionalis*, les concentrations seuils pour la létalité sont supérieures à 200 mg.L<sup>-1</sup> [41, 157]. Ainsi cette valeur est inférieure en terme de concentration et de durée d'exposition par rapport aux valeurs de Watling [151] pour *Perna perna* (CL<sub>50-96h</sub> = 0.25 mg.L<sup>-1</sup>) et d'autres espèces telles que *Mytilus edulis* (CL<sub>50-96h</sub> = 480 mg.L<sup>-1</sup>) et *Tellina tenuis* (CL<sub>50-96h</sub> = 480 mg.L<sup>-1</sup>) [41]. De ce fait, il est probable que, dans notre étude, la mortalité manifestée avec de faibles concentrations en cuivre est liée à surdoses ajoutées pendant les tests d'écotoxicité, sachant que les témoins présentaient eux même des teneurs importantes du cuivre bioaccumulée, résultat probable de la contamination du site d'échantillonnage par le cuivre.

Les valeurs mesurées de l'activité CAT chez les individus mortes exposées au cuivre, prouve la sensibilité et l'efficacité du système de défense antioxydants et l'effet protecteur de la catalase, contre les dommages causés par l'exposition au cuivre, et peut être interprété par le modèle de débordement cellulaire par saturation du mécanisme de détoxification de la métallothionéine [15]. Ainsi, le flux d'entrée du Cu<sup>2+</sup> dépassait les capacités de l'organisme à détoxifier le métal, et cette augmentation correspondrait au déclenchement des effets délétères chez l'organisme exposé et l'inefficacité à maintenir l'homéostasie cellulaire et piégeage des radicaux libres. Ces dernières jouent un rôle important dans la réduction des effets cytotoxiques des métaux [59]. Ce sont des protéines (fortement soufrées de

faibles poids moléculaires) qui régulent l'homéostasie des métaux essentiels (cuivre, zinc,...etc.) et qui assurent la détoxification des métaux non essentiels (cadmium, plomb,...etc.). Elles peuvent être induites chez certains organismes soumis à une contamination chimique [158]. De plus, une production excessive de ROS en réponse à la désintoxication des métaux lourds qui peuvent submerger les mécanismes de défense, conduisant à des dommages cumulatifs responsables de la cancérisation des tissus ou à un vieillissement prématuré [15]. Ainsi, l'activité CAT dans les moules n'est pas suffisante pour éliminer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avant la formation de radicaux hydroxyles [159].

Par ailleurs, il a été remarqué une forte production du mucus dans le cas de cuivre par rapport au cadmium et au plomb. La coloration de l'eau de mer devenait marron, avec formation de mousse dans les bacs d'élevage. Selon Lagadic *et al.* [7], la sécrétion de mucus par les mollusques bivalves est connue comme stratégie de défense pour lutter contre les effets toxiques des métaux en solution. Ainsi, la sécrétion des mucus est un signe visible de la toxicité des métaux, elle augmente chez les moules avec la concentration croissante en métal (Cd, Cu, Pb et Zn).

Du point de vue adaptatif, la réaction comportementale permet à l'animal de limiter le contact avec le milieu extérieur défavorable, évitant ainsi l'intoxication aiguë. Cependant, d'un point de vue physiologique, la réduction du temps de filtration qui en résulte peut avoir des conséquences néfastes sur le niveau d'alimentation, avec des effets possibles sur la croissance et la reproduction. D'autres conséquences sur la respiration sont également possibles [41].

Par ailleurs, et dans le cas d'exposition des moules au xénobiotique Cu<sup>2+</sup>, il a été remarqué des réactions de fermeture fréquentes des coquilles pendant les premiers temps d'exposition tandis qu'au troisième jour, les animaux réagissent d'une façon moins fréquente. Une étape d'affaiblissement est perceptible au moment du contrôle de mortalité par le stimulus tactile et les moules perdent leurs byssus. Il est vraisemblable que dès le début de l'exposition, le métal exerce une forte toxicité physiologique et cellulaire pendant les périodes d'ouverture et également pendant les fermetures, car il continuait à être absorbé à partir du liquide palléal. Cette forte toxicité rendrait l'animal incapable par la suite d'assurer

une bonne fermeture pour s'isoler du milieu extérieur. Cette baisse de réaction conduit à la poursuite de l'exposition effective de l'animal donc à plus de toxicité, aboutissant finalement à la mort de l'organisme. Des atteintes histologiques graves (rupture des jonctions inter-filamentaire au niveau des branchies, décollement des cellules de l'épithélium branchial), peuvent se conjuguer aux effets physiologiques et biochimiques et conduire à la mort [41].

La comparaison du degré d'induction de l'activité CAT par les trois métaux fait apparaître que l'induction de l'activité CAT est plus marquée en présence du cuivre. Ainsi, comme exemple, l'induction de l'activité CAT, en présence de  $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$  en cuivre est de  $38,55 \pm 3,00 \text{ U/mg}$  de protéines et  $58,32 \pm 2,27 \text{ U/mg}$  de protéines en été et automne respectivement, alors qu'il est de  $26,17 \pm 1,88$  et  $20 \text{ U/mg}$  de protéines en présence de  $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$  en cadmium ou plomb respectivement. Ainsi, le classement du degré d'induction de l'activité CAT peut être illustrée comme suit :  $\text{CAT (Cu}^{2+}) \gg \text{CAT (Cd}^{2+}) > \text{CAT (Pb}^{2+})$ .

La toxicité létale du cuivre ne varie donc pas avec les deux saisons d'essais en laboratoire (été ou automne). Widdows [160] a montré que la toxicité létale du cuivre ne varie donc pas avec le cycle de reproduction (indépendamment de l'état de maturité génitale).

A travers nos résultats, les teneurs en protéines totaux enregistrent de légères augmentations ou pas d'effet remarquable (cas de cadmium), augmentation (cas de plomb), légère diminution, augmentation ou pas d'effet remarquable (cas de cuivre en été et automne). En effet, le dosage des réserves énergétiques (protéines, glycogène et lipides) allouées aux différentes fonctions de l'organisme va donc renseigner sur l'état physiologique global des animaux [158].

Les organismes exposés à la contamination chimique vont utiliser de l'énergie pour limiter l'altération physiologique causée par les substances présentes dans le milieu. Ainsi, la quantité d'énergie disponible pour assurer les fonctions vitales de l'organisme devienne moins importante chez les organismes non exposés [158]. Selon Mosleh *et al.* [161] la déplétion des protéines est une réponse de défense précoce face à un stress chimique. Ainsi, la déplétion des teneurs en protéines peut être attribuée au catabolisme des protéines comme réponse à la demande

énergétique. Pour surmonter la situation de stress les organismes ont besoin d'une grande énergie, cette demande peut induire le catabolisme protéique.

D'autre part, les résultats du Chaabouni sur la toxicité du cadmium indiquent une augmentation de la synthèse protéique chez *Ruditapes decussatus* pour la fixation du cadmium tel que les MTs, le glutathion et quelques enzymes (superoxyde dismutase, catalase,...etc.) [9]. Des résultats similaires ont été observés par Géret et Cosson [147], qui ont montré une augmentation des concentrations en protéines après 4 jours d'exposition au cadmium ( $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) au niveau des branchies, de la glande digestive et du manteau de *M. edulis*. Ainsi, Rajkumar *et al.* [57] ont observé une augmentation des teneurs de protéines totales chez *Perna viridis* exposée à différentes concentrations en cuivre, plomb et zinc.

Selon Letendre [66], les protéines sont oxydées par les ROS et les radicaux issus de la peroxydation des lipides, elles constituent une cible critique de l'action des radicaux libres, dans la mesure où l'altération de leur structure et de leur conformation peut entraîner une altération de leur fonction. Les groupements thiols sont en effet préférentiellement attaqués par les ROS, l'oxydation des résidus sulfhydryles peut donner lieu à des clivages ou des pontages au sein de la protéine. Les modifications structurales des protéines peuvent avoir plusieurs conséquences. D'abord, l'atteinte à la structure, importante dans le cas de formation de ponts disulfures, se traduit presque inévitablement par une perte de la fonction de la protéine. Cela donne généralement lieu à des perturbations de divers processus cellulaires, notamment *via* l'inactivation des enzymes et l'altération des protéines membranaires impliquées dans les transports ioniques [7,66].

Pour compléter cette discussion, il est recommandé d'étudier la spéciation de chaque élément. De plus, le système d'exposition (système statique avec renouvellement périodique) et les caractéristiques physicochimiques de notre milieu d'essai (notamment la dureté) ont probablement une influence sur les résultats. En effet, l'étude de Maarouf [162] pour le Zn et celle de Benyahia *et al.* [163] pour le Pb, montrent qu'il y a une forte perte en métal dissous pendant le cycle de 24 heures (entre 35% et 50% pour le cuivre, entre 40 et 70% pour le Zinc et près de 70% pour le plomb). Cette perte en métal dissous, due essentiellement

à sa précipitation et à son adsorption sur les parois des bacs expérimentaux, équivaut à une baisse progressive de la biodisponibilité du métal pour les organismes.

En général, différentes réponses de l'activité CAT ont été relevées dans cette présente étude. Ainsi l'induction enzymatique s'est trouvée dépendante de la nature du polluant testé. De plus, la différence de toxicité entre les métaux suggère que leurs modes d'action au niveau cellulaire et physiologique soient différents, bien que les seuils de concentration qui provoquent la forte réponse soient très différents d'un métal à l'autre.

La CAT est considéré par de nombreux scientifiques comme un bio-marqueur important et sensible du stress oxydatif, mieux que la SOD, révélant des effets biologiques sur l'état redox des organismes marins [159]. De plus, la facilité de leur dosage, plusieurs auteurs qualifiant la catalase comme bio-marqueurs sensible et pratique dans la bio-surveillance des écosystèmes marins [62,78, 164].

#### 4.1.5. Résultats des tests contamination/décontamination

Les résultats relatifs au dosage de la catalase (CAT) chez *P. perna* dans les différents milieux d'élevages contaminés par le cadmium, le plomb et le cuivre, pour une exposition pendant trois jours suivie de dix jours de décontamination, sont représentés dans les figures 4.7.

Les conditions physicochimiques de l'eau destinée aux essais reste dans une gamme de valeur normale en milieu marin [97] (Appendice G).

Globalement, pour l'ensemble des tests de contamination et de décontamination réalisés, des augmentations de l'activité CAT ont été observées au cours du cycle de contamination pour toutes les xénobiotiques testées (Cd, Pb, Cu). L'induction la plus importante a été enregistrée après soixante-douze heures d'exposition atteignant  $56,37 \pm 7,49$  U/mg de protéine en présence de  $0,015 \text{ mg.L}^{-1}$  en cuivre par rapport aux témoins ( $21,28 \pm 12,10$  U/mg de protéine). Ces résultats supportent la reproductibilité des résultats conformément avec les tests d'écotoxicités auparavant.

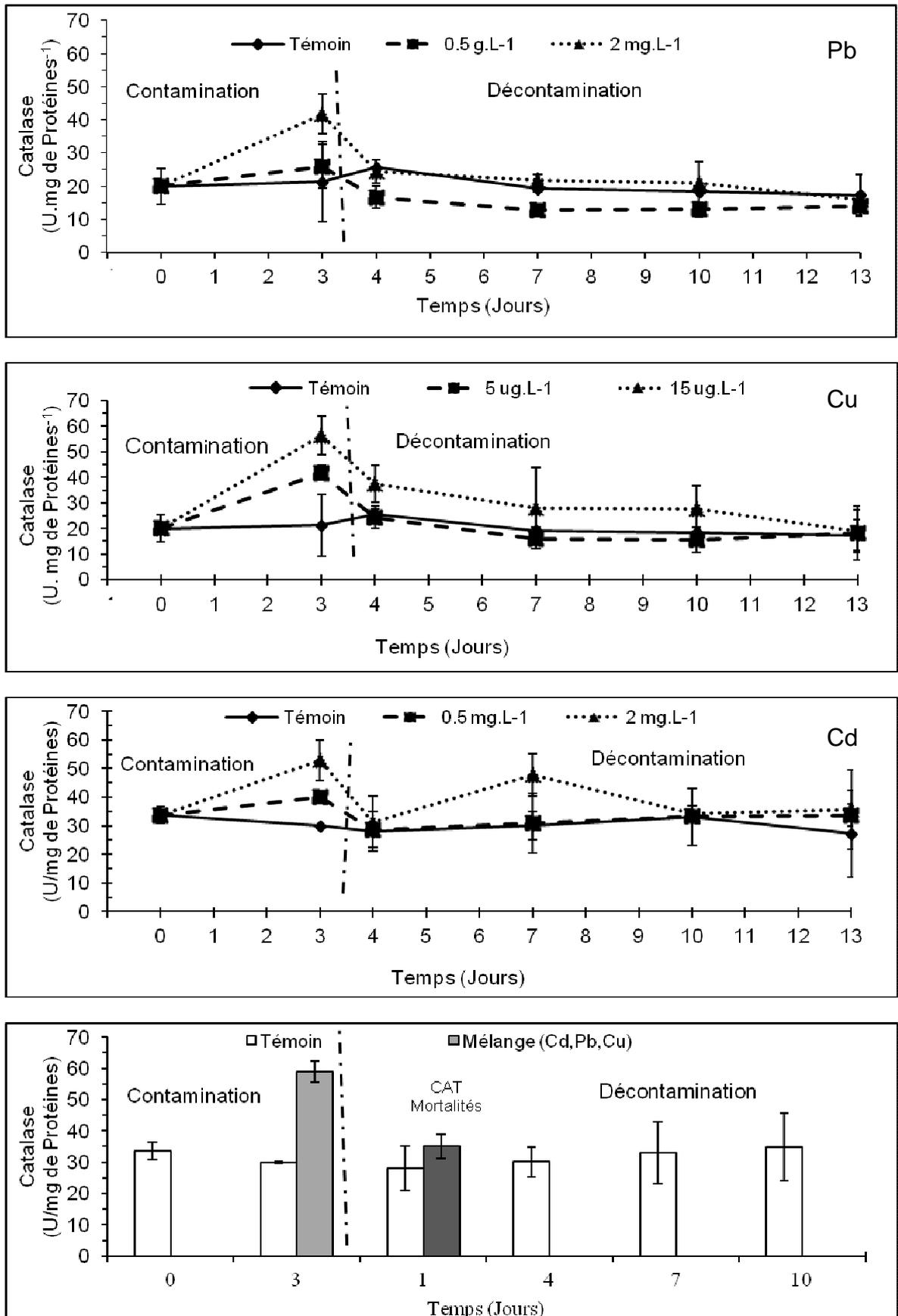


Figure 4.7 : Variation de l'activité CAT chez les moules en fonction des concentrations et le temps (phases contamination / décontamination).

Dans le cycle de décontamination, l'activité CAT décroît chez les moules exposées aux concentrations de plomb. Ainsi, après 1 jour, 3 jours, 7 jours et 10 jours de décontamination, l'activité CAT décroît chez les moules exposées à 2 mg.L<sup>-1</sup> au plomb pour atteindre des valeurs de 24,39±3,59 ; 21,74±1,8 ; 20,83±6,37 et de 15,99±1,63 U/mg de protéine respectivement, soient des réductions de 38,82 % ; 47,95 % ; 50,13 % et 61,71 %, respectivement. Aussi, des pourcentages de réductions de 36,10 % ; 51,28 % ; 50,17 % et 46,36 % sont enregistrées chez les moules exposées à 0,5 mg.L<sup>-1</sup> au plomb après 1 jour, 3 jours, 7 jours et 10 jours de décontamination, respectivement.

De même, une baisse d'activité CAT est nettement claire dans le cas de cuivre. L'activité CAT décroît chez les moules exposées à 0,015 mg.L<sup>-1</sup> au cuivre pour atteindre des valeurs de 37,55±7,23 ; 27,96±15,76 ; 27,81±8,76 et de 19,00±8,27 U/mg de protéine après 1 jour, 3 jours, 7 jours et 10 jours de décontamination respectivement, soient des réductions de 38,82 % ; 47,95 % ; 50,13 % et 44,07 %, respectivement. De plus, des pourcentages de réductions de 41,65 % ; 61,62 % ; 62,89 % et 56,17 % sont enregistrées chez les moules exposées à 0,005 mg.L<sup>-1</sup> au cuivre après 1 jour, 3 jours, 7 jours et 10 jours de décontamination, respectivement.

Ainsi, après 1 jour, 3 jours, 7 jours et 10 jours de décontamination, l'activité CAT décroît chez les moules exposées à 2 mg.L<sup>-1</sup> en cadmium pour atteindre des valeurs de 31,31±9,01 ; 47,88±7,49 ; 34,11±2,92 et de 35,71±13,83 U/mg de protéine respectivement, soient des réductions de 33,38 % ; 50,39 % ; 50,66 % et 66,29 % respectivement. Aussi, des pourcentages de réductions de 28,75 % ; 23,26 % ; 17,19 % et 16,02 % sont enregistrées chez les moules exposées à 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de cuivre après 1 jour, 3 jours, 7 jours et 10 jours de décontamination, respectivement.

De plus, les plus forts pourcentages de réductions ont été notés dans le cas de cuivre suivi par le plomb et le cadmium. Ces résultats de décontamination (cas de Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> et Cd<sup>2+</sup>) permettront de conclure que les individus semblent retrouver un état physiologique normal (réversibilité des mécanismes physiologiques), et suggère que la dépuration réduit le taux de formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules, donc l'induction de l'activité CAT qui traduit la capacité d'élimination de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les bivalves si elles se trouvent dans une eau propre [1, 57, 59,165].

Ainsi, Leonie *et al.* [165] ont observé un retour de l'activité de la catalase aux niveaux de base après 7 jours de dépuración, et une augmentation de GST dans les branchies des huîtres exposés aux différentes concentrations en cuivre. Par contre, LPO et GSH restent stables dans cette phase de dépuración.

La réversibilité de stress causé par les métaux dans le cycle de contamination est nettement claire dans le cycle de décontamination pour les trois xénobiotiques testés, en particulier le cuivre. Cette réversibilité est démontrée par le retour aux niveaux de base de l'activité CAT dans le cycle de décontamination (10 jours), ainsi, à la fin du cycle de décontamination, cette activité atteint des valeurs comparables au témoin. Il est probablement que le temps requis dans notre test est suffisant pour que les activités enzymatiques (CAT) retournent aux niveaux de base.

Par contre, Andrea [166] suggère une durée de décontamination supérieure à 15 jours pour que les huîtres *Crossostera gigas*, exposés aux HAP pendant 2 jours, puissent retrouver leur état de santé et leurs activités enzymatiques (phenoloxydases), retournent aux niveaux de base.

Leonie *et al.* [165] ont observé une ré-stimulation de la GST et CAT dans l'hépatopancréas durant la phase de décontamination, chez les moules traitées par différentes concentrations en cuivre au laboratoire. Cette ré-stimulation peut être une réponse par l'huître à la détoxification de cuivre au niveau des tissus, par déclenchement des systèmes enzymatiques antioxydants en particulier dans l'hépatopancréas où le cuivre est connu à séquestrer dans ces derniers et pour permettre aux processus de désintoxication à purger l'excès des métaux à partir de ces tissus.

La moule qui filtre en continu l'eau de mer pour se nourrir et respire concentre des quantités énormes d'éléments traces si l'eau est polluée, par contre, elle "relargue" ces éléments si elle se trouve dans une eau propre. Cette biologie particulière désigne cet organisme comme un témoin irréfutable de la pollution marine locale au même titre que certains organismes planctoniques de mers [1]. Ainsi, selon Leonie *et al.* [165] la purification ou la purge des métaux a été observée lorsque les huîtres ont été retournées à l'eau de mer propre. Selon les mêmes auteurs, il est probable que les changements de réponses enzymatiques

sont rapides, contrairement à la perte des métaux au cours de la dépuración [166].

Ainsi, après 3 semaines de post-exposition, la perte de cadmium chez *Corbicula fluminea* n'a atteint que 4% du métal accumulé pendant une intoxication d'une durée identique avec  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  [167].

En conditions semi-naturelles, *Unio pictorum* intoxiqué avec  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cadmium pendant 12 semaines a relargué environ un tiers de la charge métallique pendant une phase de post-exposition de 29 semaines [168]. Des taux de dépuración variables selon les organes ont été observés chez *Anodonn anatina* et *Unio pictorwn* alors que la perte de cadmium en fonction du temps a été significative surtout au niveau des branchies, les concentrations sont restées stables ou ont même augmenté dans les organes cibles, comme le rein et l'hépatopancréas [169].

Par ailleurs, la décontamination était de 35% au bout de 30 jours pour des moules zébrées exposées à  $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$  de plomb pendant 20 jours. La capacité d'élimination du plomb par les bivalves est confirmée dans des travaux de terrain dans une expérience destinée à étudier l'évolution des teneurs métalliques dans la moule marine *Mytilus edulis* sous l'effet d'un stress trophique [170]. Des effets synergiques ou antagonistes de différents métaux (ou d'autres contaminants) sur la réponse des biomarqueurs *in situ* ne serait pas observée dans le laboratoire [165]. Donc les études sur les mélanges des xénobiotiques au laboratoire reflètent des effets écotoxicologiques combinés de mélanges fréquemment retrouvés dans le milieu naturel.

Les résultats montrent des pourcentages de mortalités de 26, 20 et 20% après 24, 48 et 72 h d'exposition au mélange métallique (Cu à  $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ , Pb et le Cd à  $2 \text{mg.L}^{-1}$ ) respectivement. Ainsi, un effet létal se manifeste même après l'arrêt de l'exposition (cycle de décontamination), 100% de mortalité après un jour de post-exposition. Plusieurs auteurs ont noté que l'effet létal peut se manifester même après l'arrêt de l'exposition ; chez *Mytilus*, Sunila [171] a enregistré des mortalités 6 jours après l'arrêt de l'exposition ( $0,4 \text{mg.L}^{-1}$  en cuivre), ce qui indique que les atteints subies étaient irréversibles.

De plus, la toxicité du mélange sur la base des concentrations (Cu à  $15 \mu\text{g.L}^{-1}$  ; Pb et Cd à  $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) qui présente une toxicité supérieure à celle des métaux agissant seul (absence de mortalité durant les tests). Il apparue que les interactions entre les métaux pour le mélange de cadmium, plomb et cuivre sont de type synergique. Des études de toxicité combinée ont mis en évidence des cas d'effets plus qu'additifs (synergisme). Ainsi, Mohan *et al.* [172] ont trouvé une interaction de ce type entre le mercure et le cadmium chez *Perna viridis*. En revanche, Rodgers *et al.* [173] ont décrit un antagonisme entre le zinc et le cuivre chez *Corbicula fluminea*, le zinc diminuant l'effet toxique du cuivre. Une simple additivité a été également rapportée pour ces deux derniers métaux chez des embryons de *Crassostrea virginica*.

Par ailleurs, une augmentation de l'activité CAT est mesurée chez les spécimens au cours de cycle de contamination pour le mélange des xénobiotiques testé (Cd, Pb, Cu). En effet, l'activité CAT est 2 fois plus importante chez les individus par rapport au niveau de base. Même cette activité reste élevée chez les individus morts ( $35,04 \pm 3,89$  U/mg de protéine) par rapport au témoin ( $28 \pm 7,07$  U/mg de protéine) durant le cycle de décontamination.

Ainsi, le classement du degré d'induction de l'activité CAT pour les concentrations testées seul et au mélange, peut être illustrée comme suit :

$$\text{CAT (Cu}^{2+} + \text{Cd}^{2+} + \text{Pb}^{2+})_{\text{mélange}} > \text{CAT (Cu}^{2+})_{\text{seul}} > \text{CAT (Cd}^{2+})_{\text{seul}} > \text{CAT (Pb}^{2+})_{\text{seul}}$$

Il semble donc que le mélange stimulant l'activité CAT chez les spécimens exposés à plus qu'un métal. Donc, le caractère aspécifique de leur réponse constitue un avantage comme biomarqueur d'un état de pollution métallique mixte [78].

Selon plusieurs auteurs, les biomarqueurs de défense comme CAT contribuent au maintien de l'homéostasie de l'organisme [7,41]. Ainsi, les mesures de réponses des biomarqueurs lors de l'exposition ou de dépuration aident à identifier les changements temporels transitoires dans les biomarqueurs à la fois sur le terrain et des conditions de laboratoire [165].

#### 4.1.6. Résultats du test de transplantation de moule (Application *in situ*)

##### 4.1.6.1. Paramètres hydrologiques

Les différents résultats de mesures, *in situ*, de la température (T °C), la salinité (Sal Psu), l'oxygène dissous (DO<sub>2</sub> mg.L<sup>-1</sup>) et le pH sont regroupés dans le tableau 4.3.

Tableau 4.3: Caractéristiques physico-chimiques des sites d'échantillonnages

Sites	T (°C)	Sal (Psu)	DO <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	pH
Elevage en laboratoire	10,72±0,50	38,31±0,04	6,09±1,13	6,35±0,10
Ain Tagourait (S <sub>R</sub> )	13,96±0,48	37,27±0,16	6,09±0,90	6,62±0,31
Port Bouharoune (P <sub>1</sub> )	14,02±0,46	37,04±0,51	4,23±0,62	6,70±0,51
Port Khemisti (P <sub>2</sub> )	14,35±0,92	37,71±0,29	3,93±0,93	6,85±0,70

Il est connu que les différentes activités biologiques (croissance, bioaccumulation et détoxification des polluants chimiques, réponses enzymatiques des biomarqueurs,...etc.), mesurées chez les bivalves, sont étroitement influencées par les facteurs abiotiques du milieu environnant [15, 39,44, 51, 52, 65, 78, 138,159].

De plus, la réponse de catalase dépend des facteurs abiotiques du milieu, notamment la température et l'oxygène, très limitant en milieu lagunaire. Pellerin-Massicotte [174] a déjà observé, chez les moules d'une zone estuarienne, l'effet stimulant d'une élévation de la température sur l'activité CAT.

Dans notre étude, l'immersion des stations artificielles a été réalisée pendant la période de repos sexuel dans les mois de février et Mars, dans le but de minimiser les effets de la fluctuation des températures et du cycle de reproduction sur les signaux de biomarqueur. En effet, la température varie légèrement. Les inductions atteintes de l'activité CAT sont donc le résultat direct de l'effet du degré de pollution des sites d'études.

A partir des résultats obtenus, il a été remarqué que les variations de températures dans les différentes localités restent relativement stables pendant la période d'étude et les valeurs mesurées sont dans la limite des valeurs

saisonniers. De fait, les températures mesurées dans les sites de contamination des moules (ports de Khemisti et Bouharoune) ne présentent pas un stress naturel pouvant perturber le métabolisme et l'activité physiologique des spécimens transplantés. Les valeurs de la salinité sont stables pendant la durée d'étude pour les différents sites. La salinité relevée dans les sites de contamination n'a aucun effet sur les réponses biologiques des moules traduites par les biomarqueurs. En revanche, une diminution de l'oxygène dissous en fonction de site de transplantation a été observée, ( $6,09 \pm 0,90 \text{ mg.L}^{-1}$  à la station d'Ain Tagourait,  $3,93 \pm 0,93 \text{ mg.L}^{-1}$  à la station de Khemisti,  $4,23 \pm 0,62$  à la station de Bouharoune). Les fortes concentrations peuvent être expliquées par la forte agitation des eaux pendant la période de la campagne. Les concentrations minimales d'oxygène dissous retrouvées pourraient être expliquées par la présence de fortes teneurs des matières en suspension en surface et des déchets de matières organiques solides et liquides rejetés essentiellement par des unités industrielles. L'oxygène moléculaire dissous est un paramètre important du milieu qui gouverne la majorité des processus biologiques des écosystèmes aquatiques. La concentration en oxygène dissous est la résultante des facteurs physiques (température, échange air-mer et la salinité), chimiques (oxydation chimique) et biologiques (photosynthèse, respiration et régénération) [95,175]. La teneur en oxygène dissous peut subir des variations importantes. Elle dépend de la température et de la salinité de l'eau, de la pression et de la température de l'air. Le déficit en oxygène est évalué par la teneur en matière oxydable. Dans les eaux de surface l'oxygène joue un rôle fondamental dans le maintien de la vie aquatique et dans les phénomènes d'autoépuration. Quand la température augmente, la solubilité de l'oxygène diminue et les bactéries consomment plus d'oxygène, d'où la diminution de la teneur en oxygène dissous [95,175].

La concentration de l'oxygène de l'eau est sous influence de processus biologiques. Ces derniers permettent la saturation dans les zones eutrophes (accroissement important du phytoplancton), une eau très aérée est généralement sursaturée en oxygène ou la sous-saturation de l'eau dans les zones riches en matières carbonées dégradables par des microorganismes (oxydation de la matière organique, nitrification de l'azote ammoniacal). Dans le cas de leur absence, sa concentration dans l'eau de mer en contact de l'air n'est qu'en

fonction de la pression atmosphérique, la température et de la salinité de l'eau, on parle de la concentration d'équilibre ou saturation [95,175]. Ainsi, le déficit en oxygène influence la physiologie des organismes marins en entiers. L'activité des mollusques est inhibée par de faibles teneurs en oxygène dissous et par une diminution de la température. Le taux de filtration est, quant à lui, largement dépendant de la concentration de la matière particulaire dans l'eau de mer, mais aussi de la température. Il diminue avec la baisse de la température de l'eau [78,176]. Les situations d'anoxies constituent également un facteur d'induction de la CAT [66].

Dans notre étude, l'oxygène dissous enregistré au niveau des ports de pêche (Khemisti et Bouharoun) semble être un facteur d'induction de la CAT. En effet, des teneurs en oxygène dissous inférieures au niveau des ports sont notés par rapport au site d'Ain Tagourait. De plus, les concentrations en oxygène et en polluants sont également susceptibles d'affecter la physiologie des moules (le métabolisme, la croissance, la filtration,...etc.) [176]. D'où différents états physiologiques des moules transplantées au niveau d'Ain Tagourait ont été remarqués par rapport au moules transplantées aux ports de pêches (Khemisti et Bouharoun).

Abel *et al.* [177] ont signalé qu'une diminution de la teneur en oxygène est à l'origine d'une augmentation de l'activité CAT chez le ver *Heteromastus filiformis*.

D'après Dellali *et al.*, il se produit une nette augmentation de la température et une diminution consécutive des taux en oxygène dissous, à l'origine d'un phénomène épisodique de forte eutrophisation, qui donne une activité CAT élevée chez les moules et les palourdes comparativement aux autres stations en même lagune [65].

En plus des processus physiques, chimiques, biologiques, l'accumulation de matières organiques d'origine continentale et la contamination par des rejets urbains ou industriels contribuent à la modification du pH naturel [95,176]. En milieu côtier et estuarien, certains rejets industriels ou les apports d'eaux continentales sont la cause de variation du pH qui s'avère dans ce cas un indice de pollution [95]. Cependant, les valeurs du pH obtenues dans les sites d'étude montrent des variations peu remarquables. La comparaison de valeurs entre les

différentes localités exclue l'effet gênant ou stressant du pH sur les individus transplantés.

Les résultats relatifs aux mesures des sels nutritifs (phosphore, azote ammoniacal, nitrites, nitrates) dans les sites de contaminations et site de référence sont illustrés par la figure 4.8.

En général, des variations irrégulières de la concentration des composés azotés et les concentrations en phosphore sont enregistrées dans les différents sites de contamination (Port de Bouharoun et Khemisti). Ainsi, les teneurs relevées dans ces derniers sont trouvées supérieures à celles mesurées au site de référence, (Figure 4.8).

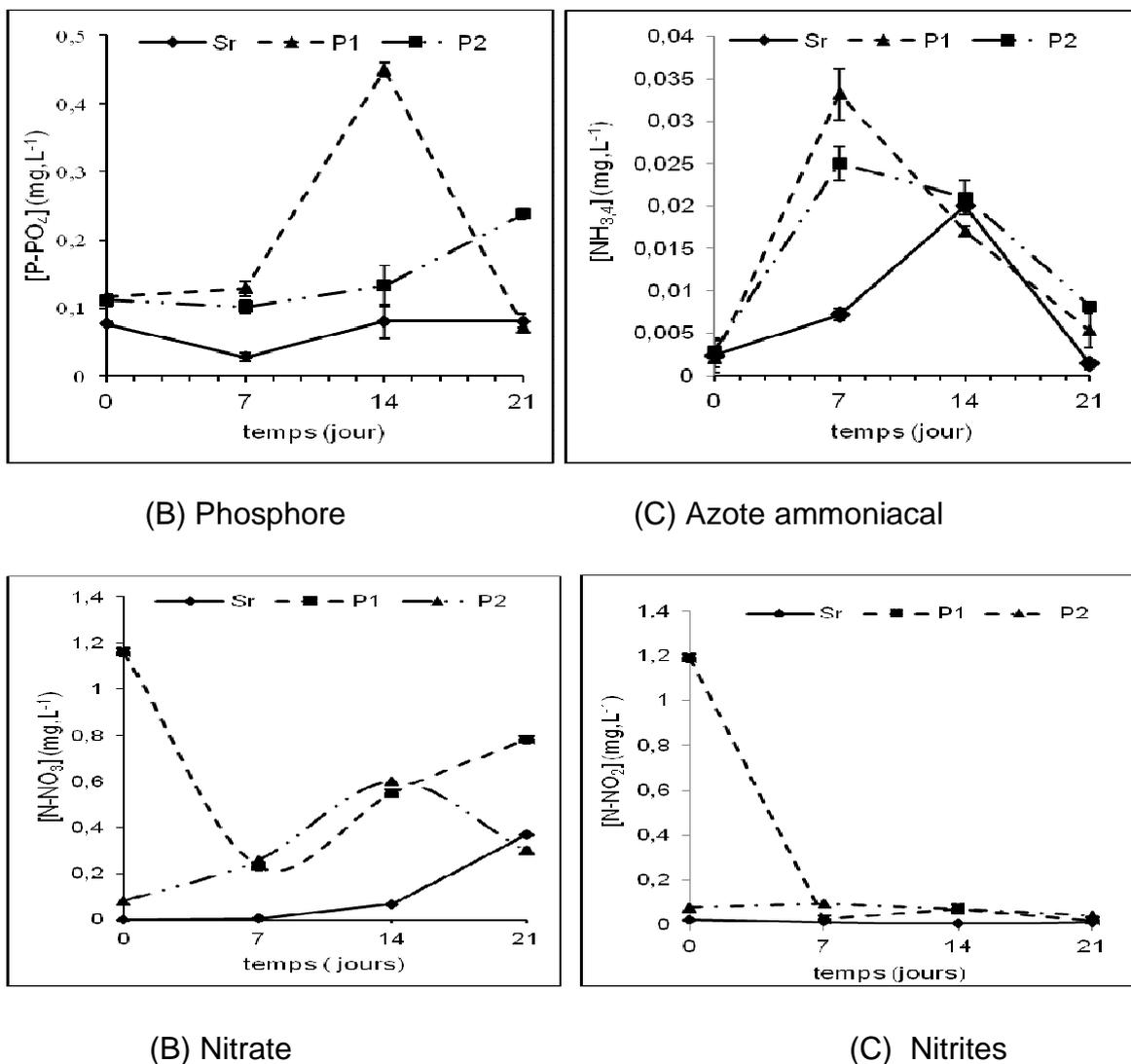


Figure 4.8 : Variation des teneurs en sels nutritifs dans les sites de contamination.

S<sub>r</sub> : Site de référence, P<sub>1</sub> : Port de Bouharoun, P<sub>2</sub> : Port de Khemisti

Dans la présente étude, des concentrations élevées en  $\text{NH}_4^+$  sont mesurées dans les zones portuaires (Bouharoun et Khemisti) comparativement au site de référence, elles peuvent être dues aux différents rejets domestiques, ceux liés aux activités de pêche, des travaux d'entretien des bateaux déversés au niveau des ports. Les faibles valeurs enregistrées au niveau de site de référence pourraient s'expliquer par un brassage de l'eau et l'utilisation préférentielle des espèces aquatiques de la forme ammoniacal d'azote qui est la forme la plus réduite et la plus avantageuse d'un point de vue énergétique [175].

Par ailleurs, les valeurs élevées en nitrates en surface au niveau des ports, sont la cause, soit, d'un apport terrigène, soit à la dégradation de la matière organique [175]. Ainsi, l'explication du maximum de nitrates trouvé au niveau des ports laisse supposer qu'il y a un apport extérieur au milieu, exemple des zones d'hausse d'eau (upwelling) très riche en nitrates. Ainsi, à la surface, les plus fortes teneurs en phosphates sont mesurées au port de Khemisti ( $0,45 \pm 0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Cet élément se comporte comme traceur des apports continentaux, qui sont enrichis en phosphate par les lessives ménagères. D'autre part, le phosphore peut être issu du recyclage de la matière organique par minéralisation ou différents processus biologiques [95,175].

Le tableau 4.4 regroupe les teneurs en sels nutritifs mesurées au niveau du site de décontamination (Ain Tagourait) et l'élevage des moules en laboratoire.

Dans le site de décontamination et d'élevage en laboratoire, les concentrations mesurées en sels nutritifs sont faibles est stables durant la période d'étude, (Tableau 4.4).

Tableau 4.4 : Valeurs moyennes des sels nutritifs mesurés dans le site de référence et l'élevage en laboratoire

	[N- $\text{NO}_2^-$ ]	[N- $\text{NO}_3^-$ ]	[N- $\text{NH}_{3,4}$ ]	[P- $\text{PO}_4^{3-}$ ]
Elevage en laboratoire	$0,15 \pm 0,005$	$0,23 \pm 0,005$	$0,0015 \pm 0,0007$	$0,61 \pm 0,01$
S <sub>R</sub> (décontamination)	$0,01 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,16$	$0,003 \pm 0,001$	$0,07 \pm 0,07$

#### 4.3.2. Résultats bactériologique

Les résultats de l'analyse bactériologique de l'eau de mer et les moules transplantées aux trois sites d'études sont données en Appendice G.

D'après les résultats obtenus, le nombre des indicateurs fécaux (Coliformes totaux, Coliformes fécaux, *Escherichia coli*, et Streptocoques Fécaux), est important dans l'eau de mer de port de Khemisti par rapport au port de Bouharoun et le site de référence d'Ain Tagourait où il a été noté de faibles valeurs avec une moyenne de 187,5 germes.L<sup>-1</sup> pendant la durée d'étude (Appendice G , Figures A.G.1 (A,B,C,D)). Ces différents degrés de contamination bactérienne de l'eau des localités de transplantation peuvent influencer l'état physiologique des moules. Par ailleurs, parmi les supports capables de piéger les bactéries présentes dans l'eau, et de les maintenir en vie, les supports inertes, les sédiments et les animaux marins sont le plus souvent évoqués. Parmi les animaux marins capables de retenir les bactéries présentes dans l'eau, les bivalves sont le plus souvent cités, en raison de leur forte capacité de filtration, qui leur permet de concentrer les particules et les polluants du milieu [116].

Ainsi, selon les études de Cusson et Riisgard *et al.*, la physiologie de filtration et de rétention bactérienne chez les bivalves dans leur milieu serait sous l'influence des conditions abiotiques, ainsi, des corrélations significatives ont été établies entre les charges de bactéries dans l'eau, d'une part, et celles accumulées dans les moules, d'autre part. Ces dernières refléteraient bien l'état de leur milieu environnant [178,179].

Dans notre étude, il a été remarqué que les coliformes totaux ont une concentration importante au niveau des moules transplantées au port de Khemisti et Bouharoun, comparativement aux moules transplantés au site de référence. D'où les concentrations des coliformes totaux restent stables pendant la durée d'étude. Par contre, les concentrations des coliformes totaux accumulées dans les moules diminuent pendant 15 jours de décontamination pour les moules provenant de port de Khemisti et Bouharoun (Appendice G, Figure AG.2 (A)).

Ainsi, les concentrations des coliformes fécaux accumulées dans les moules transplantés au site de références et port de Khemisti sont inférieure par rapport à celles enregistrées au niveau de port de Bouharoun. Ces faibles concentrations se traduisent par des moyennes de 42,5 et 30 germes.Kg<sup>-1</sup> pour les moules transplantées au site de référence et port de Khemisti respectivement. La valeur maximale accumulée est enregistrée dans les moules transplantées au port de Bouharoun est de 930 germes.Kg<sup>-1</sup> après trois semaines de transplantation (Appendice G, Figure AG.2 (B)).

Par ailleurs, nous avons observé des valeurs minimales des *E. coli* accumulées dans les moules qui ne dépassent pas 90 germe.Kg<sup>-1</sup> pour les trois sites d'études pendant la transplantation (cycle de contamination et décontamination), à l'exception au septième jour pour les moules transplantés au port Bouharoun (430 germe.Kg<sup>-1</sup>) (Appendice G, Figure AG.2.C). Ainsi, il a été remarqué une absence totale de Salmonelles dans les moules et dans l'eau, que ce soit pour l'eau d'élevage ou bien pour le site naturel.

L'accumulation importante des coliformes totaux par les moules au port de Bouharoun par rapport au port de Khemisti peut être liée à la charge bactérienne dans l'eau. Ainsi, selon Plusquellec *et al.* [180] la concentration des indicateurs fécaux paraît liée à la charge bactérienne dans l'eau, elle diminue pour les sites très pollués. Ils ont montré que l'augmentation de la charge en particules limitait l'activité filtrante des bivalves. Cette concentration permet également la mise en évidence plus facile des bactéries présentes en petit nombre dans le milieu.

La concentration des bactéries de l'eau par les bivalves est donc tout à fait effective, mais on doit remarquer qu'elle diffère nettement pour les trois groupes bactériens étudiés (CT, CF et EC). Delattre et Delesmont ont fait la même observation, et envisagent une explication liée à la taille des bactéries ou à l'analyse [181].

De plus, les facteurs de concentrations (défini par le rapport de concentration des bactéries dans les moules sur leur concentration dans l'eau) pour les coliformes totaux sont égaux à : 83,33 ; 126,43 ; 97,71% coliformes fécaux : 44,73 ; 79,09 ; 2,77% et 133,33 ; 325 ; 25,53 % pour l'*Escherichia*, ce qui correspond au site de référence, station de Bouharoun et de Khemisti respectivement. Cette différence

dans les facteurs de concentration pourrait s'expliquer par une persistance plus importante des bactéries à l'intérieur des bivalves.

Prieur [182] a souligné l'adaptation de certaines bactéries aux conditions hostiles rencontrées dans le tractus digestif des moules. Or, les Streptocoques fécaux d'origine humaine se caractérisent par une bonne résistance en milieu hostile [180].

Dans notre étude, les conditions abiotiques (température, oxygène dissout et pH) et le degré de pollution chimique dans les différentes localités de transplantation peuvent influencer la distribution des populations bactériennes. Ainsi, Boukef Benomrane *et al.*, ont montré que l'oxygène dissous, la température de l'eau et la salinité, ainsi que la pluviométrie sont les facteurs les plus influençant la distribution de différentes populations bactériennes [176].

Selon la présente étude, les charges en bactéries dans l'eau ainsi que dans les moules sont faibles en période pluvieuse (caractérisée par une baisse de la température), ce qui est dû à l'effet de dilution dans les ports par l'arrivée d'eaux.

Dans notre étude, l'élimination de bactérie est très claire dans le cas de coliforme fécaux pour les moules transplanté aux ports de pêche de Bouharoune et Khemisti des pendant 15 jours de dépuración et peut être lié la reprise de l'activité de filtration afin que les contaminants soient expulsés [184,185]. Ainsi, selon Ronald, L *et al.* [185], l'élimination des contaminants microbiens, surtout celle des virus, n'est pas optimum dans toutes les conditions auxquelles on constate une activité de filtration de la part des coquillages.

Des études menées sur la purification de mollusques bivalves artificiellement inoculés avec des cultures bactériennes tendent à présenter un taux d'élimination des bactéries plus élevé que celui des coquillages contaminés d'une façon naturelle [185].

#### 4.3.3. Résultats du dosage biochimique (CAT)

Plusieurs auteurs qualifient la transplantation des moules d'un site de référence non/ou peu pollué vers des sites plus pollués comme technique très prometteuse et pertinente dans le but d'évaluer le degré de contamination des écosystèmes marins [186]. En complément des analyses chimiques de la

bioaccumulation, la mesure de biomarqueurs permet de disposer d'informations sur la nature et le niveau de la contamination chimique mais aussi sur la santé des organismes vivants et de populations des écosystèmes aquatiques [10, 11, 15,20].

#### 4.3.3.1. Résultats du dosage de la catalase

L'expérience sur la transplantation de moules au niveau des ports de Khemisti, Bouharoun et de site de référence d'Ain Tagourait pour une durée maximale de 30 jours a donné des réponses différentes et selon la durée d'exposition.

En général, une augmentation de l'activité CAT est observée chez les individus transplantés dans les trois sites portuaires par rapport au site de référence (EAM) (Figure 4.9).

Une augmentation continue de l'activité CAT est mesurée chez les spécimens transplantés au niveau du port de Bouharoun. Les inductions atteintes sont :  $65,53 \pm 21,69$  ;  $61,82 \pm 9,25$  et  $75,24 \pm 17,23$  U/mg de protéine respectivement après 7, 14 et 21 jours d'exposition.

Cependant, la plus grande induction de l'activité CAT ( $154,037$  U/mg de protéines) est relevée chez les moules transplantées au niveau du port de Khemisti au 14<sup>ème</sup> jour qui est peut être liée à une pollution accidentelle conduisant à une augmentation des agents stressants (les individus auront besoin d'un certain temps pour s'adapter à cette pollution). Il a été enregistré des teneurs élevées en phosphore ( $0,45 \pm 0,01$  mg.L<sup>-1</sup>) qui peuvent être liées aux rejets en mer des eaux usées chargées par du phosphore contenu dans les détergents et les engrais.

La concentration de l'oxygène dissous était très faible ( $3,1$  mg.L<sup>-1</sup>). Après cette hausse d'activité CAT, une diminution est enregistrée à la fin du cycle de contamination ( $53,22 \pm 37,41$  U/mg de protéines). Ainsi, Vlahogianni *et al.* [159] ont supposé que l'inhibition de la CAT est une réponse transitoire d'une pollution aiguë. Regoli *et al.* [187] ont observé que l'exposition du pétoncle de l'Antarctique au cuivre et au mercure affaiblit ses défenses anti-oxydantes (catalase et glutathion), effets qui sont corrélés aux dommages observés au niveau des membranes lysosomales.

Dans notre étude, il semble que les individus ont besoin d'un certain temps d'adaptation à cette pollution, ou probablement que la pollution au niveau de port de Khemisti affaiblit leur défense anti-oxydantes (catalase), liée aux dommages au niveau des membranes lysosomales des moules transplantés [188,189]. Aussi, le fait que l'activité CAT est élevée dans les sites pollués suggère qu'il y a un excès de  $H_2O_2$  qui diffuse dans les cellules, provoquant des dommages oxydatifs [159].

Ainsi, une fluctuation faible de l'activité CAT dans le temps a été mesurée chez les spécimens transplantés au niveau du site de référence. Elle varie entre  $34,19 \pm 7,60$  et  $43,31 \pm 12,09$  U/mg de protéine pendant trois semaines de transplantation.

Par ailleurs, les moules transplantés aux ports sont suivie d'une phase de décontamination de 15 jours dans le site de référence, zone réputée non polluée de part sa situation géographique et l'inexistence d'importante source de pollution et comme site d'élevage aquacole. L'opération s'avère intéressante, où il a été observé une diminution de l'induction de la CAT, qui atteint des valeurs comparables à la CAT des moules transplantées au site de référence (CAT (P1) :  $69,12 \pm 10,46$  U/mg de protéine, CAT (P2)  $48,9 \pm 19,34$  U/mg de protéine, CAT (S<sub>R</sub>)  $43,31 \pm 12,09$  U/mg de protéine), (Figure 5.9).

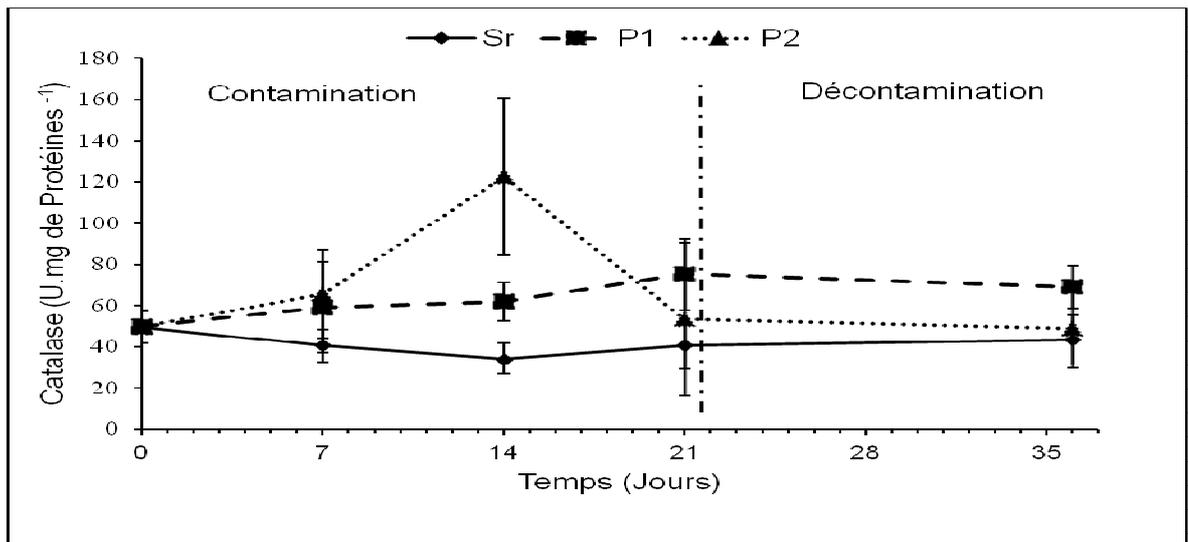


Figure 4.9 : Variation de l'activité CAT durant la période d'étude.

S<sub>R</sub> : Site de référence, P<sub>1</sub> : Port de Bouharoun, P<sub>2</sub> : Port de Khemisti

La comparaison inter-sites des activités moyennes du CAT souligne une variation des activités anti-oxydantes. Les animaux de la station au port de Khemisti présentant une réponse significativement plus forte que ceux des autres sites. Le classement de l'activité CAT moyenne pendant trois semaines d'exposition peut être illustré comme suit : Activité:  $CAT(P2) > CAT(P1) > CAT(S_R)$

Les apports anthropiques et/ou les conditions du milieu ont permis les phénomènes qui interviennent dans la réponse enzymatique catalase [75,80]. Comme première supposition, cet ordre de classement peut être justifié par le degré de la pollution des trois localités étudiées. En effet, l'étude des effets biologiques de polluants sur nos espèces sentinelles (*Perna perna*) était une approche fondamentale nécessaire pour évaluer les effets de perturbations d'origines anthropiques. De plus, la comparaison de l'activité CAT par rapport aux données bibliographiques montre que les réponses obtenues dans cette présente étude sont comparables de celles de Meknachi [10], chez des moules *Mytilus galloprovincialis* dans la baie de Bousmail, de celle de Azdi [20], lors de la transplantation des moules *Perna perna* dans la baie d'Agadir et aussi par Jebali *et al.* [190], où les activités catalase des palourdes *Ruditapes decussatus* étaient supérieures dans les branchies et les glandes digestives en relation avec la présence de polluants. Ainsi, Box *et al.* [191] ont constaté que le degré d'induction de l'activité enzymatique CAT était plus important chez *Mytilus galloprovincialis* transplantée dans les estuaires les plus influencés par les rejets urbains que chez les spécimens transplantés dans des estuaires peu touchés par l'activité anthropogénique, pour qu'ils aient mesuré une moindre induction de l'enzyme antioxydante CAT. Cependant, ils prirent le degré de l'impact anthropique en fonction des activités humaines atteignant les différentes localités étudiées sans mesurer la concentration des polluants.

Ainsi, Tiziana *et al.* [192] ont montré que l'approche de mise en cage des moules et le biomarqueur de stress oxydative d'activité CAT sont fiables et utiles pour l'évaluation des effets de la pollution de l'environnement sur les organismes aquatiques.

Les mollusques, notamment les moules, peuvent accumuler dans leurs tissus de grandes quantités de métaux (Zn, Cu, Cd, Hg,...etc.) bien que la prise de formes

solubles de ces métaux semble être un processus passif [56]. Dans notre étude, il a été dosé la concentration des trois métaux (cuivre, cadmium et plomb) dans la chair des moules afin d'avoir une idée d'une part, sur la concentration bioaccumulée par les spécimens de chaque groupe de test et d'autre part sur le degré de pollution métallique dans les différentes localités de transplantation. Les résultats sont regroupés dans le tableau 4.5.

Comme le montre le tableau 4.5, pour le cuivre, la concentration maximale bioaccumulée par les moules est enregistrée chez les individus transplantés dans le port de Bouharoun. Par ailleurs, la concentration maximale de cadmium bioaccumulée par les moules est enregistrée chez les individus transplantés dans le port de Khemisti suivie par celle mesurée chez les spécimens transplantés dans le port de Bouharoun puis par celle relevée chez organismes transplantés dans le site de référence.

Dans les différentes localités de transplantation les teneurs de plomb dans les chairs des moules sont inférieures à la limite de détermination.

Tableau 4.5 : Concentrations des métaux accumulés par les spécimens transplantés (*Perna perna*). (ESL : Elevage stocks en laboratoire, S<sub>R</sub> : Site de référence, P<sub>1</sub> : Port de Bouharoun, P<sub>2</sub> : Port de Khmisti).

Moules transplantées	ESL	Fin cycle de contamination			Fin cycle de décontamination		
		S <sub>R</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	S <sub>R</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>
[Cu] bioaccumulée (mg.Kg sec <sup>-1</sup> )	18,92 ± 0000	18,55 ± 0,000	21,02 ± 0,000	19,30 ± 0,009	18,73 ± 0,001	19,30 ± 0,000	18,73 ± 0,001
[Cd] bioaccumulée (mg.Kg sec <sup>-1</sup> )	< 3	5,17 ± 0,003	12,36 ± 0,001	19,00 ± 0,001	< 3	< 3	< 3
[Pb] bioaccumulée (mg.Kg sec <sup>-1</sup> )	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20

Dans les moules, l'augmentation des concentrations de métaux aurait pu être interpréter comme une accumulation cumulative dans le temps (cycle de

contamination). Ainsi, les concentrations de cuivre et de cadmium accumulées dans la moule montrent que cet organisme est capable d'accumuler une charge métallique importante en réponse à une contamination du milieu. Ainsi, ces résultats montrent qu'il y a aussi bien des variations inter-sites peuvent être liées à la nature des rejets en mer.

Les niveaux de cadmium enregistré dans les moules transplantées au niveau du port de Bouharoun sont deux fois plus élevés au site de référence. Par ailleurs, sont quatre fois plus élevés par rapport les moules transplantés au port de Khemisti par rapport aux moules transplantés au site de référence. Il apparue que le port de Khemisti est le plus pollué par le cadmium. Ainsi, les résultats montrent que le port de Bouharoun le plus pollué par le cuivre par rapport au port de Khemisti et le site de référence. De plus, les moules utilisées pour la transplantation présentaient eux mêmes des teneurs importantes du cuivre bioaccumulée, résultat probable de la contamination du site d'échantillonnage par le cuivre.

D'une manière générale, l'absence du plomb dans les moules des différentes localités de transplantation peut être liée à la spéciation en milieu marin. Ainsi, dans un milieu fermé sans turbulences, le plomb est rapidement piégé par les matières en suspension et éliminé de la colonne d'eau par décantation du seston [55].

Dans notre étude, une absence de mortalité est observée dans les différentes localités de transplantation, qui suggère que la pollution au niveau de ces localités ne cause pas des événements de toxicité aiguë pour les spécimens *Perna perna*, mais elle déclenche le mécanisme enzymatique (Activité CAT), qui fait preuve l'impact précoce des conditions environnementales sur les animaux exposées *in situ* à différents rejets.

Ainsi, l'augmentation de l'activité CAT (Figure 5.9) résulte en partie d'une perturbation anthropique, engendrée par les rejets aux ports et les concentrations bioaccumulées lors du cycle de contamination sont en fonction d'induction de l'activité CAT. De plus, la stagnation des eaux (faible renouvellement des eaux) à l'intérieur des bassins du port étudié peut conduire à une concentration

importante de la pollution *in situ*. Ces activités (CAT) relevées peuvent être corrélées directement aux degrés de pollution des trois localités étudiés.

Par ailleurs, les moules peuvent éliminer complètement les métaux lorsque la qualité de l'eau s'améliore [55]. Les concentrations de cadmium mesurées à la fin de cycle de décontamination pour les moules transférées au site de référence sont nettement inférieures à celles observées dans les moules au cycle de contamination. De plus, l'expérience de transfert a confirmé la nécessité de raisonner sur la base des contenus métalliques. En termes de charges, les deux populations transférées sont identiques pour le cuivre. Il apparue que la décontamination implique l'existence d'un mécanisme efficace de régulation et que la cinétique de décontamination de cuivre est plus lente que le cadmium pendant la durée de décontamination [15,55].

L'immersion des stations artificielles a été réalisée pendant la période de repos sexuel dans les mois de février et mars dans le but de minimiser les effets de la fluctuation du cycle de reproduction sur le signal de biomarqueur. En effet, les inductions atteintes de l'activité CAT sont donc le résultat direct de l'effet du degré de pollution des sites d'études. Par ailleurs, les résultats trouvés sont comparables avec ceux de Azdi [20] qui a observé une corrélation positive entre le degré de pollution et l'activité CAT par la transplantation des moules *Perna perna* sur tout le littoral Marocain dans les mois février et mars.

L'examen d'une période de transfert (détoxification) pour les deux groupes de tests dans le site de référence a conduit à une diminution de l'induction de l'activité CAT (figure 4.9). Les activités se situèrent finalement à  $48,9 \pm 19,34$  U/mg de protéine, port de Khemisti,  $69,12 \pm 10,46$  U/mg de protéine, port de Bouharoun et  $61,644$  U/mg de protéine, mais toujours supérieures à celles mesurées chez les individus du site de référence ( $43,31 \pm 12,09$  U/mg de protéine). Ainsi, il est facile de mettre en évidence l'existence d'une relation directe entre le niveau de la pollution et le degré de stimulation de l'enzyme antioxydante CAT.

Le transfert des moules *Perna* peut donc être considéré comme une technique intéressante pour évaluer simultanément la qualité générale de l'eau et la biodisponibilité des micropolluants métalliques.

#### 4.3.4. Résultats des mesures biométriques

Les figures 4.10 et 4.11 représentent respectivement les variations de l'indice de condition (IC) et la croissance (longueur en cm) des moules transplantées dans les différentes localités de test en fonction de la période d'étude.

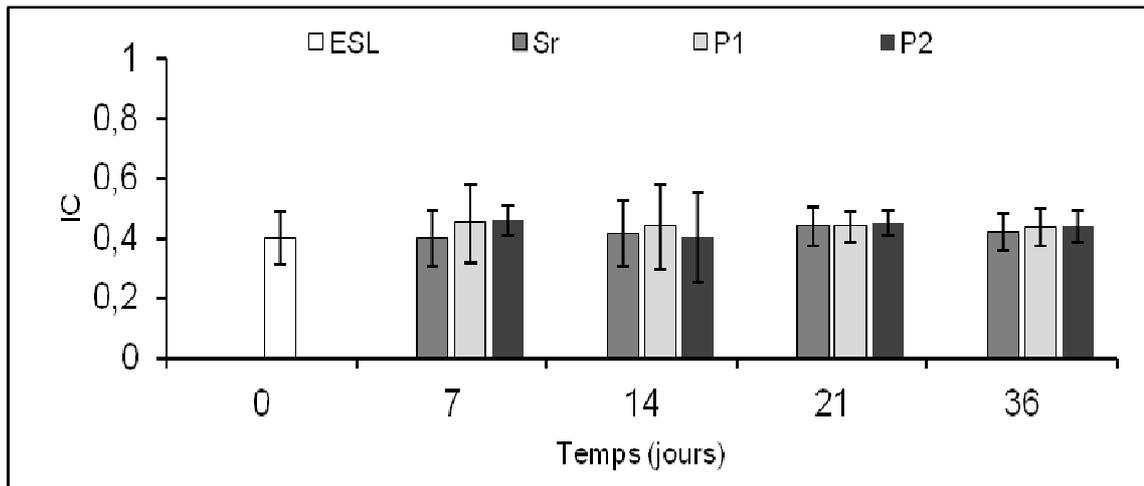


Figure 4.10: Variation de l'indice de condition (IC) dans les différentes localités de tests en fonction du temps.

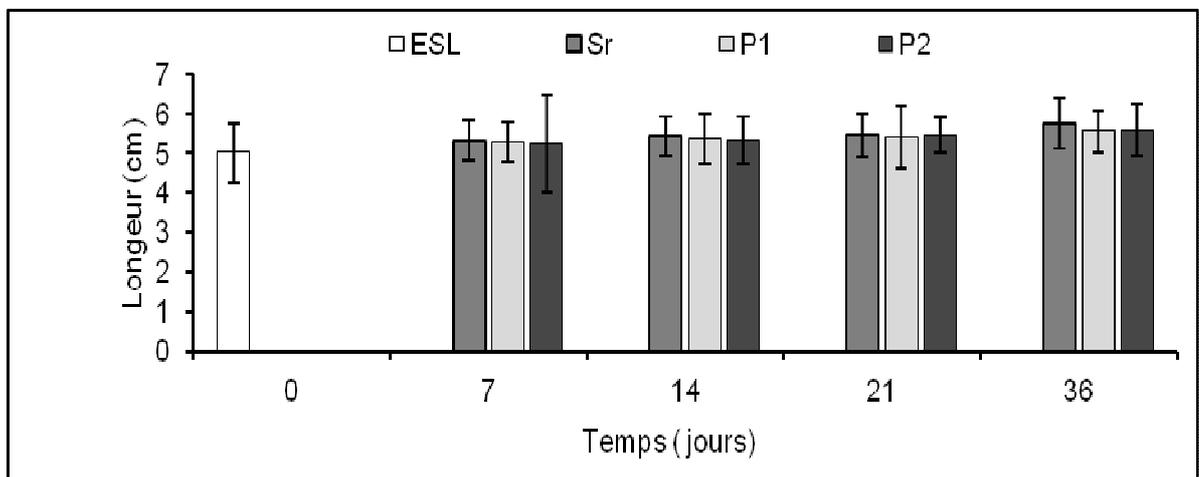


Figure 4.11 : Variation de la croissance des moules durant la période d'étude.

ESL : Elevage stock en laboratoire,  $S_R$ : Site de référence,  $P_1$  : Port de Bouharoun,  $P_2$  : Port de Khmisti.

L'indice de condition, indicateur de l'état physiologique des animaux, 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 [5, 7,44].

Ainsi, la corrélation de l'indice de condition avec la concentration en contaminant permet de déterminer un modèle de correction du signal de la pollution. La variation de poids est due à plusieurs paramètres dont l'état de reproduction et de nutrition, l'utilisation de glycogène et la perte de gamètes pauvres en métaux. Il semble, en effet, que les cycles de reproduction dominent la saisonnalité des teneurs métalliques.

Dans notre étude, les variations de l'indice de condition et la variation de la croissance (longueur en cm) des moules *Perna perna* ont fait appel à une comparaison dans les trois localités caractérisées par des gradients de contamination différents, dans la perspective d'étudier l'effet du degré de pollution sur l'état physiologique de nos spécimens (taux de remplissage de la coquille par les tissus mous et la croissance).

Les valeurs de l'indice de condition (IC) exploité dans la figure 4.10 montrent que le gain en poids n'est pas significativement différent chez les moules transplantées au niveau du site de référence, Bouharoun et Khemisti, ce qui correspond à  $0,41 \pm 0,01$  ;  $0,43 \pm 0,03$  ;  $0,44 \pm 0,05$ , respectivement. S'expliquent probablement par la durée d'immersion qui est insuffisante pour engendrer de différence de l'indice de condition malgré que les animaux des stations P<sub>1</sub> (Port de Bouharoun) et P<sub>2</sub> (Port de Khemisti) sont soumis à un stress occasionné par la pollution par rapport au site de référence (S<sub>R</sub>).

Par ailleurs, la variation de la croissance (longueur en cm) des moules illustrée dans la figure 4.11 montre que la taille des individus ne cesse d'augmenter légèrement pour les trois groupes de tests, avec absence de différence observable en fonction du site qui peut être lié à la durée d'immersion (moules de Ain Tagourait ( $5,40 \pm 0,06$  cm), Moules Bouharoun ( $5,35 \pm 0,06$  cm), Moules Khemisti ( $5,34 \pm 0,09$  cm)).

Taleb *et al.* [107] montrent dans leur travail, l'existence d'une corrélation inversement proportionnelle entre la bioconcentration de ces polluants métalliques

et l'indice de condition, en particulier pour le zinc, cadmium et fer durant les trois mois d'échantillonnage des moules au port d'Oran.

La diminution progressive de l'indice de condition peut avoir deux causes possibles : d'une part, la consommation des réserves métaboliques (glycogène stocké, glucides et protéines) en hiver, et d'autre part un stress physiologique dû à un milieu ambiant défavorable [186]. Selon Yap *et al.* [186], l'énergie stockée est utilisée pour répondre à l'exigence métabolique pour le processus de désintoxication des métaux (la synthèse des métallothionéines, les enzymes antioxydants,...etc.). Donc, la baisse d'énergie stockée est susceptible d'être mesurée comme une valeur inférieure de l'indice de condition. Par conséquent, la valeur inférieure IC de moules récoltées dans des eaux contaminées ont indiqué qu'ils avaient réduit leur quantité de tissus mous. Par ailleurs, Amiard *et al.* [44] ont signalé que la variation de l'indice de condition dans les moules *Mytilus edulis*, étaient liés à la maturation sexuelle chez les moules plutôt que la contamination par le Ni et Va.

Beninger a signalé que l'indice IC des moules recueillies sur le terrain pourraient fournir une évaluation immédiate des réserves à long terme des éléments nutritifs et de l'état énergétique de la moule en cas de pollution en métaux lourds [194].

Les conditions des moules (Figures 4.10-11) ainsi discutées peuvent être liées aux déséquilibres de la balance énergétique, légère différence pour chaque groupe et cela en fonction du degré de pollution.

Des études du métabolisme et de la production de biomasse chez les organismes exposés aux toxiques ont mis en évidence que ces mécanismes de défense sont coûteux pour l'organisme en terme énergétique. Ces coûts de défense s'ajoutent aux coûts de maintenance : il existe donc une corrélation quantitative entre la capacité de défense de l'organisme (survie) et sa capacité de production de biomasse (croissance et reproduction).

Par ailleurs, l'allocation énergétique pour la défense, la réparation et la régénération des cellules est privilégié à la croissance et à la reproduction [195]. De ce fait, une légère augmentation a été observée de longueur des moules

transplantés au site de référence par rapport des moules transplanté aux ports de Khemisti et Bouharoun.

Ainsi, les individus récupérés des stations de Khemisti et Bouharoune ont montré un statut énergétique de défense (traduit par le degré d'induction CAT) plus important, ce qui permet une réduction de l'investissement énergétique pour la croissance des spécimens. Selon Amiard *et al.* [44], les biomarqueurs de défense permettent aux organismes de lutter et de survivre en présence de polluants à des niveaux raisonnables mais ceci à un coût énergétique pour l'individu.

En conclusion, les résultats de notre étude valident l'utilisation *in situ* du suivi de l'activité CAT chez les moules dans les écosystèmes marins perturbés anthropologiquement. Dans la Baie de Bousmail ou ailleurs, on pourrait utiliser des moules *Perna perna* dans les programmes de biosurveillance en raison de leur activité CAT plus sensible, et de leur abondance au niveau des côtes. De plus, sa répartition au niveau des roches côtiers dans la zone de balancement des marées fait que cet animal représente la première ligne de contact avec les apports terrigènes et constitue par conséquent un système de détection précoce de contamination du milieu.

## CONCLUSION

Les objectifs de notre étude se situent dans un cadre écotoxicologique d'une part et de la biosurveillance d'autre part. La surveillance de la qualité des écosystèmes repose en grande partie sur l'évaluation de l'impact écotoxicologique des polluants grâce à des méthodes simples et fiables, spécifiquement adaptées à l'étude des effets des xénobiotiques sur les organismes vivants. Dans ce contexte, les biomarqueurs apparaissent comme des outils modernes permettant d'évaluer les effets d'expositions à un ou des xénobiotiques sur les populations dans leurs habitats. Ainsi, l'emploi des mollusques bivalves, dans le cadre de réseaux de surveillance ou d'études particulières, montre l'intérêt porté à ces organismes indicateurs de la contamination métallique dans les eaux marines.

Sur le plan expérimental, les résultats des tests en conditions stables à l'échelle du laboratoire se récapitulent dans les points suivants :

- L'accumulation de ces trois métaux par la moules *Perna perna* est fonction de la concentration ajoutée dans le milieu.
- Le cuivre est particulièrement toxique pour *P. perna* (en se basant sur la mortalité).
- La perturbation d'excrétion des individus exposés aux métaux se traduit par l'augmentation de production de l'azote ammoniacal et du phosphore, nitrates et nitrites est le résultat direct de la présence du polluant métallique dans le milieu, donc la mesure des excréations azotées et phosphorées s'est avérée une approche très intéressante traduisent l'état physiologique des moules.
- Une perturbation des teneurs en protéines de la chair totale traduit la perturbation des réserves protéiques des moules produites durant le cycle de contamination. Cependant, la compréhension de l'influence des métaux sur les réserves énergétique nécessite que ces résultats soient complétés par davantage paramètres, notamment la mesure des teneurs du glucose et des lipides.

- Une corrélation positive entre l'activité enzymatique catalase et le gradient de concentration des métaux dans le milieu. Ces réponses enzymatiques obtenues dans l'ensemble des expérimentations permettent de qualifier la catalase comme biomarqueur de défense très pertinent, sensible et rapide. Cette qualification est justifiée par l'induction rapide de l'enzyme (exposition pendant trois jours) même par de faibles concentrations du polluant.
- Le test de contamination/décontamination a montré l'efficacité du biomarqueur dans l'évaluation de la qualité du milieu par le retour des activités enzymatiques à un niveau presque similaire relevé chez les organismes maintenus dans un milieu exempt de polluant, qui traduit la curabilité et la réversibilité de l'état de santé des organismes ainsi que la sensibilité du bio-marqueur à la présence de contaminants.

A l'issue de la deuxième partie de notre travail, les résultats obtenus après transplantation au niveau des ports de pêche de Khemisti et Bouharoun et le site de référence d'Ain Tagourait montrent bien que les activités enzymatiques observés chez la moule *Perna perna*, 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 (sensibilité envers de nombreux polluants), est stimulé de façon assez claire et rapide par le degré de pollution des ports étudiés.

À la lumière de l'ensemble des résultats trouvés, quelques approches à développer en perspective se dégagent :

- Cette étude doit être complétée par le suivi d'autres biomarqueurs du stress oxydant (taux de peroxydation lipidique estimé par le malondialdéhyde, activité superoxyde dismutase, glutathion peroxydase,...etc.).
- Il serait aussi important de compléter ce travail par l'étude de la variation de l'activité CAT chez les bivalves en fonction de leur maturité sexuelle, l'état physiologique étant un facteur important dans la variation des biomarqueurs.
- Recherche des corrélations entre les propriétés physicochimiques de l'eau d'élevage (pH, salinité, photopériode, oxygène dissous, nutriments,

phosphates, ammonium) et les réponses possibles de la moule. La composition du milieu à tester en contaminants (métaux, substances humiques, pesticides, ...etc.) peut faire l'objet de corrélations entre quelques réponses biochimiques des moules.

- La contamination à l'échelle du laboratoire par d'autres métaux présents dans les effluents industriels comme le Zinc, Mercure,...etc.
- Etudier la réponse des différents biomarqueurs à court terme. En effet, les expériences rapportées dans ce mémoire ont montré que la catalase réagisse dès le troisième jour d'exposition ou septième jour de transplantation. Devant ce résultat, il nous semble intéressant de préciser l'instant exact (au bout de quelques heures ou plus) de la réponse pour chaque biomarqueur afin de déterminer quel est le plus réactif chez *P. perna*.

## APPENDICE 1

### LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AFNOR	: Association française de normalisation
ADH	: Arginine dihydrolase
ATP	: Adénosine triphosphate
BDN	: Banque de données nationale
BR	: Branchies
BCPL	: Bromocrésol lactose pourpre
BIOMAR	: Biochemical markers of environmental contamination
CNRDPA	: Centre national de recherche et développement de la pêche et : aquaculture
CRAPC	: Centre de recherche scientifique et technique en analyses : physicochimiques
CAT	: Catalase
CT	: Coliformes totaux
CF	: Coliformes fécaux
CRM	: Matériaux de référence certifiée
Cont	: Contamination
Décont	: Décontamination
EDTA	: Acide éthylène diamine tétraacétique
EC	: <i>Escherichia coli</i>
EAM	: Elevage Aquacole Méditerranéen
ERO	: Espèces Réactives de L'oxygène
ESL	: Elevage stock au laboratoire
GESAMP	: Group of experts on the scientific aspects of marine environmental protection
GPX	: Glutathion peroxydase
GSH	: Glutathion réduit
GSSG	: Glutathion oxydé
GST	: Glutathion S-transférase
GD	: Glande digestive
HAP	: Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCT	: Hydrocarbure totaux
HTDS	: Hindi technologies dramatique society
IFREMER	: Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
IC	: Indice de condition
JICA	: Agence japonaise de coopération internationale
KDa	: Kilo Dalton
LDC	: lysine décarboxylase
LPO	: peroxydation lipidique ou lipoperoxydation

MATE	: Ministère de l'aménagement de territoire et de l'environnement
ME	: Mentaux
MEDPOL	: Programme de surveillance pour la méditerranée
MTs	: Métallothionéines
PAS	: Plan d'actions stratégiques
PCB	: Polychlorobiphényles
PVC	: Polychlorure de vinyle
Psu	: Practical salinity unit
NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
N.P.P	: Nombre le Plus Probable
ONEDD	: Observatoire national de l'environnement et du développement durable
ODC	: Ornithine décarboxylase
OMS	: Organisation mondiale de la santé
Pu :	: Pureté
Ppm	: Partie par mille
PCBs	: Polychlorobiphenyls
PASMED	: Plan d'actions stratégiques pour la Méditerranée
pH	: Potentiel de l'hydrogène
Prot	: Protéines
PTSAP	: Poids des tissus mous avec l'eau palléale
RINBIO	: Réseau intégrateur biologique - Ifremer France
RNO	: Réseau national d'observation – Ifremer France
ROS	: Reactive Oxygen Species
SH	: SulfHydrile ou groupement thiol
SOD	: Superoxyde dismutase
Sal	: Salinité
SFB	: Bouillon sélénite cystine
Sp	: Site de prélèvement
S <sub>R</sub>	: Site de référence
S1	: Port de pêche de Bouharoun
S2	: Port de pêche de Khemisti
T	: Température
TSE	: Tryptone, sel, eau
UV	: Ultra - Violet
U	: Unité
VBL	: Bouillon lactosé au vert brillant
V/V	: Rapport volumique
P/V	: Rapport poids/volume
$\Delta T$	: Variation moyenne, de température
$\Delta S$	: Variation moyenne, de salinité
$\Delta pH$	: Variation moyenne, de pH
$\Delta O_{diss}$	: Variation moyen d'oxygène dissout
$\sigma$	: Conductivité

**APPENDICE B**  
**DISPOSITIF EXPERIMENTAL**



Figure AB.1: Elevages stock des individus *Perna perna* et dispositif expérimentale.



Figure AB.2: Mise en cage des moules (transplantation des moules en mer)

## APPENDICE C

### MODES OPERATOIRES, REACTIFS ET SOLUTIONS CHIMIQUES

#### AC. Modes opératoires

##### AC.1. L'azote ammoniacal

Dans chaque prise d'essai de 100 ml, on introduit 3 mL du réactif N°4 (Tableau AC), solution de phénol-nitroprussiate. Juste après homogénéisation, 3 mL du réactif (N°5) solution alcaline d'hypochlorite sont ajoutés au mélange. L'échantillon final homogénéisé est placé à l'obscurité pendant une nuit à température ambiante. Les mesures sont alors effectuées au spectrophotomètre. Des mesures sur une eau filtrée ou décantée (essais témoins) sont effectuées parallèlement.

Dans le blanc l'eau distillée remplace les 100 mL de la prise d'essai. Les teneurs en azote ammoniacal sont déduites à partir de la courbe d'étalonnage et exprimées en  $\text{mg N-NH}_{3,4} \cdot \text{L}^{-1}$  par individu.

##### AC.2. Dosage de l'azote nitreux

Dans chaque prise d'essai de 50 mL, on introduit 1 mL du réactif (N°6), solution de sulfanilamide. Après homogénéisation, on laisse reposer 2 à 8 minutes et on ajoute 1 mL de réactif (N°7) solution de n-naphtyl-éthylènediamine au mélange.

Les mesures sont alors effectuées au spectrophotomètre après au moins 10 minutes (sans dépasser les 2 h) de repos. Des mesures sur eau filtrée ou décantée (essais témoins) sont effectuées parallèlement. Dans le blanc l'eau distillée remplace les 50 mL de la prise d'essai.

Les teneurs en azote nitreux sont déduites à partir de courbe d'étalonnage et exprimées en  $\text{mg N-NO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  par individu.

##### AC.3. Dosage de l'azote nitrique

Dans chaque prise d'essai de 100 mL, on introduit 2 mL de la solution concentrée de chlorure d'ammonium, le tout est versé dans une colonne réductrice en cadmium traité par le cuivre. Les premiers volumes sont rejetés et le reste est récupéré afin de le traiter de la même façon que le cas des nitrites.

Les teneurs en azote nitrique sont déduites à partir de la courbe d'étalonnage et exprimées en  $\text{mg N-NO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$  par individu.

#### AC.4. L'excrétion phosphorée

Dans chaque prise d'essai de 100 mL, on introduit 10 mL du mélange-réactif phosphore (N°8), préparé à chaque série d'analyses, et on homogénéise aussitôt. Les mesures sont alors effectuées au spectrophotomètre après 5 minutes de repos. Des mesures sur eau filtrée ou décantée (essais témoins) sont effectuées parallèlement.

Les teneurs en phosphore sont déduites à partir de la courbe d'étalonnage et exprimées en mg phosphore<sup>-1</sup> par individu.

#### AC.5. Métaux lourds

Après dé-coquillage, les tissus ont été séchés à l'étuve à 70 °C pendant 48 h jusqu'à obtention d'un poids constant [4]. Les tissus secs ont ensuite été broyés après le séchage à l'aide d'un mortier en céramique à la main afin d'obtenir une fine poudre sèche et homogène. Les échantillons sont conservés dans des tubes en polyéthylène (préalablement lavés et séchés) étiquetés jusqu'à leurs analyses. Environ 1 g de chair en poudre sèche est pesé dans une capsule en aluminium préalablement tarée puis introduite dans le ballon. Avec une pipette, 28 mL de l'eau régale (mélange de deux acides : l'acide chlorhydrique (p36%, Organica) et l'acide nitrique (p60%, Cheminova) dans des proportions 1 : 3 (v/v)), est rajoutée au contenu du ballon, on ferme les ballons, et on laisse au repos pendant une nuit (digestion à froid). Ce dernier est placé dans le montage (Figure A.C), la température du chauffage (plaque chauffante) est réglée à 95 °C et la circulation de l'eau froide est vérifiée, ainsi, la digestion humide par chauffage à reflux peut commencer.

Au bout de 2 heures, la digestion est atteinte, le chauffage est alors arrêté. Une fois refroidi, le contenu du ballon (liquide obtenue) est transféré par filtration sur le papier filtre standard (FIORONI 100 mm) dans une fiole de 100 mL est complétée avec de l'eau déminéralisée, afin d'obtenir une solution de minéralisation acidifiée puis transvaser dans un flacon et conserver au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à l'analyse.

Parallèlement aux échantillons, des blancs d'analyses constitués de solutions contenues les réactifs de minéralisation, ont été réalisés suivant le même

protocole pour contrôler le bruit de fond de la contamination (métaux contenus dans les acides et/ou sur les parois de la verrerie, contamination par les poussières,...etc.). La qualité des attaques a été contrôlée (justesse et la précision de protocole analytique) par analyse de standards internationaux dont les concentrations sont certifiées, fourni par l'Agence Japonaise de Coopération Internationale (J.I.C.A). Nous avons utilisé comme standards : tissus de poisson Morue (ou cabillaud) (CRM 74026-a, avec de concentration certifiée en : Cu :  $1,25 \pm 0,07 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de poids sec) [105, 106,107].

La teneur en élément métallique est mesurée par S.A.A dans le minéralisât d'échantillons et/ou de standards certifiés, de même que dans les blancs. La concentration des minéralisât est ensuite corrigée de la teneur des blancs, puis divisée par le facteur de dilution P/V, selon la formule suivante:

$$\text{Concentration ( mg.Kg}^{-1} \text{ )} = \frac{(C - C_B) * V}{P}$$

Sachant que : P : le poids d'échantillon de départ (prise d'essai en mg). V : le volume final du minéralisât (en mL). C : la concentration en élément mesurée dans le minéralisât (en  $\text{mg.L}^{-1}$ ).  $C_B$  : la concentration en élément mesurée dans le blanc ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).

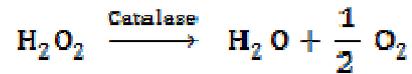
#### AC.6. Protéines

Dans des tubes à essais, les prises d'échantillons de la fraction  $S_9$  (surnageant) sont diluées au 1/5-1/8-1/10 et complétées à 1 mL. Le tube de blanc contient 1 mL d'eau distillée. 5 mL de réactif Lowry (N°11) sont ajoutés à chaque tube. Une homogénéisation et 10 min de repos sont nécessaires. 0,5 mL 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 30 min. Ainsi la lecture de l'absorbance est faite à 660 nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir de la solution de sérum albumine bovine (SAB) étalon mère à 7,6 G%. Les étalons filles sont ainsi obtenus par dilution de la solution mère.

#### AC.7. L'activité de la CAT

L'activité de la CAT est déterminée par la méthode adaptée de celle de Lartillot décrite par Gülüzar *et al.* [104]. Cette méthode est basée sur la disparition du

peroxyde d'hydrogène du fait de l'activité de la catalase selon la réaction suivante :



Dans une cuvette du spectrophotomètre déjà réglée sur le mode cinétique à 25 ° C (pas de Cuve de référence) : On place dans l'ordre 2,5 mL du substrat (2,4 mL tampon phosphate 75 mM à pH 7 ; 100 µL solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%), et 50 µL de la fraction S<sub>9</sub> (source d'enzyme). Dès lors, on déclenche le spectrophotomètre.

La cinétique de la chute d'absorbance liée à la disparition du peroxyde d'hydrogène substrat de l'enzyme, est suivie durant 120 s par un spectrophotomètre (UV-Vis de type Jenway 6405). L'activité CAT est calculée selon la formule suivante:

- ΔDO/min : variation de densité optique/ minute,
- ε coefficient d'extinction molaire du peroxyde d'hydrogène à 280 nm en.m<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.L
- [Prot] concentration en protéines dans le milieu réactionnel en mg.mL<sup>-1</sup>

$$\text{Activité CAT} = \frac{(\Delta\text{DO}/\text{min}) * 1000}{[\text{Prot}] * \epsilon}$$

Les résultats sont exprimés en µmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consommées par minute / mg de protéines, ce qui correspond à unité (U) de catalase /mg de protéines.

Tableau AC : Réactifs et solutions chimique utilisés.

Numéro	Réactifs	Caractéristiques/Composition
01	chlorure de cuivre hydraté ( $\text{CuCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ )	Pu= 97%, S= 757 $\text{g.L}^{-1}$ à 25 °C
02	Nitrate de plomb ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ )	Pu=99.5%, S=35.2 $\text{g.L}^{-1}$ à 25 °C
03	sulfate de cadmium hydraté ( $\text{CdSO}_4, 8/3\text{H}_2\text{O}$ )	Pu=98%, S=760 $\text{g.L}^{-1}$ à 25 °C
04	Solution de phénol-Nitroprussiate de sodium	eau distillée, 35g de Phénol, 400mg de Nitroprussiate de sodium pour 1litre
05	Solution alcaline d'hypochlorite	280g de citrate trisodique, 22 g de soude, solution d'hypochlorite de sodium correspondant à 1,4g de chlore soit 44 mL d'une solution à 10 ° de chlore
06	Solution de Sulfanilamide	eau distillée, 5 g de Sulfanilamide, 50ml d'acide chlorhydrique d=1,18 pour 500 mL
07	Solution de N-Naphthyléthylène-diamine	eau distillée, 0,5 g dichlorohydrate de N-Naphthyléthylène-diamine
08	Mélange-Réactif	100 mL de solution de molybdate d'ammonium, 250 mL d'acide sulfurique 2,5 $\text{mol.L}^{-1}$ , 100 mL de solution d'acide ascorbique, 50 mL de solution d'oxotartrate de potassium et d'antimoine.
09	Réactif de Lowry A :	1 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$ + 50 mL NaOH (0,1N)
10	Réactif de Lowry B :	5 g $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ + 10 g Tartrate de Na et K, le tout dans un litre
11	Réactif de Lowry :	Mélanger le jour de la manipulation : 50 mL Lowry A + 1 mL Lowry B

## APPENDICE D

### COURBES D'ETALONNAGE

Trois gammes d'étalonnage ont été réalisées à partir des solutions étalons mère certifiés (Perkin Elmer) fourni par HTDS, de concentrations connues. Les courbes d'étalonnages sont représentées par la fonction  $DO = f(C)$  (DO : densité optique, C : concentration de l'élément à doser sont données dans la figure A.E.

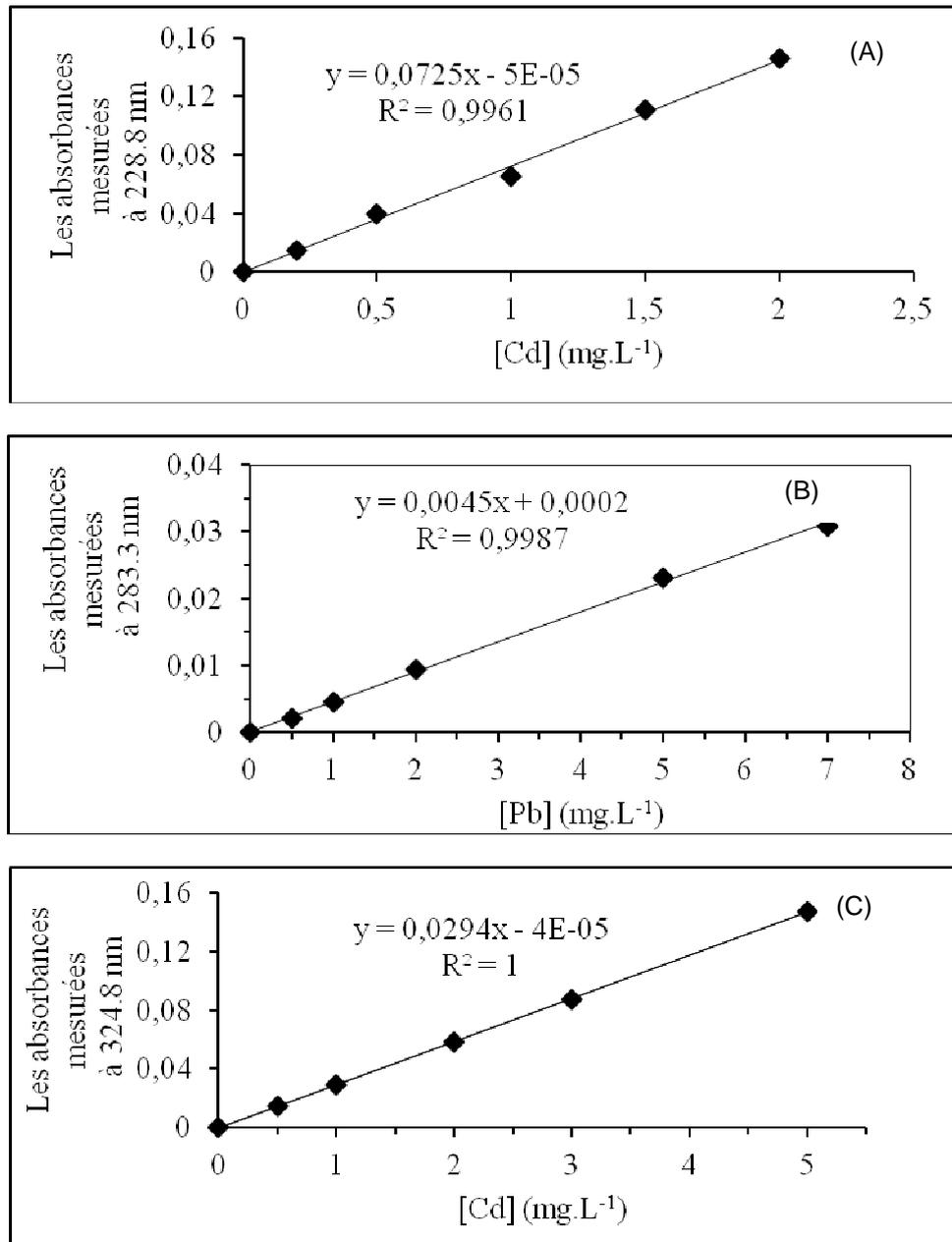


Figure A.E: Courbes d'étalonnages d'analyse du cuivre (A), plomb (B) et cadmium (C).

## APPENDICE E : Description des sites étudiés

Le port de pêche de Bouharoun (Figure AE(B)), est situé à 20 Km du chef lieu de la wilaya de Tipaza, avec une longitude Est  $02^{\circ}.39.50$  et une latitude nord  $36^{\circ}.37'$ . Ce port dispose de 2 bassins d'une superficie de  $29830 \text{ m}^2$  et une superficie des terres plaines estimée à  $50715 \text{ m}^2$  avec 14 quais d'une profondeur 2,5 à 6 m. La flottille du port de pêche est composée actuellement de 169 différents types d'embarcation (30 chalutiers, 30 sardiniers, 28 plaisanciers et 40 petits métiers). Les superstructures existantes 1 bâtiment administratif, 63 cases pêcheurs, 01 halle de vente, 1 chambre de froide, 01 parking, 01 unité de fabrication de glaces [108,109].

Le port de pêche de Khemisti (Figure. AE (A)), est situé à 24 Km du chef lieu de la wilaya de Tipaza, avec une longitude Est  $02^{\circ}.42'$  et une latitude nord  $36^{\circ}.38'$ . Ce port dispose une superficie de  $13000 \text{ m}^2$  et une superficie des terres plaines estimée à  $15722 \text{ m}^2$  avec 4 quais d'une profondeur 3 m. La flottille du port de pêche est composée actuellement de 57 différents types d'embarcation (32 sardiniers et 25 petits métiers). Les superstructures existantes 01 chantier naval, 01 atelier de réparation et maintenance [108,109].

La Ferme aquacole (Figure. A.E(C)), qui se situe à l'est de la localité côtière d'Ain Tagourait (Bérard), près de 15 kilomètres à l'est de la wilaya de Tipaza. Les moules sont élevées au large (Installation des filières en mer) à environ 1 Km de la côte (plage suisse d'Ain Tagourait).



Figure A.E : Photos représente les trois zones d'étude (A : port de pêche de Khemisti, B : port de pêche de Bouharoun, C : plage suisse d'Ain Tagourait).

## APPENDICE F

### METHODE D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

#### A.F.1 Analyses microbiologiques

##### A.F.1.1 Analyse de l'eau de mer

###### A.F.1.1.1 Préparation de l'échantillon et des dilutions

- Homogénéiser l'échantillon pour l'essai soit par aspiration et refoulement successif, avec la pipette, ou par agitation vigoureuse du flacon bouché ;
- Préparer les dilutions à partir de l'échantillon homogénéisé au 1/10<sup>ème</sup> , 1/100<sup>ème</sup> en utilisant des tubes contenant 9 mL du Tryptone Sel Eau (TSE).

###### A.F.1.1.2 Recherche et dénombrement des coliformes en milieu liquide sur BCPL [110]

La technique en milieu liquide fait appel à deux tests consécutifs :

- Test de présomption, réservé à la recherche des coliformes totaux ;
- Test de confirmation ou test de Mac Kenzie, ce test est basé sur la recherche des coliformes fécaux ou thermotolérants parmi lequel, on redoute surtout la présence de *Escherichia coli* à partir des tubes positifs du test de présomption.

###### A.F.1.1.2.1. Test de présomption

- A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :
  - 50 mL dans un flacon contenant 50 mL du milieu Bromocrésol lactose pourpre (BCPL) double concentration (D/C) muni d'une cloche de Durham.
  - 5 fois 10 mL dans 5 tubes contenant 10 mL du milieu BCPL D/C muni d'une cloche de Durham.
  - 5 fois 1 mL dans 5 tubes contenant 10 mL du milieu BCPL S/C muni d'une cloche de Durham.
- À partir de chaque dilution porter aseptiquement 5 fois 1 mL dans 5 tubes contenant 10 mL du milieu BCPL S/C muni d'une cloche de Durham.
- Chasser le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum.
  - Incubation : L'incubation se fait à l'étuve à 37 °C pendant 48 heures
  - Lecteur : Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :

- Un dégagement gazeux (1/10 du volume de la cloche au moins)
- Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu)

#### A. F.1.1.2.2. Test de confirmation

- Les tube BCPL trouvés positifs lors du test de présomption feront l'objet d'un repiquage de 2 a 3 gouttes dans des tubes contenant le milieu indol manitol (Schubert) muni d'une cloche de Durham.
- Chasser le gaz présent éventuellement dans les cloches et mélanger le milieu et l'inoculum.
  - Incubation : Elle se fait à 44 °C pendant 24 heures
  - Lecture : Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :
    - Un dégagement gazeux (1/10<sup>ème</sup> du volume de la cloche au moins).
    - Un trouble microbien.

La présence d'*Echirichia coli* est mise en évidence après l'adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de kovacs, par la formation d'un anneau rouge en surface, témoins de la production d'indole par *E.coli* à 44 °C.

#### A.F.1.1.2.3. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés par le nombre le plus probable de coliformes totaux, fécaux et d'*Echerichia coli* par 100 mL de l'eau de mer (d'après la table de Mac Grady).

#### A.F.1.1.3 Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux

Tout comme la méthode de recherche des coliformes en milieu liquide, celle de la recherche et dénombrement des streptocoques fécaux fait appel à deux tests consécutifs a savoir, un test de présomption où l'ensemencement se fait dans un milieu contenant une certaine quantité d'acide de sodium et un test de confirmation où les tubes positifs seront repiqués sur un milieu nettement plus inhibiteur (plus forte concentration en acide de sodium et d'éthyle violet) ne laisse se développer que les streptocoques fécaux [110].

#### A.F.1.1.3.1. Test de présomption

- A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :
  - 50 mL dans un flacon contenant 50 mL du milieu Roth D/C.
  - 5 fois 10 mL dans 5 tubes contenant 10 mL du milieu Roth D/C.
  - 5 fois 1 mL dans 5 tubes contenant 10 mL du milieu Roth S/C.
  - Incubation : L'incubation se fait à l'étuve à 37 °C pendant 48 heures
  - Lecteur : Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :
    - Un trouble microbien.
    - Une pastille blanchâtre au fond de tube.

Ces tubes ne doivent en aucun cas faire l'objet de dénombrement. Ils doivent par contre faire l'objet d'un repiquage sur milieu EVA LITSKY pour confirmer la présence des streptocoques fécaux.

#### A.F.1.1.3.2. Test de confirmation

Chaque tube de Roth trouvé positif lors du test de présomption fera l'objet d'un repiquage de 2 à 3 gouttes à l'aide d'une pipette pasteur dans un tube contenant le milieu EVA LITSKY. Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

- Incubation : Elle se fait à 37 °C pendant 24 à 48 heures
- Lecture : Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :
  - Un trouble microbien.
  - Une pastille blanchâtre ou violette au fond des tubes

#### A.F.1.1.3.3. Expression des résultats

Les résultats du dénombrement des streptocoques fécaux sont exprimés en nombre de germes dans 100 mL d'eau.

#### A.F.1.1.4 Recherche et dénombrement des Salmonelle :

La recherche des salmonelles est réalisée suivant la norme Afnor 2003 [110]. se fait par la méthode qualitative réalisée en trois étapes successives : le pré enrichissement, l'isolement, et l'identification biochimique.

- Pré-enrichissement : incuber à 37 °C pendant 24 heures, 25 mL de l'eau à analyser.

- Enrichissement primaire : Prélever 10 mL et 1 mL de la culture du pré-enrichissement dans deux tubes contenant 10 mL du milieu SFB D/C et SFB S/C successivement avec l'addition d'un disque de l'additif SFB, et on incube à 37 °C pendant 24 heures.
- Isolement et enrichissement secondaires :
  - Le bouillant sélénite cystéine (SFB D/C) fera l'objet d'un enrichissement secondaires sur un bouillon SFB S/C en tube de 10 mL avec l'addition d'un disque de l'additif SFB, incubé à 37°C pendant 24 heures,.
  - D'autre par le bouillant sélénite cystéine (SFB S/C) subira à un premier isolement sur gélose Hektoen (H1) à l'aide d'une pipette pasteur. On incube à 37°C pendant 24 heures.
- Lecteur et identification :
  - Le bouillon sélénite cystéines D/C fera l'objet d'un isolement sur gélose Hektoen (H2).
  - A partir de la boîte (H1), on prélève les colonies caractéristiques de salmonella qui sont de couleur bleue ou verte avec ou sans centre noire, qui vont subir une identification morphologique (coloration de Gram), et biochimique par ensemencement sur galerie classique constituée des milieux : Kligler (TSI) ; Manitol Mobilité, Gélose nutritive (GN), Citrate de Simmons, Urée indole, plus les acides aminés : ODC,LDC,ADH, ou sur une galerie Api 20E avec incubation à 37 °C pendant 24 heures.

## A.F.1.2 Analyse des moules

### F.1.2.1 Préparation de l'échantillon :

La méthode appliquée est celle décrite par Afnor 1988 [111] :

- Prendre des moules encore vivantes et non endommagées, et les faire débarrasser de byssus et épizoaires présent sur leur coquilles ;
- Laver et brosser soigneusement l'extérieur des coquilles sous eau courantes potable de façon à éliminer les souillures externes, les égoutter,
- Désinfecter superficiellement par un jet d'alcool et flambage rapide,

- Ouvrir les coquilles à l'aide d'un couteau spécial stérile ou d'un scalpel stérile.
- Recueillir le liquide intervallaire et la chair dans une nacelle stérile (Préalablement tarée),
- Peser 100 g de chair et de liquide inter-valvaire, puis ajouter 300 mL de TSE,
- Broyer au broyeur homogénéisateur pendant 60 secondes pour obtenir la suspension mère au 1/3.

#### A.F.1.2.2. Préparation des dilutions :

A partir de la suspension mère au 1/3<sup>ème</sup>, préparer deux dilutions : 1/30<sup>ème</sup> dans l'eau physiologique en changeant de pipette entre chaque dilution.

#### A.F.1.2.3. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux

Elles sont réalisées selon la norme Afnor V45-110 Juin 1988 [110]. La méthode appliquée est la méthode du nombre le plus probable par lecteur sur la table de Mac Grady, en réalisant deux tests consécutifs.

#### Test de présomption :

- Prendre 3 séries de 3 tubes contenant 10 mL de bouillon lactosé bilié au vert brillant (VBL) S/C avec cloch.
- Porter successivement dans chacun des trois tubes de la première série 1 mL de la suspension mère au 1/3.
- Puis dans chacun des trois tubes de la deuxième série 1 mL de la dilution au 1/30<sup>ème</sup>.
- dans chacun des trois tubes de troisième série 1 mL de la dilution au 1/300<sup>ème</sup>
  - Incubation : Incuber à 37 °C pendant 48 heures
  - Lecteur : Sont considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :
    - Un dégagement gazeux au moins égale au 1/10<sup>ème</sup> du volume de la cloche de Durham, et un virage de la couleur. Ces tubes feront l'objet d'un repiquage sur milieu Schubert.

#### A.F.1.1.2.2. Test de confirmation :

A l'aide d'une pipette pasteur prendre 2 à 3 gouttes des tubes considérés comme positifs et repiquer dans des tubes contenant le milieu Schubert muni d'une cloche de Durham.

- Incubation : L'incubation des tubes se fait à 44 °C pendant 24 heures
- Lecture : Les tubes présents à la fois un dégagement de gaz et un trouble microbien sont considérés comme positifs. Ces tubes contenant *E.Coli* lorsqu'il y a formation d'un anneau rouge à la surface après adjonction de quelques gouttes du réactif de Kovacs, indiquant la formation de l'indole à partir de tryptophane 44 °C.

#### A.F.1.1.2.3. Expression des résultats

Pour chaque série de tube on a un nombre de tube positifs, ce qui forme un nombre caractéristique qui correspond dans la table de Mac Gradyau nombre le plus probable (N.P.P) de coliformes fécaux et d'*E.coli* dans 100 g de chair et de liquide intervallaire.

#### A.F.1.2.4. Recherche des salmonelles

La recherche des salmonelles est réalisée suivant la norme Afnor V08-052, 1997 [112]. Elle consiste à faire un pré-enrichissement dans un milieu non sélectif, avant de procéder à l'enrichissement et à l'isolement. Elle a été réalisée sur 25 g de chair et de liquide intervallaire en 4 phases successives :

- Pré-enrichissement : Faire diluer 75 mL de suspension mère au 1/3 dans 150 mL du TSE, puis incuber à 37 °C pendant 24 heures.
- Enrichissement primaire : Prélever 10 mL de la culture du pré-enrichissement dans un tube contenant 10 ml du milieu SFB D/C et on incube à 37 °C pendant 24 heures.
- Isolement et enrichissement secondaires : Le bouillon sélénite cystéine (SFB) fera l'objet :
  - D'une part d'un enrichissement secondaires sur un bouillon SFB S/C en tube de 10 mL avec l'addition d'un disque de l'additif SFB.
  - D'autre part, un premier isolement sur gélose Hektoen (H1) à l'aide d'une pipette pasteur. On incube à 37°C pendant 24 heures.

– Lecteur et identification :

- Le bouillon sélénite cystéine fera l'objet d'un isolement sur gélose Hektoen (H2).
- A partir de la boîte (H1), on prélève les colonies caractéristiques de salmonella qui sont de couleur bleue ou verte avec ou sans centre noire, qui vont subir une identification morphologique (coloration de Gram), et biochimique par ensemencement sur galerie classique constituée des milieux : Kligler (TSI) ; Manitol Mobilité, Gélose nutritive (GN), Citrate de Simmons, Urée indole, plus les acides aminés : ODC,LDC,ADH, ou sur une galerie Api 20E avec incubation à 37 °C pendant 24 heures.



Tableau A.G.5: Cas de cadmium (essai (Octobre))

Temps (h)	[Cd <sup>2+</sup> ] (mg.L <sup>-1</sup> )												
	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	6,0	8,0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	53,33
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	53,33

A.G.2. Résultats des paramètres physico-chimiques de l'eau de mer relevés au cours des tests de toxicité aiguë (valeurs moyennes±écart type)

Tableau A.G.6 : cas de cadmium

	[Cd <sup>2+</sup> ]						
	T (°C)	S (Psu)	pH	P-PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )
EM	18,15 ±1,32	36,59 ±0,14	7,15 ±0,48	0,08 ±0,43	0,047 ±0,025	0,05 ±0,07	0,020 ±0,020
Témoin	17,34 ±0,41	36,60 ±0,37	7,12 ±0,86	0,11 ±0,06	0,12 ±0,083	0,018 ±0,028	0,017 ±0,017
E <sub>1</sub>	18,62 ±0,64	36,65 ±0,13	6,62 ±0,22	0,14 ±0,01	0,18 ±0,01	0,175 ±0,031	0,021 ±0,002
E <sub>2</sub>	16,86 ±0,64	36,58 ±0,31	7,68 ±0,39	0,20 ±0,01	0,30 ±0,17	0,087 ±0,016	0,027 ±0,004
E <sub>3</sub>	19,32 ±0,33	36,44 ±0,10	6,98 ±0,11	0,23 ±0,03	0,17 ±0,10	0,094 ±0,018	0,030 ±0,003

Tableau A.G.7 : cas de Plomb.

	[Pb <sup>2+</sup> ]						
	T (°C)	S (Psu)	pH	P-PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )
EM	18,67 ±1,28	38,09 ±0,15	6,83 ±0,23	0,56 ±0,007	0,032 ±0,0033	0,050 ±0,022	0,009 ±0,009
Témoin	17,32 ±0,24	38,20 ±0,14	6,68 ±0,24	0,49 ±0,28	0,041 ±0,023	0,041 ±0,055	0,012 ±0,0023
E <sub>1</sub>	19,88 ±0,10	38,09 ±0,11	7,09 ±0,06	0,68 ±0,08	0,0024 ±0,0003	0,0011 ±0,0004	0,023 ±0,0091
E <sub>2</sub>	16,98 ±0,40	38,25 ±0,04	6,63 ±0,20	0,51 ±0,017	0,0006 ±5,87	0,0010 ±0,0006	0,020 ±0,0034
E <sub>3</sub>	19,47 ±0,20	37,98 ±0,32	6,75 ±0,07	1,47 ±0,45	0,0017 ±0,0005	0,0013 ±0,0005	0,028 ±0,0023

Tableau A.G.8 : Cas de cuivre (essai d'été (Juin))

	[Cu <sup>2+</sup> ]						
	T (°C)	S (Psu)	pH	P-PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )
EM	21,77 ± 0,59	37,85 ± 0,18	6,17 ± 0,04	0,51 ±0,10	0,05 ±0,04	0,060 ±0,043	0,021 ±0,002
Témoin	22,19 ±0,61	37,87 ±0,22	6,17 ±0,04	0,41 ±0,07	0,30 ±0,24	0,032 ±0,009	0,035 ±0,01
E <sub>1</sub>	22,14 ±0,84	37,89 ±0,01	6,20 ±0,04	0,85 ±0,25	0,54 ±0,09	0,103 ±0,04	0,06 ±0,03

Tableau A.G.9 : Cas de cuivre (essai de l'été (juillet) : répétition n° 1)

	[Cu <sup>2+</sup> ]						
	T (°C)	S (Psu)	pH	P-PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )
EM	23,71 ±0,01	37,93 ±0,04	6,39 ±0,08	0,60 ±0,116	0,23 ±0,09	0,066 ±0,01	0,03 ±0,027
Témoin	22,19 ±0,61	37,87 ±0,22	6,17 ±0,04	0,41 ±0,07	0,103 ±0,04	0,30 ±0,24	0,035 ±0,01
E <sub>1</sub>	23,44 ±1,32	37,93 ±0,04	6,49 ±0,10	0,53 ±0,29	0,039 ±0,068	0,41 ±0,15	0,06 ±0,03

Tableau A.G.10 : Cas de cuivre (essai d'automne (Octobre))

	[Cu <sup>2+</sup> ]						
	T (°C)	S (Psu)	pH	P-PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )
EM	20,40 ±0,23	37,61 ±0,23	7,26 ±0,74	0,17 ±0,13	0,62 ±0,04	0,26 ±0,35	0,01 ±0,5
Témoin	20,66 ±0,68	36,87 ±0,82	6,40 ±0,34	0,19 ±0,091	0,057 ±0,046	0,024 ±0,019	0,009 ±0,014
E <sub>1</sub>	21,08 ±0,19	37,27 ±0,87	6,67 ±0,08	0,44 ±0,10	0,107 ±0,046	0,066 ±0,049	0,041 ±0,007
E <sub>2</sub>	20,10 ±0,19	37,73 ±0,27	7,26 ±0,87	1,20 ±0,45	0,144 ±0,033	0,10 ±0,063	0,014 ±0,007
E <sub>3</sub>	20,11 ±0,09	37,70 ±0,21	7,74 ±0,13	2,68 ±0,39	0,128 ±0,020	0,075 ±0,011	0,044 ±0,0061

### A.G.3. Résultat physico-chimique de test contamination /décontamination

Tableau A.G.11 : valeurs moyennes de quelques paramètres physicochimiques au cours de test contamination/décontamination.

	Température moyenne	pH moyenne	Salinité moyenne
Lot	19,7±0,91	7,44±0,42	36,91±1,27
EM	18,80±0,83	7,54±0,30	37,24±0,85
Témoin	18,36±1,01	7,54±0,23	36,33±1,72
[Cu]=0,005 mg.L <sup>-1</sup>	18,62±1,04	7,66±0,083	36,36±2,81
[Cu]=0,015 mg.L <sup>-1</sup>	18,55±0,97	7,63±0,12	36,88±1,80
[Pb]=0,5 mg.L <sup>-1</sup>	18,28±0,87	7,53±0,12	37,48±0,10
[Pb]=2 mg.L <sup>-1</sup>	19,30±0,06	7,55±0,07	37,41±0,16
	Température moyenne	pH moyenne	Salinité moyenne
Lot	13,77±0,38	6,62±0,07	36,3±0,070
EM	13,72±0,1	6,27±0,08	36,16±0,08
Témoin	14,25±0,52	6,69±0,61	36,71±0,80
[Cd]=0,5 mg.L <sup>-1</sup>	14,15±0,37	6,60±0,87	36,64±0,94
[Cd]=2 mg.L <sup>-1</sup>	14±0,51	6,91±0,94	36,13±0,05
Mélanges	13,65±0,07	6,22±0,09	36,15±0,07

#### A.G.4. Résultats microbiologiques

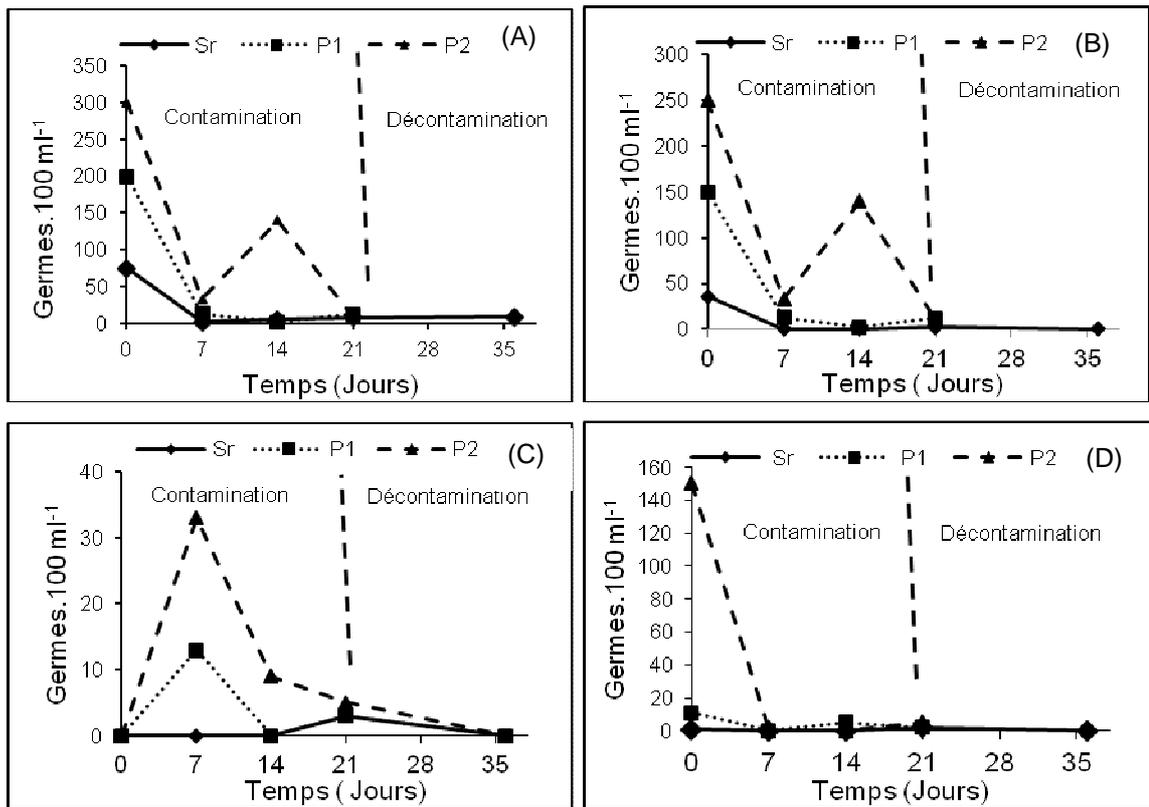


Figure A.G.1 : Variation du nombre des germes dans l'eau de mer, (A) : coliformes totaux, (B) : coliformes fécaux, (C) : Escherichia coli, (D) : Streptocoque.

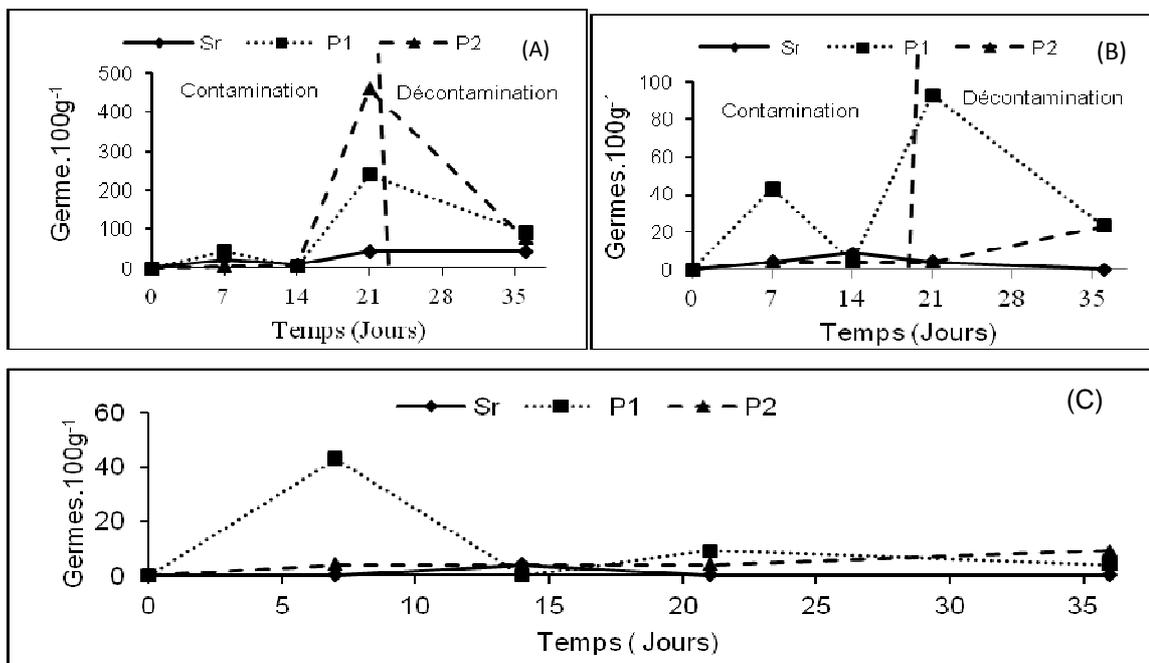


Figure A.G.2 : Variation du nombre des germes dans les moules, (A) : coliformes totaux, (B) : coliformes fécaux, (C) : Escherichia coli.

## REFERENCES

1. Benamar, N., Bouderbala, M., Boutiba, Z., " Evaluation de la concentration en cadmium d'un poisson pélagique commun, *Sardinella aurita*, dans la baie d'Oran ", Science. Halieutique et Aquaculture, (2010), 1:16-20.
2. Belhaouari, B., Rouane-Hacene, O., Bouhadiba, S., Boutiba, Z., " Utilisation d'un Gastéropode marin *Osilinus turbinatus* en biosurveillance marine : application aux métaux lourds du littoral algérien occidental ", Science. Halieutique et Aquaculture, (2010), 3:89-96.
3. Compte rendu du Séminaire Conjoint Algérie-Japon sur : la pollution marine due aux activités sur terre, Organisé conjointement par la : JICA et ONEDD et le MATE, Algérie, (2012) ,108p.
4. Merzouki, M., Talib, N., Sif, J., "Indice de condition et teneurs de quelques métaux (Cu, Cd, Zn et Hg) dans les organes de la moule *Mytilus galloprovincialis* de la côte d'El Jadida (Maroc) en mai et juin 2004 ", Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section sciences de la vie, n°31 (1), (2009), 21-26.
5. Kupe, L., Miho, Aleko. , Cullag, A., Lazo, P., "Accumulation of heavy metals in water, Biota and sediments in same Alabamian rivers", Natura Montenegrina, Podgorica; 9(3), (2009), 803-813.
6. Megateli, S., " Étude de la toxicité de trois métaux lourds (cuivre, cadmium et zinc) et d'un fongicide (diméthomorphe) sur une plante aquatique : perspectives d'utilisation en phytoremédiation ", Thèse de Doctorat, Université de Blida, (2010) 144 p.
7. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J-C., Ramade, F., "Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement ", Edition TEC & DOC, Paris, (1998) ,320 p.
8. Perez, T., Sartoretto, S., Soltan, D., Capo, S., Fourt, M., Dutrieux, E., Vacelet, J., Harmelin, J.G., Rebouillon, P., " Etude bibliographique sur les bioindicateurs de l'état du milieu marin. Système d'évaluation de la qualité des Milieux Littoraux ", 4 fascicules, (2000), 642 pp.
9. Chaabouni, R., "Utilisation et mise au point au niveau moléculaire de biomarqueurs pour étudier la répartition spatiale de la contamination au voisinage d'une source depollution ", Thèse de Doctorat, Université de Sfax, Tunisie, (2009) ,233 p.
10. Meknachi, A.E.H., "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 de Blida, (2010) ,168p.
11. Zouaoui, F., " Contrôle et surveillance de la pollution marine par l'utilisation de la catalase comme biomarqueur de stress non spécifique mesurée sur la moule *Mytilus galloprovincialis* ", mémoire d'ingénieur, Université de Blida, (2010), 70 p.
12. Bazouche, M., Mesbaiah, F. Z., " Contribution a l'étude de la bioaccumulation de deux métaux lourds (Cu et Pb) et les biomarqueurs enzymatiques chez la moule *Mytilus galloprovincialis*", mémoire d'ingénieur, Université de Blida, (2008) ,70p.
13. Calamari, D., Naeve, H., "Revue de la pollution dans l'environnement aquatique africain, document technique du Comité des pêches continentales pour l'Afrique(CPCA) ", N°. 25. Rome", (1994). 129 p.

14. Gray, J.S., McIntyre, A., Stirn, J., "méthode de recherche sur l'environnement aquatique, document technique sur la pêche", N°. 324. Rome, (1992). 44 p.
15. Pelletier, E., Campbell, P.C.G., Denizeau, F., " Ecotoxicologie moléculaires : Principes fondamentaux et perspectives de développement", Presse de l'université de Québec, Québec, (2004), 502 p.
16. El-Bekkaye, K., Melhaoui, M., Evaluation de la bioaccumulation des métaux traces chez *Donax trunculus* dans la côte méditerranéenne marocaine (depuis Saidia à Al Hoceima), Conférence Méditerranéenne Côtière et Maritime, Edition 2, Tanger, Maroc, (2011), 4 p.
17. Termel-Schaud, A., Feix, I., " Contamination des sols : transferts des sols vers les plantes", Editions admin", France, (2005), 618 p.
18. Lafabrie, C., "Utilisation de *Posidonia oceanica* (L.) comme bio-indicateur de la contamination métallique", thèse de doctorat, université de Corse, France, (2010), 158 p.
19. Connor, P.M., "Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae", marine pollution, Volume 3, Issue 12, (1972), 190-192.
20. Azdi, M., "Utilisation de la moule africaine *Perna perna* Born (1780) pour l'évaluation de la contamination des côtes marocaines par les hydrocarbures : analyse de paramètres chimiques et biologiques", Thèse du doctorat, université Ibnou Zohr, Maroc, (2006), 179 p.
21. Glasby, G.P., "Entropy pollution and environmental dégradation", *Ambio*, (1998), 17, 330-335.
22. Nriagu, J.O., "Global metal pollution poisoning the biosphere", *Env*, 32, (1990), 7-33.
23. Ramade, F., " Introduction à l'écotoxicologie : Fondements et applications", Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris, (2007) ,618 p.
24. Grimes., Ruellet, T., Dauvin, J.C., " Ecological quality status of the soft-bottom communities from the Alegria coast : general patterns and diagnostic", (2010), *Marine pollution bulletin*, 60,1969-1977, dans : Compte rendu du séminaire conjoint Algérie-Japon sur la pollution marine due aux activités sur la terre, organisé conjointement par la JICA - le MATE, et l'ONEDD, Alger, (2012).
25. Asso, A., " Contribution a l'étude de polluants métalliques chez la moule *Perna perna*, dans la région d'Alger", Thèse de doctorat, université Aix Marseille II, (1982) ,149p, dans : Compte rendu du séminaire conjoint Algérie-Japon sur la pollution marine due aux activités sur la terre, organisé conjointement par la JICA - le MATE, et l'ONEDD, Alger, (2012).
26. Chouikhi, A., Sellali, B., Azzouz, M., "Heavy metals concentrations contained on the sediments surface of Algerians", *Rapports et Procès Verbaux des Réunions-Commission Internationale pour l'exploration Scientifique de la mer méditerranée*, (1988), 31,161, dans : Compte rendu du séminaire conjoint Algérie-Japon sur la pollution marine due aux activités sur la terre, organisé conjointement par la JICA - le MATE, et l'ONEDD, Alger, (2012).
27. Amaouch, C., Debich, S., "Exploration de la pollution par les hydrocarbures polyaromatiques des sédiments des cotes Ouest d'Algérie : identification et caractérisation ", mémoire d'ingénieur, (1991), ISMAL, Alger, 112p, dans : Compte rendu du séminaire conjoint Algérie-Japon sur la pollution marine due aux activités sur la terre, organisé conjointement par la JICA - le MATE, et l'ONEDD, Alger, (2012).
28. Arar ,K., Saoudi, Z., Sellali, B., Boudjellal, B., Azzouz, M., Ounadi, F., "Métaux lourds dans les sédiments superficiels du golfe d'Arzew", Séminaire international sur l'environnement, Développement et protection des zones côtières, du 1 au 3 juin, Gouvernorat d'Alger, 1998 au palais des nations, pp 43-44, dans : Compte rendu du séminaire conjoint Algérie-Japon sur la pollution marine due aux activités sur la terre, organisé conjointement par la JICA - le MATE, et l'ONEDD, Alger, (2012).

29. Boudjellal, B., Sellali, B., Benoud, D., Mallem, M.T., " Métaux lourds dans le sédiment superficiel de la Baie d'Alger", (1993), dans : Chouikhi, A., Izard, E., Menioui, M., "Water circulation and pollution in the Maghrébin coasts of the Méditerranéen sea", Proceeding of the INOC work shop on SOSMED Project, Rabat ( Marco), 1992, 153-156, dans : Compte rendu du séminaire conjoint Algérie-Japon sur la pollution marine due aux activités sur la terre, organisé conjointement par la JICA - le MATE, et l'ONEDD, Alger, (2012).
30. Boudjellal, B., Ferhat, N., Djillali, M., Azzouz, M., "Heavy metals in the superficial sediments of Bousmail bay", Rapp, comm., inter, mer medit, 33, assemble plénière, 1995.
31. Boudjellal, B., Sellali, B., Ouldache, F., "Niveau en polluants métalliques chez deux espèces de moules (*Mytilus galloprovincialis*) et *Perna perna*), du littoral algérois", 39<sup>ème</sup> Congrès national de l'association fraisais de la limnologie, Corte (corse), du 3 au 7 juillet 1995.
32. Djamaoui, K., " Niveau en métaux lourds (Hg, Cu, Zn, Mn, Fe) dans les sédiments superficiels de port de Skikda", Mémoire DUEA, ISMAL, Alger, (1996) ,44 p, dans : Compte rendu du séminaire conjoint Algérie-Japon sur la pollution marine due aux activités sur la terre, organisé conjointement par la JICA - le MATE, et l'ONEDD, Alger, (2012).
33. Haliche, Y., Sait., " Qualité chimique des sédiments superficiels du port de Bejaia", Mémoire DEUA, ISMAL, Alger, (1996), 60p, dans : Compte rendu du séminaire conjoint Algérie-Japon sur la pollution marine due aux activités sur la terre, organisé conjointement par la JICA - le MATE, et l'ONEDD, Alger, (2012).
34. Rezoug, S., Boulahdid, M., Boudjellal, B., Azouz, M., Ounadi, F., "Evaluation des éléments métalliques en traces et de la matière organiques dans les sidéments superficiels de la baie de Skikda", Séminaire international sur l'environnement, développement et protection des zones côtières, du 1 au 3 juin, gouvernorat d'Alger, (1998) au palis des nations, pp 24-25, dans : Compte rendu du séminaire conjoint Algérie-Japon sur la pollution marine due aux activités sur la terre, organisé conjointement par la JICA - le MATE, et l'ONEDD, Alger, (2012).
35. Sellali, B., "La pollution par les hydrocarbures pétrolières en méditerrané sud, occidentale : niveaux de contamination de l'eau et du sédiment superficiel des régions littorales centre et ouest d'Alger", thèse de Magistère, ISMAL, 124p, dans : Compte rendu du séminaire conjoint Algérie-Japon sur la pollution marine due aux activités sur la terre, organisé conjointement par la JICA - le MATE, et l'ONEDD, Alger, (2012).
36. Sellali, B., Chouikhi, A., Hocini, N., Yahi, D., Boudjellal, B., "Contamination des sédiments de la cotes algérienne par les hydrocarbures poly- aromatiques", Workshop, pollution des cotés méditerranéennes du Maghreb., Rabat (Maroc), Nov., 1992, dans : Compte rendu du séminaire conjoint Algérie-Japon sur la pollution marine due aux activités sur la terre, organisé conjointement par la JICA - le MATE, et l'ONEDD, Alger, (2012).
37. Sellali, B., Hadj- Ammar, S., Boudjellal, B., Chouikhi, A., "Polycyclic Aromatic hydrocarbonés (PAHs) in the Nearshore Superficiel Sediments of Bousmail Bay (Alegria) ", CIESM (Congrès-Assemblée), Malte, 27-31 Mars 1995, dans : Compte rendu du séminaire conjoint Algérie-Japon sur la pollution marine due aux activités sur la terre, organisé conjointement par la JICA - le MATE, et l'ONEDD, Alger, (2012).
38. Sellali, A., Bencheikh, S., Ounadi., Khiari, N., Eddalia, N., Sellali, B., Azouze, N., Boudjellal, B., "détermination des causes de l'altération et identification des contaminants", Contrats ISMAL-APPL, (1995), 36p, dans : Compte rendu du séminaire conjoint Algérie-Japon sur la pollution marine due aux activités sur la terre, organisé conjointement par la JICA - le MATE, et l'ONEDD, Alger, (2012).

39. Zirino, A., and Yamamoto, S., "A pH-dependent model for the chemical speciation of copper, zinc, cadmium, and lead in seawater, limnology and oceanography", September 1972, V.17 (5), 11 p.
40. Gonzalez, J.L., " Le Cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire", Editions Quae, (1999), Volume 10, 31 p.
41. Mouabad, A., "toxicité comportementale et physiologique (filtration, respiration) des métaux lourds (Cu, Zn, Hg, Cd et Pb) chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*", Thèse du doctorat, université de METZ, France, (1991), 273 p.
42. Casas, S., " modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, *mytilus galloprovincialis*, en milieu méditerranéen ", thèse de doctorat, université sud Toulon, (2006), 363 p.
43. Daniel Cossa, D., Elbaz-Poulichet, F., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., " le plomb en milieu marin biogéochimie et ecotoxicologie", IFREMER, N°3, (1993) ,77 p.
44. Amiard, J.C., Amiard- Triquet, C., " Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques" ; Edition TEC & DOC, Paris, (2008), 375 p.
45. Aurélie, B., "Identification et étude de l'expression de gènes de détoxication chez les bivalves d'eau douce *Unio tumidus* et *Corbicula fluminea* : Approches en laboratoire et en milieu naturel", Thèse de Doctorat, Université De Metz, France, (2009), 189 p.
46. Monbet, P., Coquery, M., "Approches analytiques pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux dans les milieux aquatiques", Rapport Technique, INERIS, (2003) ,89 p.
47. Karlen, C., Odnevall-Wallinder, I., Heijerick, D., Leygraf, R., "Runoff rates, chemical speciation and bioavailability of copper released from naturally patinated copper", Environmental Pollution 120, (2002), 691-700.
48. Gagneux-Moreaux, S., "Les métaux (Cd, Cu, Pb et Zn) dans la production des microalgues sur différents milieux de culture : biodisponibilité, bioaccumulation et impact physiologique", Thèse de doctorat, Université de Nantes, France, (2006), 273 p.
49. Cossa, D., Lassus., P., "Le cadmium en milieu marin. Biogéochimie et Ecotoxicologie". Rapports Scientifiques et Techniques de l'Ifremer, n° 16, (1989), 111 p.
50. Boury, M., " le plomb en milieu marin ", ifremer, n°2, (1993), 9 p.
51. Bourgeault, A., "Bioaccumulation par *Dreissena polymorpha* : quel reflet de la contamination chimique de milieu ? Expérimentation-Observation-Modélisation", Thèse du doctorat, université de Marie Curie, France, (2010), 250 p.
52. Zegmout, M., Basraoui, Y., El-Addouli, D., Demnati, S., Chahlaoui, A.E.K., Chafi, A.E.H., "Bioaccumulation des terres rares par des moules (*Mytilus galloprovincialis*), (Mollusque Lamellibranche) récoltées sur la côte méditerranéenne de Saïdia, (Est du Maroc) et contamination expérimentale", Volume 3, N ° 110702, Science Li, (2011), pp 1-10.
53. Strady, E., " Mécanismes biogéochimiques de la contamination des huîtres *Crassostrea gigas* en cadmium en baie de Marennes Oléron", Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, France, (2010), 293 p.
54. Marie, V., "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, Université Bordeaux 1, France, (2005), 461 p.
55. Mersch., "Modalisation s'utilisation de la moule zébrée *Dreissena polymorpha* en tant qu'indicateur biologique de la contamination des écosystèmes d'eau douce par les métaux lourds, comparaison avec un autre type d'organismes sentinelles les mousses aquatiques", Thèse du doctorat, université de METZ, France, (1993), 243 p.
56. Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., "Effect of natural factor (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in

- resident populations of oysters (*Crassostrea gigas*) from a polluted estuary. Mar. Ecol. Prog. Ser, (1998), 162: 125-135.
57. Rajkumar, J.S.I., John-Milton, M.C., "biochemical changes induced by cadmium, copper, lead and zinc exposure to *Perna viridis* under long term toxicity test", International Journal of Pharma and Bio Sciences, Vol 2, Issue 3, (2011), pp 50-59.
  58. Marshall, A.T., Talbot, V., "Accumulation of cadmium and lead in the gills of *Mytilus edulis*: x-ray microanalysis and chemical analysis", Chem.Biol, Interact, 27, (1979), pp 111-123.
  59. Essedaoui, A., Sif, D., "Bioaccumulation des métaux lourds et induction des métalloprotéines au niveau de la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis*", Actes Inst. Agron. Vet, (2001), Vol. 21 (1), pp 17-25
  60. Volodymyr, I. L., "environmentally induced oxidative stress in aquatic animals", Aquatic Toxicology, 101, (2011), pp 13-30.
  61. Peralta-Videoa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G., Gardea-Torresdey, J., "The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain: Review". Biochemistry and Cell Biology, 41, (2009), pp 1665-1677.
  62. Eduardo, A. A, Afonso., C. D. B., Ana, P.M.L., Glaucia, R.M. S. M., Janice, O. L. F. B., Camilla, C. M. G., Fernanda, M.P., Graziella, E. R., Carlos, A. S., Claudia, B.B., Ana, M. G.M., Marisa, H.G.M., Paolo, D.M., "Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage", Comparative Biochemistry and Physiology, Part A ,146 (2007), pp 588-600.
  63. Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review", Environmental Toxicology and Pharmacology, 13, (2003), pp 57-149.
  64. Garric, J., Morin, M., Vincent-Hubert, F., "Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage", Sciences Eaux & Territoires N° (01), (2012), pp 12-17.
  65. Dellali, M., Romeo, M., Aissa, P., " Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte", Oceanologica Acta, Vol.24, N° : 3, (2001), pp 263-271.
  66. Letendre, J., " Effets combinés de l'intertidalité et de la contamination chimique chez *Mytilus edulis* : Mécanismes enzymatiques anti-oxydants et approche protéomique", Thèse de doctorat, Université du Havre, France, (2009), 243 p.
  67. Nimis, P.L., "The future of the bioindication with lichens. International lichenological news lettre", (1999), dans : Faburé, J., "Étude de l'accumulation et des effets des composés organiques volatils (BTEX) chez les bryophytes ", Thèse de doctorat, Université de Lille, France, (2009), 299 p
  68. Soumady ,D., Asokan,S., "A Study on Protein Content in Selected Organs of *Perna viridis* at Tranquebar Coastal Waters, Tamilnadu, India", World Journal of Zoology, 6 (4),(2011), pp 360-363.
  69. Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F., "The role of biomarkers in environmental assessment (5), Invertebrate populations and communities", Ecotoxicology, 3, (1994), pp 193-208.
  70. Bachelot, M., "Contamination de moules (*mytilus sp.*) en milieu marin par des substances pharmaceutiques et produits de soin", Thèse de Doctorat, Université Montpellier 1, (2010) ,243 P.
  71. Charrid-Resgalla, J.R., Salomon, L.C., "The Effect of Temperature and Salinity on the Physiological Rates of the Mussel *Perna perna* (Linnaeus 1758)", Vol.50, n. 3, (2007), pp 543-556.
  72. Enriquez-Ocana, L.F., Nieves-Soto, M., Pina-Valdez, P., Martinez-Cordova, L.R., Maria, A., "Evaluation of the combined effect of temperature and salinity on the filtration, clearance rate and assimilation efficiency of the mangrove oyster *Crassostrea corteziensis*", Arch. Biol. Sci., Belgrade, 64 (2), (2012), pp 479- 488.

73. Yukihiro, H., Lucas, J.S., and D.W. Klumpp., "Comparative effects of temperature on suspension feeding and energy budgets of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P. maxima*", Marine Ecology Progress Series, 195, (2000), pp 179-188.
74. Moal, J., Lambert, C., Pouvreau, S., Le Moullac, G., Samain, J.F. "Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, McCombie, H. (Ed.), (2007), pp 271-289.
75. Regnault-Roger, C., "Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement", Tec & Doc Lavoisier (2005), Paris, 1014 p.
76. Lesven, L., "Devenir des éléments traces métalliques au sein du sédiment, un compartiment clé de l'environnement aquatique», thèse de doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, France, (2008), 247 p.
77. Prakash, N.T., Rao, K.S.J., "Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure". Mol. Cell. Biochem. 146, (1995), pp 107- 113.
78. Khessiba, A., Rome M., Aïssa, P., "Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane", Environmental Pollution, 133, (2005), pp 275-281.
79. Gazeau, F., Nzigou, A.R., "Effet de l'augmentation de la pression partielle du CO<sub>2</sub> sur la calcification des moules (*Mytilus edulis*) ", Rapport, Université de Bretagne Occidentale, Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), France, (2008), 43 p.
80. Cheung, S.G., "The physiological, ecology of *Perna viridis* from contrasting environments in Hong Kong", Hong Kong university press, Hong Kong, (1993), 559-578, dans : Morton., " The marine biology of the South China Sea", second edition, Hong Kong university Press, Hong Kong, (1993), 729 p.
81. Bayne, B.L., Physiological changes in *Mytilus edulis* L., "Induced by temperature and nutritive stress", J. Mar. Biol. Ass. UK, 53, (1973), pp 39-58.
82. Wdzydzak, J., Zalesna, G., Wujec, E., Pérès, G., " Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species", Elsevier, Volume 73, Issue 2, 1982, Pages 361–365.
83. Vincendeau, M. L., Robert, J.M., "Variations qualitatives saisonnières des produits excrétés par deux mollusques bivalves *Crassostrea gigas* (Thunberg) et *Ruditapes philippinarum* (Adam et Reeve) ", Océanis, 13, (1987), pp 543-556.
84. Masilamoni, J.G., Azariah, J., Nandakumar, K., "Excretory products of green mussel *Perna viridis* L. and their implications on power plant operation. Turk. J. Zool. 25, (2001), pp 117-125.
85. Buchet, V., Bluteau, A., " Etude d'un élevage intégré Bars-huîtres Influence de deux gestions hydrauliques de l'élevage piscicole sur le pré grossissement d'huîtres ", Rapports Internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER, Franc, (1996) ,74 p.
86. Almeida, E.A., Bairy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., "Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed". J. Exp. Mar. Biol. Ecol. (2005), 318, pp 21-30.
87. Vakily, J.M., "The Biology and Culture of Mussels of the Genus *Perna*", Manila, Philippines, (1989), 70 p.
88. Berry, P. F. Schleyer, M. H., The brown mussel *Perna perna* on the natal coast, South Africa: utilization of available food and energy budget, Mar. Ecol. hog. Ser. Vol. 13, (1983), 201-210.
89. Héral, M., réflexion sur l'état des recherches ecophysiologie : bilan énergétique des mollusques lamellibranches, IFREMER, (1984), (France), (1984) ,73 p.
90. Mazouni, N., Influence des élevages ostréicoles sur le fonctionnement d'un écosystème lagunaire méditerranéen. Etude *in situ* de l'influence des filtreurs

- (coquillages et épibiontes) sur les flux de matières particulaire et dissoute, Thèse de Doctorat, Université d'Aix-Marseille II, France, (1995) ,238 p.
91. Richard, F.D., Dankers, N., "Uptake and release of materials by a Wadden Sea mussel bed", J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 188, (1988), pp 207-216.
  92. Pay, A., " Réponses biochimiques et physiologiques des symbioses marines tempérées face aux changements climatiques", Thèse de doctorat, université de Nice-Sophia Antipolis, (France), (2012), 191 p.
  93. Tremblay, R., Roussy, M., " Cusson, M., modélisation du potentiel d'épuration de la moule bleue (*mytilus spp.*) en eau froide et en réaction à un choc thermique", Cahier d'information n° 143, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Québec, (1996),42 p.
  94. Valarmathi, S., Azariah, J., "Impact of two sublethal concentrations of copper chloride and chlorine on the excretory products of crab *sesarma quadratum* (fabricius)", Turk J Zool, 26, (2002), pp 357-361.
  95. Aminot, A., Chaussepied, M., " manuel des analyses chimiques en milieu marin", Centre National pour l'Exploitation des Océans (CNEXO), France, (1983), 395 p.
  96. Aminot, A., Kerouel, R., "Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses". Éd. Ifremer, (2004), 336 p.
  97. Rodier, J., Bazin., routin, J.P., Chambon, P., Champsaur., Rodi, L., "L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer", 8ème édition, Dunod, Paris, (2005), 1380 p
  98. Figarella, J., Leyral G., Terret, M., " Microbiologie générale et appliquée", Edit. Jacques Lanore, France, (2001), 285 p.
  99. Davenport. , Woolmington, A.D., "A new method of monitoring ventilator activity of mussels and its use in a study of the ventilator pattern of *Mytilus edulis*", J. Exp. Biol .Ecol, (1982), 62, pp 55-67.
  100. Manly, A.R., "The effects of copper on the behaviors, filtration and ventilation activity of *Mytilus edulis*".J.Mar.Biol.Ass.U.K, (1983), 63, pp 205-222.
  101. Reginald, H. G., Charles, M., G., "Biochimie", Boeck Université, Paris, France, (2000), 1125 p.
  102. Cornish-Bowden, A., Jamin, M., Saks, V., "Cinétique Enzymatique", Portland Press, London, (2005), 463 p.
  103. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr N.J., Randall R.J., "Protein measurements with the Folin phenol reagent", J. Biol. Chem. (1951), 193, pp265–275.
  104. Gülüzar A., Ozlem A., Seyhan T., Mustapha C., " Response of catalase activity to  $Ag^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  in five tissues of freshwater *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology", Elsevier. 143, (2006), pp 218-224.
  105. Twyman, R.M., "sample dissolution for elemental analysis / wet digestion", Elsevier Ltd, (1995), pp 4503- 4510.
  106. Chiffolleau, J.F., Auger, D, Chartier, E., Grouhel, A., " Dosage de certains métaux traces (Ag, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, V, Zn) dans les organismes marins par absorption atomique", Ifremer, France, (2003), 36 p.
  107. Taleb, M, Z., Boutiba, Z., "La moule *Mytilus galloprovincialis* : Bioindicateur de pollution marine : cas du port d'Oran", Sciences & Technologie C, N°25, Juin (2007), pp 59-64.
  108. Entreprise de Gestion des ports de Pêche (E.G.P.P), " Guide des ports de pêche algériens", (E.G.P.P), Algérie, (2009) ,75 p.
  109. Entreprise de Gestion des ports de Pêche (E.G.P.P), " Fiche technique", (E.G.P.P), Algérie, (2006), 11 p.
  110. Afnor., " Analyse biochimique et biologique. Analyse microbiologique : recueil environnement ", Tome 4, 6<sup>ème</sup> édition, Paris, (2003), 695 p.
  111. Afnor., "Contrôle de la qualité des produits alimentaires, produits de la pêche : recueil de normes françaises", 2<sup>ème</sup> édition, Paris, (1998), 165 p.
  112. Afnor., " microbiologie des aliments. - recherche des salmonella. - méthode de routine ", 2<sup>ème</sup> édition, Paris, (1997), 24p.

113. Sitouah, AEH. Derrad, ABN., "Contribution a l'étude de la qualité microbiologique et la contamination en métaux lourds des moules : *Perna perna*", mémoire d'ingénieur, Université de Blida, (2011), 53 p.
114. Reddy, N.A., Menon, N.R., "Effects of ammonia and ammonium on tolerance and byssogenesis in *Perna viridis*", Vol. 1, (1979), pp 315-321.
115. Ritz, D.A., Swain, R., Elliot, N.G., "Use of the mussel: *Mytilus edulis Planulatus* (Lamarck) in monitoring heavy metal levels in seawater", *Aus, J, Mar, Fresh Water Res.*, 33, (1982), pp 491-506.
116. Pellerin-Massicotte, J., " Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis*) ", *Journal de la recherche océanographique*, vol. 22, n° 3, (1997), pp 91-98.
117. Salaskar, H.M., Nayak, V.N., "nutritional quality of bivalves, *Crassostrea madrasensis* and *Perna viridis* in the kali estuary, karnataka, india", *recent research in science and technology*, (2011), 3(4): 06-11.
118. Anil Chatterji, Z.A. Ansari, B.S. Ingole, A.H. Parulekar Growth of the green mussel, *perna viridis* L., in a sea water circulating system, *Aquaculture* Volume 40, Issue 1, 1 July 1984, Pages 47-55.
119. Nicholson, S., "Cytological and Physiological Biomarker Responses from Green Mussels, *Perna viridis* (L.) Transplanted to Contaminated Sites in Hong Kong Coastal Waters Marine Pollution", *Marine Pollution Bulletin* , Volume, 39, (1999), 261-268.
120. Lau, P.S ., Wong, H.L ., " Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis* ", *Marine Pollution Bulletin* Volume 46, Issue 12, 2003, 1563-1572.
121. Nair, R.M., Appukuttan, K.K., "Effect of temperature on the development, growth, survival and settlement of green mussel *Perna viridis* (Linnaeus, 1758)", *Aquaculture Research*, Volume 34, Issue 12, (2003), 1037-1045.
122. Nakamura, Y., Hagino, M., Hiwatari, T., Jima, A., Kohata, K., Furot, T., Growth of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Sanbanse, the shallow coastal area in Tokyo Bay, *Fisheries Science*, (2002) 68, 6, pp 1309–1316.
123. Coeroli, M.D., Gaillande, J.P., "Recent innovation in cultivation of mollusks in French", *Polynesia, Aquaculture* 39, (1984), 45-67  
dons: Vakily, J.M., "The Biology and Culture of Mussels of the Genus *Perna*", Manila, Philippines, (1989), 70 p.
124. Huang, Z.G., Mark, P.M.S., "The distribution and population structure of *Perna viridis* (Bivalves: Mytilacea) in Honk Kong waters", p.465-472, dans: Dudgeon, D., "Proceeding of the Second international workshop on the malacofauna of Hong Kong and Southern China", Honk Kong university press, V°2, (1985), 6-24, dans : Vakily, J.M., "The Biology and Culture of Mussels of the Genus *Perna*", Manila, Philippines, (1989), 70 p.
125. Liu, Y., Wang, W.N., Wang, A.L., Wang, J.M., Sun, R.Y., "Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes", *Aquaculture*, (2007), 265, pp 351-358.
126. Choi, C.Y., An, K.W., An, M.I., "Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase during osmotic stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)", *Comp. Biochem. Physiol.*, (2008), 149, 330-337.
127. Bjerregaard, P., Depledge, M.H., "Cadmium accumulation in *Littorina littorea*, *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas*: the influence of salinity and calcium ion concentrations", *Mar. Biol.* 119, (1994), pp 385-395.

128. Segnini, M.I., "Influence of salinity on the physiological conditions in mussels, *Perna perna* and *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae)", Rev. Biol. Trop., 51, Supl. 4, (2003), pp 153-158.
129. Lee, R., Lovatelli, A., Ababouch, L., "Purification des coquillages bivalves: aspects fondamentaux et pratiques, FAO Document technique sur les pêches, No 511, Rome, FAO, (2010), 155 p.
130. Loayza-Muro, R., Elias-Letts, R., "Responses of the mussel *Anodontites trapesialis* (Unionidae) to environmental stressors: Effect of pH, temperature and metals on filtration rate", Environmental Pollution, 149, (2007), pp 209-215.
131. Wickins, J.F., "The effect of reduced pH on carapace calcium, strontium and magnesium levels in rapidly growing prawns (*Penaeus monodon*)", Aquaculture, 41, (1984), pp 49-60.
132. Miller, K.I., Magnum, C.P., "An investigation of the nature of Bohr, Root, and Haldane effects in Octopus *dofleini hemocyanin*", J. Comp. Physiol. B. 158, (1988), pp 547-552.
133. Bamber, R.N., "The effects of acidic sea water on young carpetshell clams *Venerupis decussata* (L.) (Mollusca: Veneracea) ", J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 108, (1987), pp 241-260.
134. Tonegawa, Y., Hojiro, E., Takahashi, K., "Effect of pH on the participation of calcium ion in the cell aggregation of sea urchin embryos", Zool. Sci. 7, (1990), pp 229-234.
135. Miller, D.C., Poucher, S., Cardin, J.A., Hansen, D., "The acute and chronic toxicity of ammonia to marine fish and a mysid", Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19, (1990), pp 40-48.
136. Bengtsson, B.E., "Use of a harpacticoid copepod in toxicity tests", Mar. Pollut. Bull. 9, (1978), pp 238-241.
137. Wang, Y., Menghong, H., Cheung, S.G., Shin, P.K.S., Weiqun, L., Jiale, L., "Immune parameter changes of hemocytes in green-lipped mussel *Perna viridis* exposure to hypoxia and hyposalinity", Aquaculture, 356-357, (2012), pp 22-29
138. Nicholson, S., "Ecocytological and toxicological responses to copper in *Perna viridis* (Bivalve: Mytilidae) haemocyte lysosomal membranes", Chemosphere, 45, (2001), pp 339-407.
139. Tran, D., Boudou, A., Massabuau, J.C., "How water oxygenation level influences cadmium accumulation pattern in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: a laboratory and field study", Environ. Toxicol. Chem, 20, (2001), pp 2073-2080.
140. Vidal, M.L., Bassères, A., Narbonne, J.F., "Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller)", Comp. Biochem. Physiol. 132, (2002), pp 93-104.
141. Danilo, T. D., Helen, T. Y., "Ammonium and phosphate excretion in three common echinoderms from Philippine coral reefs", Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 251, (2000), pp 227-238.
142. Vosloo, D., Sara, J., Vosloo, A., "Acute responses of brown mussel (*Perna perna*) exposed to sub-lethal copper levels: Integration of physiological and cellular responses", Aquatic Toxicology, 106-107, (2012), pp 1- 8.
143. Cheung, S. G., Richard, Y. H. C., "Effects of Heavy Metals on Oxygen Consumption and Ammonia Excretion in Green-Lipped Mussels (*Perna viridis*) ", Marine Pollution Bulletin, Vol. 31, Nos 4-12,(1995), pp 381-386.
144. Novas, A., Barcia, R., Ramos-Martinez, J. I., "Nitric Oxide production by Haemocytes from *Mytilus galloprovincialis* shows seasonal variations", Fish and Shellfish Immunology, 23, (2007), pp 886-891.
145. Arumugan, M., Romestand, B., Torreilles, J., "Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate", Aquatic Living Resource, (2000), 13, pp 173-177.

146. Pey, A., Zamoum, T., Allemand, Furla, P., Merle, P.L., "Depth-dependant thermo tolerance of the symbiotic Mediterranean gorgonian *Eunicella singularis*: Evidence from cellular stress markers", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 404, (2011), pp 73-78.
147. G eret, F., Cosson, R.P., "Induction of specific isoforms of metallothionein in mussel tissues after exposure to cadmium or mercury", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, (2007), pp 36-42.
148. Amiard-Triquet, C., Lassus, P., Amiard, J.C., Devineur, J., et Denuit, C., " Influence des procédures expérimentales sur la détermination de la toxicité aiguë de quelques polluants à l'égard de divers organismes marins et eurhaliens", *Les Colloques de l'INSERM : les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique*, 106 ,( 1981), 485-496, dans : Daniel Cossa, D., Elbaz-Poulichet, F., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., " le plomb en milieu marin biogéochimie et ecotoxicologie", *IFREMER*, N 3, (1993).
149. Celso, A., Bainy, D., Helena, M., Medeiros, D., Mascio, P., D., Almeida, E.A., "In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland", *Biotemas*, 19 (1), (2006), 35-39.
150. Raspor, B., Nurnberg, H.W., Valenta, P., Branica, M., "Significance of dissolved humic substances for heavy metal speciation in natural waters", (1984), p 317-327, dans: Daniel Cossa, D., Elbaz-Poulichet, F., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., "le plomb en milieu Marin biog ochimie et ecotoxicologie", *IFREMER*, N 3, (1993).
151. Watling, H., "the effects of metals on mollusc filtering rates", *Trans.Roy. Soc. S. Afr*, 44, (1981), pp 441-451.
152. Arini, A., " Décontamination métallique et capacités de r cup eration de deux composantes biologiques d'un hydro système naturel : bio-films diatomiques et bivalves filtreurs -apres remediation d'un site industriel", Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, (France), (2011), 378 p.
153. Rajagopal, S., Venugopalan, V.P., Van der Verde, G., Jenner, H.A., "Greening of the coasts: a review of the *Perna viridis* success story", *Aqua Ecol*, (2006), pp 1-25.
154. Bhargavan, P.V., Hematological responses of green mussel *Perna viridis* (Linnaeus) to heavy metals copper and mercury, Thesis of doctorate degree (PhD), Cochin University of Science and technology, (2008), India, 229 p.
155. Scott, D.M., Major, C.W., "The effects of copper (II) on survival, respiration and heart rate in the common blue mussel, *Mytilus edulis*", *Biol. Bull.*, 143, (1972), pp 619-688.
156. Davenport, B., Manley, A., "The detection of heightened sea-water copper concentration by the mussel: *mytilus edulis*", *J.Mar.Biol.Ass.U.K*, 58, (1978), pp 843-850.
157. Chan, H.M., "Accumulation and tolerance to cadmium, copper, lead and zinc by the green mussel *Perna viridis*", *Mar. Ecol. Prog. Ser*, 48, (1988), pp 295-303.
158. Emeline, P., C edric, F., Amiard-Triquet, C., Burgeot, T., Couteau, J., Dur,G., Durand, D., Forget-Leray, J., Letendre, J., Souissi, S., Xuereb, B., " Effets de la contamination chimique : des organismes en danger ? ",*GIP Seine-Aval,France*,(2011), 70 p.
159. Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.J., Valavanidis, A., Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece", *Marine Pollution Bulletin*, 54, (2007), pp 1361-1371.
160. Widdows, J., Bakke, T., Bayne, B.L., Donkin, p., Livingstone, D.R., Lowe,D.M, Moore, M.N., Evans, S.V.,Moore,S.V., " Response of *Mytilus edulis* L, on

- exposure to the water accommodated fraction of North Sea oil", *Mar.Bio.*, (1982), 67, pp 15-31.
161. Mosleh, Y. Y., Paris-Palacios S., Ahmed, M. T., Mahmoud, F.M., Osman, M.A., Biagiante-Risbourg, S., "Effects of chitosan on oxidative stress and metallothioneins in aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae)", *Chemosphere*, 67, (2007), pp 167-175
  162. Maarouf, A., "Etude expérimentale de la bioaccumulation et du relargage du zinc chez *Dreissena polymorpha*", Thèse de doctorat, Université de Metz, (France), (1988), 188 p.
  163. Benyahia, M., Crochard, C., Pihan, J.C., " Toxicité, bioaccumulation et relargage du plomb chez *Dreissena polymorpha*, Effets de l'EDTA et des phosphates", *Haliotis*, 18, (2007), 239 p.
  164. Rajkumar, J.S.I., "Arsenic Induced Biochemical Changes in *Perna Viridis* As Potential Biomarkers in Metal Pollution", *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, Vol. 3, (2013), 179-186.
  165. Leonie, A., William, H.L.S., Eric, W.K.C., Felicity, M., Clayton, P., Andrew, S., Paul, K.S.L., "Antioxidant enzymes as biomarkers of environmental stress in oysters in port Curtis", cooperative research centre for coastal zone, estuary and waterway management), *Hong Kong*, (2006), 96 p.
  166. Andrea, L.A., "Les phenoloxydases chez l'huitre creuse *Crassostrea gigas* : biomarqueurs potentiels de stress environnemental, Université de la rochelle, France, (2010), 410 p.
  167. Abaychi, J.K, Mustafa, Y.Z., "The Asiatic clam, *Corbiculn fluminea*: an indicator of trace metal pollution in the Shatt al-Arab River", *Iraq. Environ. Pollut*, 54, (2007), pp 109-122.
  168. Bias, R., Karbe, L., "Bioaccumulation and partitioning of cadmium within the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas)", *Int. Rev.gesomien Hydrobiol*, 70, (2007), pp 113-125.
  169. Jenner, H.A., Van Aerssen, G .H.F.M., "Terwoert, J., (1992), Valve movement behavior of the mussel *Dreissena polymorpha* and the clam *Unio pictorum* for use in an early warning system", In: Neumann, D., Jenner, H .A. (eds), "The zebra mussel *Dreissena polynnrrpha*",*Limnologie Aktuell*, 4, Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart, pp 115-126.
  170. Holwerda, D.A., "Cadmium kinetics in freshwater clams: cadmium-copper interaction metal accumulation by *Aredonta cygnea* and characterization of the metal binding protein", *Arch. Hwiron. Contatn. Toxicol*, 2, pp 432- 437.
  171. Sunila, A.L., "Toxicity of copper and cadmium to *Mytilus edulis* (Bivalvia) in brackish water", *Ann. Zool. Fennici*, 18, (1986), pp 213-223.
  172. Mohan, C.V., Gupta, T.R.C., Shetty, H.P.C., Menon, N.R., "Combined toxicity of mercury and cadmium to the tropical green mussel *Perna viridis*", *Dis. Aquat. Org.* 2, (1986), pp 65-72.
  173. Rodgers, J.H., Cherry, D.S., Graney, R.L., Dickson, K.L., Cairns, J., (1980), "Comparison of heavy metal interactions in acute and artificial steam bioassay techniques for the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*)" ,in: *Aquatic Toxicology*, ASTM STP 707,Eaton, J.G., Parrish, P.R., Hendricks, A.C., (eds). ASTM, Philadelphia, pp 266-280.
  174. Pellerin-Massicotte, J., "Oxidative processes as indicator of chemical stress in marine bivalves", *J. Aquat. Ecos. Health*. 3, (1994), pp 101-111.
  175. Bachari-Houma Fouzia, "Modélisation et cartographie de la pollution marine et de la bathymétrie à partir de l'imagerie satellitaire", Thèse de doctorat, Université de val de Marne Paris XII, France, (2009) ,274 p.
  176. Boukef-Ben-Omrane, I., El-Bour, M., El-Mejri, S., Bjaoui, B., raouna, R., Harzallah, A., Boudabous, A., «Etude de l'influence des facteurs environnementaux sur la distribution de différentes populations bactériennes dans une station mytilicole de

- la lagune de Bizerte (Nord-Tunisie) ", J of Water Science, vol. 22, 1, (2009), p 79-91.
177. Abel, D., Grobpietsch, H., Portner, H., "Temporal fluctuations and spatial gradients of environmental PO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S in its intertidal habitat trigger enzymatic antioxidant protection in the worm *Heteromastus filiformis*", Mar. Ecol. Prog. Ser, 163, (1998), pp 179-191.
  178. Cusson, M., Tremblay, R., Daigle, G., Roussy, M., "Modeling the depuration potential of blue mussels (*Mytilus spp*) in response to thermal shock", Aquacult, 250, (2005), pp 183-193.
  179. Riisgard, H., Kittner, C., Seerup, D., "Regulation of opening state and filtration rate in filterfeeding bivalves (*Cardium edule*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*) in response to low algal concentration". J. Exp. Mar. Biol. Ecol, 284, (2003), pp 105-127.
  180. Plusquellec, M., Beucher, Y., Le, G.G., Littorales, A., "Bivalves : indicateurs de pollution microbienne des eaux, IFREMER", 3, (1986), pp 541-548.
  181. Delattre, J., M., Delesmontr., " L'analyse des coquillages peut-elle servir au contrôle microbiologique du littoral", Rev. Int. Oceanog. Med., 63-64, (1981), pp 11-16.
  182. Prieur, D., "Nouvelles données sur les relations entre bactéries et bivalves marins", Haliotis, 11, (1981), pp 251-260.
  183. Goldberg, E.G., "The mussel watch: a first step in global marine monitoring", Mar. poll. Bull, 6(7), (1975), 111.
  184. Cabelli, V.J., Dufour, A.P., Maccabe, J., Levin, M.A., "Swimming associated gastro enteritis and water quality", Ann. Jour, of Epidemiol, 60, (1982), pp 6-16.
  185. Ronald, L., Alessandro, L., Lahsen, A., "Purification des coquillages bivalves: aspects fondamentaux et pratiques", FAO (Organisation Des Nations Unies Pour L'alimentation Et L'agriculture), Document technique sur les pêches, Rome, (2010), 176 p.
  186. Yap, C.K., Al-Barwani, S.M., "A Comparative Study of Condition Indices and Heavy Metals in *Perna viridis* Populations at Sebatu and Muar", Peninsular Malaysia Sains Malaysiana, 41, (9), (2012), pp 1063-1069.
  187. Regoli, F., "Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: A predictive biomarker of oxidative stress", Aquatic Toxicology, vol. 50, (2000), pp 351-361.
  188. Shek, W.M., Murphy, M.B., Lam, J.C.W., Lam, P.K.S., "Polycyclic musks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) from Hong Kong", Marine Pollution Bulletin 5<sup>th</sup> Internat Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, 57, (2008), pp 373-380.
  189. Marina, F., Stefanoni, D., Abessa, M. S., " Lysosomal Membrane Stability of the brown mussel *Perna perna* (Linnaeus) (Mollusca, Bivalvia) exposed to the anionic surfactant Linear Alkylbenzene Sulphonate (LAS) ", Pan-American Journal of Aquatic Sciences (2008) 3 (1): 6-9.
  190. Jebali, J., Banni, M., Alves de Almeida, E., Boussetta, H., "Oxidative DNA damage levels and catalase activity in the clam *Ruditapes decussatus* as pollution biomarkers of Tunisian marine environment", Environ Monit Assess, 124, (2007), pp 195-200.
  191. Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., Deudero, S., "Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*", comparative Biochemistry and Physiology, 146, (2007), pp 531-539.
  192. Tiziana, C., Maria, M., Alessia, D., Antonino, N., Angela, M., Salvatore, F., "Effects of environmental pollution in caged mussels (*M. galloprovincialis*)", Marine Environmental Research, (2013), pp 1-9.
  193. Raftopoulou, E.K., Dimitriadis, V.K., " Comparative study of the accumulation and detoxification of Cu (essential metal) and Hg (nonessential metal) in the digestive

- gland and gills of mussels *Mytilus galloprovincialis*, using analytical and histochemical techniques ", *Chemosphere*, 83, (2011), pp 1155-1165.
194. Lucas, A., Beninger, P.G., "The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture", *Aquaculture*, 44, (1985), pp 187-200.
  195. Virginie, D., "Compréhension et modélisation des relations entre les caractéristiques biologiques et écologiques et la sensibilité aux contaminants des communautés d'invertébrés benthiques : perspectives pour l'évaluation des effets des substances chimiques", Thèse de doctorat, Université de Metz, France, (2005), 384 p.