

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITÉ de BLIDA 1**

**Faculté de Technologie**

**Département de Génie des Procédés**

**CNRDPA: Centre national de recherche et de développement de  
la peche et de l'aquaculture, Bou-Ismaïl. Tipaza. Algérie.**



# Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER EN GÉNIE DES PROCÉDÉS**

**Spécialité : Génie de l'Environnement.**

Intitulé du mémoire

**APPORT DES BIOINTEGRATEURS DE  
MICROPOLLUANTS DANS LA SURVEILLANCE  
DES EAUX COTIERES (cas de la moule *Mytilus galloprovincialis*)**

Présenté par :

Mr. Krelifa Samir

Mr. Ettaani Ahmed

Encadré par :

Pr. Badis Abdelmalek (Promoteur)

Mr. Meknachi Abdalleh (Co-promoteur)

Année universitaire 2017/2018

# REMERCIEMENTS

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude en vers DIEU pour sa clémence et pour nous avoir donné le courage, la volonté et surtout la santé pour réaliser ce mémoire.*

*Nous tenons à exprimer toute notre gratitude à notre directeur de thèse, Monsieur le Pr. Badis Abdelmalek, pour nous avoir accueillis au sein de son équipe et de nous avoir confié ce sujet de thèse.*

*Nous vous remercions de la confiance que vous nous avons portée pendant ces années.*

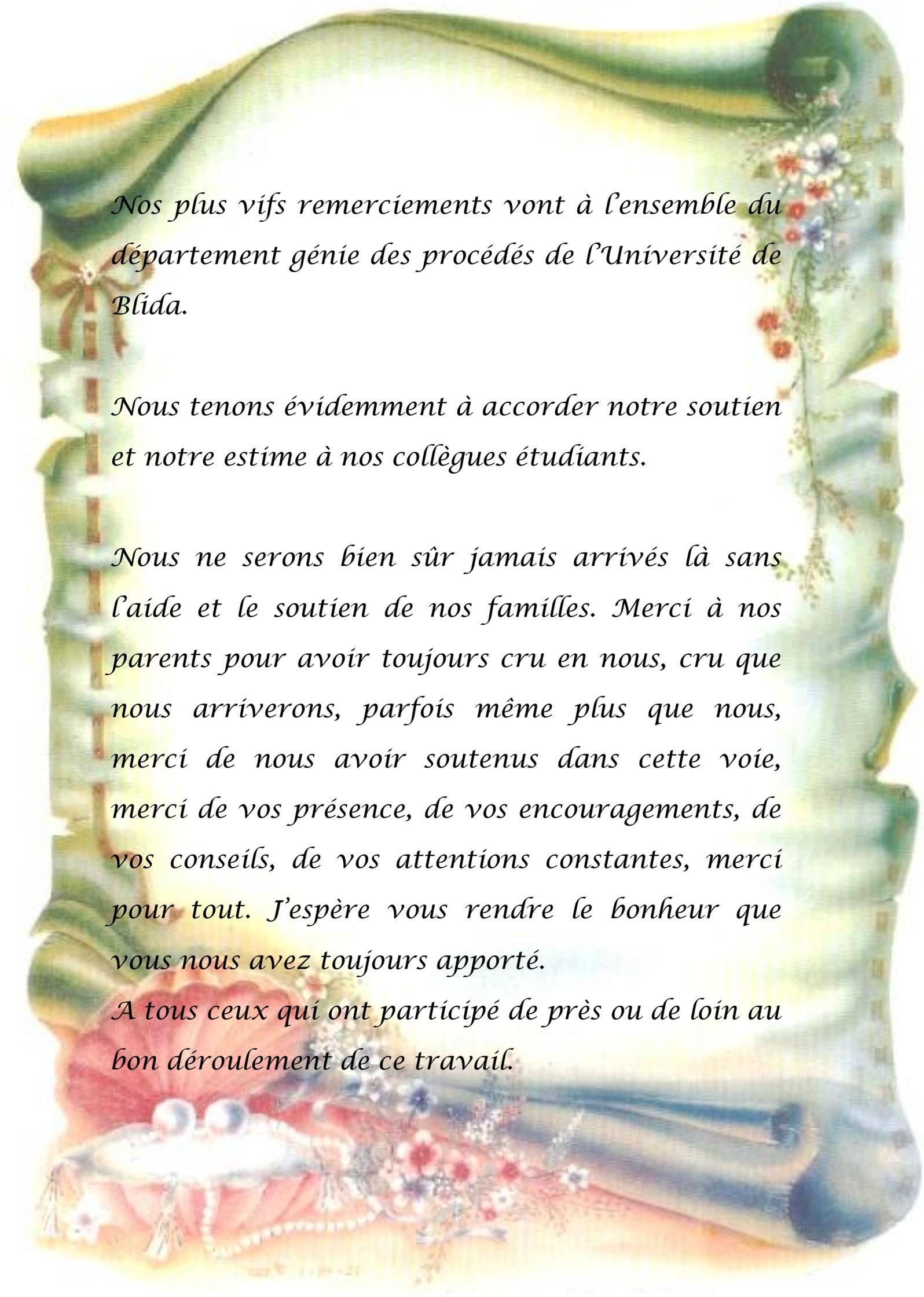
*Nous adressons avec tout notre respect nos remerciements à notre Co-promoteur Mr. Meknachi abdallah pour leur soutien, leur aides et pour le temps précieux qu'il nous est consacré.*



*Nous tenons également à témoigner toute notre reconnaissance et notre gratitude aux membres du jury : de l'université de Blida qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Nous tenons à vous remercier sincèrement et nous espérons que vous serez aussi intéressés à lire ce document que nous l'avons été à l'écrire.*

*Nous tenons tout particulièrement à remercier Monsieur le directeur du CNRDPA pour nous avoir permis de réaliser nos travaux dans les meilleures conditions possibles.*

*Un immense merci à l'ensemble des membres du laboratoire CNRDPA, pour nous avoir aidés à réaliser nos travaux dans les meilleures conditions possibles.*



*Nos plus vifs remerciements vont à l'ensemble du département génie des procédés de l'Université de Blida.*

*Nous tenons évidemment à accorder notre soutien et notre estime à nos collègues étudiants.*

*Nous ne serons bien sûr jamais arrivés là sans l'aide et le soutien de nos familles. Merci à nos parents pour avoir toujours cru en nous, cru que nous arriverons, parfois même plus que nous, merci de nous avoir soutenus dans cette voie, merci de vos présence, de vos encouragements, de vos conseils, de vos attentions constantes, merci pour tout. J'espère vous rendre le bonheur que vous nous avez toujours apporté.*

*A tous ceux qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de ce travail.*



## ملخص

الكاتلاز و ديسموتاز الفائق هما إنزيمان مهمان في منظومة الدفاع المضادة للاكسدة الخلوية في الحيوانات. شملت هذه الدراسة تأثير التعرض الحاد لمياه الصرف الصحي ( النفايات الصناعية) الى درجات حرارة مختلفة على الانشطة الانزيمية و التمثيل الغذائي في *Mytilus galloprovincialis*.

أظهرت النتائج العامة إختلال عملية التمثيل الغذائي للأشخاص المعرضين لملوثات مياه الصرف، وعلى عكس تأثير درجة الحرارة، وأدت إلى زيادة في إنتاج النيتروجين والفوسفور والأمونيا هو نتيجة مباشرة ل وجود ملوثات في المركز ، فقد أصبح مقياس للاهتمام الأنشطة المثيرة للاهتمام التمثيل الغذائي.

هذه الدراسة تسمح بتأهيل الكاتلاز و ديسموتاز الفائق كمؤشران حيويان حساسان وفعالان للدفاع، حيث يؤثر بصورة سريعة وفعالة في تقييم صحة البيئة. ورغم ذلك ينبغي بذل مزيد من الدراسة على الأنشطة الأيضية واحتياجات الطاقة.

**كلمات البحث:** مراقبة, الحيوية المتكاملة, الملوثات الدقيقة.

## **Résumé**

La catalase et le superoxyde dismutase sont toutes deux importantes du système de défense antioxydant chez les animaux contre le stress oxydant. Cette étude a pour but d'étudier l'effet d'une exposition aiguë au laboratoire pour l'échange réel de l'eau (déchet industriel), à augmenter le gradient de température sur les activités enzymatiques et le métabolisme dans la moule *Mytilus galloprovincialis*. Les résultats ont montré la perturbation du métabolisme des personnes exposées à des polluants, des eaux usées, et contrairement à l'effet de la température, et a conduit à une augmentation de l'azote et du phosphore et de la production d'ammoniac est une conséquence directe de la présence de contaminants dans le centre, est devenu une mesure d'attention aux activités intéressant métabolique.

Cette étude permet la réhabilitation de la catalase et de la superoxyde dismutase en tant qu'indicateurs vitaux et sensibles de la défense, ce qui affecte rapidement et efficacement l'évaluation de la santé environnementale. Cependant plus d'études doivent être faites sur les activités métaboliques et les réserves énergétiques.

**Mots clés :** Surveillance, Biointégrateurs, Micropolluants.

## **Abstract**

Catalase and superoxide dismutase are both important antioxidant defense systems in animals against oxidative stress. The aim of this study is to study the effect of acute exposure to the laboratory for the actual exchange of water (industrial waste), to increase the temperature gradient on enzymatic activities and metabolism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*.

The results showed disruption of the metabolism of people exposed to pollutants, sewage, and contrary to the effect of temperature, and led to an increase in nitrogen and phosphorus and ammonia production is a direct consequence of the presence of contaminants in the center, has become a measure of attention to interesting metabolic activities.

This study allows the rehabilitation of catalase and superoxide dismutase as vital and sensitive indicators of defense, rapidly and effectively affecting the assessment of environmental health. However, more studies need to be done on metabolic activities and energy reserves.

Key words: Surveillance, Biointegrators, Micropollutants.

## Liste des figures

Figure 1.1: Sources et cheminements de la pollution .....	9
Figure 1.2 : Schéma général des dommages provoqués par les espèces réactives de l'oxygène.....	17
Figure 1.3 : Anatomie de la moule (Comité National de la Conchyliculture, 2006).....	21
Figure 2.1 : Dispositif expérimental .....	27
Figure 2.2 : Planning expérimental des tests d'écotoxicité de courte durée .....	28
Figure 2.3 : Dispositif expérimental.....	29
Figure 2.4 : Procédures expérimental des dosages biochimiques.....	32
Figure 2.5 : Homogénéisation des tissus .....	33
Figure 2.6 : Centrifugation de homogénat.....	33
Figure 3.1 : Etude de l'effet conjugué de température avec la contamination par rejet industriel sur l'excrétion phosphorée.....	38
Figure 3.2 : Étude de l'effet conjugué de la température avec la contamination par le rejet industriel sur les teneurs en nitrites.....	40
Figure 3.3 : Étude de l'effet conjugué de la température avec la contamination par le rejet industriel sur les teneurs en azote ammoniacale.....	41
Figure 3.4 : Étude de l'effet conjugué de la température avec la contamination par le rejet industriel sur les teneurs en protéines dans la chaire des moules.....	43
Figure 3.5 : Variation de l'activité catalase chez la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> dans les deux groupes de test témoin et contaminé.....	44

Figure 3.6 : Variation de l'activité SOD chez la moule *Mytilus galloprovincialis* dans les deux groupes de test témoin et contaminé.....45

## LISTE DES ABREVIATION

ADN : L'acide désoxyribonucléique

AGPI : Acide Gras Polyinsaturé

C : Contaminé

CAT : Catalase

Cd : Cadmium

CE50 : Concentration Effective 50%

Cm : Centimètre

CNRDPA : Centre National de la Recherche et du Développement de la pêche et de l'Aquaculture

DDE : Dichlorodiphényldichloroéthylène

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

EAO : Espèces Réactives de L'oxygène

Ex : Exemple

Fig : figure

g : gram

GSH : Glutathion réduit

GSH-Px (G-Px) : Glutathion Peroxydase

GSSG : Glutathion oxydé

GST : Glutathion-S-Transférase

H : Heure

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Hg : Mercure

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène

L : Litre

MDA : Malondialdéhyde

mg/l : milligramme/litre

Min : Minute

ml : millilitre

N : mole/ litre

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

nm :nanomètre

NOAA : National Oceanographic and Atmospheric Administration

Pb :Plomb

PCB :Polychlorobiphényles

PH : Potential d'Hydrogène

RNB : Réseau National de Bassin

RNO : Réseau National d'Observation

ROS : Reactive Oxygen Species

S :Seconde

Sal : Salinité

SOD : SuperoxydeDismutase

S9 : Surnageant

T : Témoin

T° : Température

U : Unité d'Activité Enzymatique

U/ml : Unité d'Activité Enzymatique/ millilitre

USEPA : United States Environmental Protection Agency's

$\beta$  : Béta

C° : Celsius (degrés)

$\mu$ g : Microgramme

$\mu$ l : Micro-litre

<sup>o</sup>:Degré.

% : Pour Cent

## *Glossaire*

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

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

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

**Espèces réactives de l'Oxygène :** Espèces chimiques dérivées comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le nitroperoxyde (ONOOH) qui ne sont pas des radicaux mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs des radicaux. Désigne souvent les l'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs.

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

**Radicaux libres :** Atomes ou molécules dont une orbitale externe contient un électron non apparié. Ils sont chimiquement hyperactifs et capable d'extraire un électron des molécules voisines pour combler la vacance de leur orbitale. Ils induisent des dommages et des lésions sur l'ADN, les protéines cellulaires essentielles et les lipides membranaires et peuvent initier des réactions en cascade telle la peroxydation des lipides.

**Stress oxydatif :** déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydant en faveur de la formation des espèces réactives de l'oxygène.

## *Sommaire*

### **Résumé**

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre I: Étude bibliographique</b> .....	3
<b>I.1.Nature et origine de la pollution marine</b> .....	3
I.1.1.Les types de polluants.....	4
I.1.1.1.Les macropolluants.....	4
I.1.1.2.Les micropolluants.....	4
I.1.2.Les types de pollutions.....	5
I.1.2.1Pollution chimique.....	5
I.1.2.1.1.Les substances chimiques.....	6
I.1.2.1.2.Les substances eutrophisantes.....	7
I.1.2.1.3.Les substances organiques de synthèse.....	7
I.1.2.2.Pollutions physiques.....	8
I.1.2.3.Pollution biologique.....	8
I.1.3.Les sources de pollution.....	9
I.1.3.1.La pollution chronique.....	10
I.1.3.1.1.Ponctuels.....	10
I.1.3.1.2.Diffus.....	10
I.1.3.1.3.Intégrés.....	10
I.1.3.2.Pollution accidentals.....	10

I.2.Ecotoxicologie .....	10
I.2.1.Essais écotoxicologiques .....	11
I.2.2.Écotoxicologie chez les bivalves .....	11
I.3.Les biomarqueurs en écotoxicologie .....	12
I.3.1.Méthodologie .....	13
I.3.2.Les limites de biomarqueures .....	14
I.4.Radicaux libres, Stress oxydatif et systèmes de défenses antioxydants .....	14
I.4.1.Stress oxydant .....	16
I.4.2.Conséquences du stress oxydant .....	17
I.4.3.Implications pathologiques du stress oxydatif .....	18
I.5.Antioxydants .....	18
I.5.1.Origines des antioxydants .....	19
I.5.2.Les systèmes antioxydants (systèmes antioxydants enzymatiques) .....	19
I.5.3.La Catalase .....	20
I.5.4.La superoxydedismutase (SOD) .....	21
I.6.Présentation de la moule espèce bioindicatrice (La moule <i>Mytilusgalloprovincialis</i> ).....	21
I.6.1.Anatomie.....	21
I.6.2.Systématique.....	22
I.1.6.3.Répartition géographique .....	23
I.1.6.4.Utilisation de <i>Mytilusgalloprovincialis</i> comme espèce sentinelle.....	23

<b>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES</b> .....	26
II.1. Stratégie, démarche et dispositif expérimental .....	26
II.2.Méthodes analytiques.....	28
II.2.1.Échantillonnage.....	28
II.3. Suivi et mesure des paramètres au cours de cycle expérimentale.....	29
II.3.1. Suivi de l'excrétion azotée et phosphorée.....	29
II.3.1.1. Dosage de l'azote ammoniacal par la méthode au bleu d'indophénol.....	30
II.3.1.2.Dosage de l'azote nitreux.....	30
II.3.1.3.Dosage du phosphore.....	31
II.4.1.Préparation des échantillons tissulaires en vue des analyses des biomarqueurs.....	32
II.4.2. Dosages des protéines par la méthode de Lowry .....	33
II.4.3.Dosages de la Catalase par mode Cinétique.....	34
II.4.4.Dosages de la SOD (Méthode au Pyrogallol).....	35
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS</b> .....	37
III.1/- Paramètres physico-chimiques.....	37
III.2/- Étude de l'effet de la température et du polluant sur l'excrétion Azotée et Phosphorée (eau d'élevage).....	38
III.3/- Résultats du dosage des protéines .....	42
III.4/- Résultats du dosage de la catalase .....	44
III.5/- Résultats du dosage de la SOD .....	45
III.6/- Discussoion générale .....	46
<b>Conclusion</b> .....	49



## **Introduction :**

La superposition des deux grands antagonistes qui sont le gradient de continentalité et le gradient d'océanité, confère au littoral sa grande originalité et son importance écologique, où on lui reconnaît une forte pression d'usage. En effet, les écosystèmes littoraux sont des espaces d'intérêt majeur écologique et socio-économique. D'ailleurs, les zones intertidales et les organismes qui y résident sont tout spécialement concernés et exposés aux apports de contaminants, tant latéraux qu'en provenance des embouchures des cours d'eau.

Les polluants émis du fait de l'activité humaine (métaux, PCB, HAP, pharmaceutiques, perturbateurs endocriniens, pesticides) sont dispersés dans les différents compartiments de l'environnement, air, sols, eaux, et sont susceptibles d'atteindre aussi gravement les organismes terrestres qu'aquatiques. Cependant, tout fini par aboutir dans les eaux côtières : des pots d'échappements et cheminées rejetant les gaz acides retombant en suite sous forme de pluie acides, aux engrais contenant les nitrates et phosphates contribuant à l'eutrophisation des eaux, aux pesticides acheminés par les eaux de ruissellements, les rejets urbains qui représentent la source la plus importante de pollution, en rajoutant tous les solvants, acides et métaux lourds induisant chaque jour un déséquilibre majeur des écosystèmes marins. Les effets d'une telle perturbation peuvent se produire à différents niveaux d'organisation biologique, depuis celui des individus et des populations, jusqu'à celui de l'écosystème dans son ensemble, en passant par les assemblages d'espèces et les communautés.

La pollution marine a été traditionnellement documentée en terme de concentration chimique des contaminants ; cependant, ces mesures n'ont fourni que les évaluations des effets délétères sur les organismes vivants et sont maintenant complétées avec des critères biologiques, et particulièrement avec la mesure de biomarqueurs. Dans ce sens, plusieurs études ont accentué l'importance, ces dernières années, de l'approche intégrée de biomarqueurs dans l'évaluation de la qualité de l'environnement, pour une meilleure compréhension des voies et des mécanismes par lesquels les produits chimiques exercent leur toxicité dans les organismes marins [1]. Un biomarqueur toxicologique est défini comme la réponse biologique (biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale) qui, dans un tissu, dans les liquides corporels ou au niveau d'un organisme dans son ensemble, donne une mesure d'exposition à un toxique et/ou d'effets produits par un ou plusieurs polluants. Les biomarqueurs ont une sensibilité élevée et une spécificité aux

niveaux moléculaires et cytologiques ; ces réponses peuvent servir de détection précoce du stress antérieur avant l'affaiblissement physiologique ou l'impact environnemental. Ces biomarqueurs d'ordre supérieur, fournissent une évaluation combinée des perturbations induites par ces toxiques à des niveaux plus bas de complexité fonctionnelle et sont potentiellement les marqueurs les plus efficaces pour l'évaluation de la pollution, comme ils peuvent servir de précurseurs des effets chez les populations et communautés.

En conséquence, des suites de biomarqueurs à différentes complexités fonctionnelles (moléculaires, cytologiques et physiologiques) couplées aux mesures d'importance écologique élevée (bioindicateurs) sont recommandées dans des programmes de contrôle pour fournir une détection précoce des impacts de pollution et la pertinence environnementale[2]. Ils sont utilisés dans des études écotoxicologiques pour évaluer les effets négatifs des contaminants chez les organismes aquatiques, les bivalves en particulier [3].

Beaucoup d'organismes marins sont d'une importance immédiate pour l'homme, en tant qu'espèces comestibles et commerciales, et par conséquent, la surveillance de la concentration en polluants au niveau de la chaîne alimentaire peut prévenir des dangers pour la santé humaine. D'ailleurs, la réponse des organismes vivants soumis à l'agression toxique constitue le point central des stratégies de dépistage. A notre connaissance, les organismes médiolittoraux tels que la moule, la patelle, l'oursin, ...) subissent un stress physiologique considérable et les conséquences potentielles en terme de bioaccumulation, biotransformation et effets toxiques des polluants, ont été largement étudiés et font l'objet de préoccupation de nombreux organismes de recherche et de biosurveillance environnementale. Parmi les espèces sensibles à la contamination de leur biotope : les moules *Mytilus galloprovincialis* Celles-ci restent d'excellentes espèces sentinelles pour la détection d'éventuelles perturbations biologiques subtotaux et sont d'ailleurs, intensivement utilisées dans les programmes de surveillance environnementale. Les polluants représentent un ennemi mortel, non pas des moules mais des consommateurs, car ces Mollusques supportent à merveille les conditions les plus hostiles de l'environnement. Le développement des biomarqueurs pour la détection de polluants et l'évaluation des effets des toxiques peuvent servir à extrapoler l'effet des agressions chimiques sur la santé humaine.

Les moules dont *Mytilus galloprovincialis* et d'autres bivalves marins sont couramment utilisées comme espèces sentinelles pour la biosurveillance des milieux côtiers à travers le monde en raison de leurs caractéristiques qui font d'eux de bons bioindicateurs[4].

Dans cette optique de biomonitoring, le Centre National de la Recherche et du Développement de la pêche et de l'Aquaculture CNRDPA, Bou-Ismaïl développe actuellement un programme de gestion des écosystèmes aquatiques et de surveillance environnementale et contribuant ainsi aux recherches des indicateurs de pollution.

Ce travail se veut une étude du biomarqueur catalase et superoxydodismutase autant que réponse biologique à un stress induit par une exposition aiguë au rejet industriel chez la moule *Mytilus galloprovincialis* dans un but global d'essai d'adoption d'une technique rapide et susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de santé de la baie de Bou-Ismaïl de la wilaya de Tipasa.

Ce travail est structuré en trois chapitres et présenté comme suit :

- Le premier chapitre se veut une synthèse bibliographique des notions le stress oxydant, les biomarqueurs, la surveillance et principalement la catalase qui fera l'objet de cette étude.
- Le deuxième chapitre sera consacré au matériel utilisé de même que les différentes analyses effectuées lors de la réalisation de nos expérimentations
- Le troisième chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus, au cours de nos expérimentations ainsi que leurs discussions.

Une synthèse sur l'utilité de l'utilisation de la catalase et superoxyde dimutase ainsi que des perspectives concluront ce travail.

## CHAPITRE I

### PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

#### **I.1.Nature et origine de la pollution marine :**

Une substance d'origine anthropique rejetée dans le milieu est un contaminant, si elle exerce des effets défavorables sur le plan biologique, il s'agit alors d'un polluant [5]ou d'un xénobiotique[6]. Ce dernier terme désigne toute substance qui n'existe pas à l'état naturel et qui se caractérise par une forte toxicité à des faibles concentrations [7]. Les contaminants rejetés dans l'environnement finissent par se retrouver plus ou moins rapidement dans les milieux aquatiques, en particulier estuariens et côtiers, où ils peuvent avoir des effets à court et à long terme[8].

#### **I.1.1.Les types de polluants :**

Le polluant, tout agent physique, chimique ou biologique dans un hydrosystème, qui y provoque, par sa concentration dans l'eau, des perturbations préjudiciables au bon équilibre de l'écosystème et en réduit les possibilités d'usages de l'eau.

Le comportement dans l'environnement d'une substance est difficile à appréhender car il dépend de ses propriétés et de la nature du milieu dans lequel elle se trouve. Par exemple, sa capacité à se retrouver dans l'atmosphère dépend à la fois de son degré de volatilité et de sa solubilité dans l'eau [9].Selon *Mouchel J-M* on distingue :

#### **I .1.1.1.Les macropolluants:**

Ce sont des molécules naturelles qui se trouvent dans l'environnement à des concentrations différentes de celles habituellement observées, ce qui entraîne une augmentation de la cinétique des réactions biochimiques.

### **I.1.1.2.Les micropolluants:**

Produit actif minéral ou organique susceptible d'avoir une action toxique à des concentrations infimes (de l'ordre du  $\mu\text{g/l}$  ou moins).

Les micropolluants sont susceptibles de contaminer les différents compartiments eau/air/sol puisqu'ils sont directement introduits au sein même de l'écosystème.

Les mécanismes de transfert de ces polluants, depuis leur émission et les zones de traitement jusqu'aux sols, aux eaux de surface et aux eaux souterraines, font intervenir leur cycle de vie couplé au cycle de l'eau.

Par leurs propriétés intrinsèques, les micropolluants sont dangereux. L'intensité et la durée de leur présence dans les eaux (facteurs d'exposition) conditionnent le risque pour les milieux aquatiques et les écosystèmes, ainsi que pour la santé humaine.

Ces polluants, en raison même de leur impact sur le milieu, font de plus en plus l'objet d'un suivi régulier. Cependant, leur détection dans les cours d'eau est difficile, en raison de la multiplicité des substances, la variabilité des contaminations et leur très faible concentration[9].

### **I.1.2.Les types de pollutions:**

La plupart du temps, un rejet n'est jamais une source unique et les différents types de pollution sont mélangés et agissent les uns sur les autres (effets de synergie). Ainsi, un égout rejette des déchets organiques, des détergents dont certains s'accompagnent de métaux lourds (pollution chimique), des micro-organismes (pollution biologique), le tout dans de l'eau douce (pollution physique) [11].

#### **I.1.2.1Pollution chimique :**

Il existe une centaine d'éléments rassemblés selon leurs propriétés dans le tableau de Mendeleïev, connu de tous les chimistes. Une fois assemblés, ces éléments donnent des molécules ou "substances". L'homme en a identifié des millions, naturels ou synthétisés dont une centaine de milliers est utilisée pour préparer des mélanges qui se retrouvent dans l'industrie ou chez le consommateur.

Ces préparations concourent, directement ou indirectement, à notre confort, mais une partie inutilisée ou transformée se retrouve sous forme de déchets, à l'origine de la pollution des milieux aquatiques

#### **I.1.2.1.1. Les substances chimiques :**

Il est admis qu'il existe plus de 4 millions de substances chimiques, essentiellement des substances organiques issues de la biosynthèse animale et végétale [13].

Aujourd'hui, on estime qu'il y a plus de 100000 produits chimiques qui sont utilisés régulièrement dans l'industrie et qui sont des contaminants et polluants potentiels de l'écosystème global. Environ 2000 produits chimiques sont transportés par voie maritime, en vrac ou en colis.

Les substances chimiques toxiques sont rejetées dans l'environnement de deux manières: soit directement, lorsqu'elles sont utilisées comme telles par l'homme. C'est le cas des pesticides, des fertilisants et des différents solvants. Mais ces substances peuvent aussi être rejetées indirectement sous forme de déchets industriels provenant de diverses activités comme l'extraction minière, la fabrication industrielle, l'incinération, la consommation de carburants ou les rejets accidentels [10]. Ces substances peuvent être classées en quelques grandes catégories comme suite [14, 15]:

##### ➤ **Les métaux :**

Les plus toxiques pour l'environnement sont le mercure, le cadmium, le plomb, le zinc, le cuivre, le nickel, l'argent. Les sources de contamination sont multiples : les activités minières, la sidérurgie, le transport (plomb). On les retrouve dans les piles, les batteries, comme adjuvants dans les peintures et colorants, ainsi que dans les engrais phosphorés (cadmium).

##### ➤ **Les hydrocarbures :**

Les hydrocarbures que l'on retrouve dans les pétroles bruts (la base de notre consommation énergétique est estimée à environ 86 millions de tonnes/an) et les produits raffinés sont utilisés comme carburants (essences, kérosènes, fuels domestiques, fuels lourds, etc.) et produits de base de la synthèse organique industrielle. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), qui résultent de la combustion incomplète des produits pétroliers,

sont les plus préoccupants pour les milieux aquatiques. Les émissions dans l'atmosphère d'HAP sont estimées à plusieurs milliers de tonnes.

➤ **Les pesticides :**

Les pesticides ou produits phytopharmaceutiques recouvrent principalement les herbicides, les fongicides et les insecticides. Ils incorporent quelques 900 matières actives. Ces produits sont essentiellement issus de la synthèse organique bien que l'on retrouve certains produits minéraux comme le soufre ou le sulfate de cuivre. De grandes quantités sont épandues chaque année par les agriculteurs, les particuliers.

➤ **Les biocides :**

Les biocides représentent une large famille de substances chimiques actives utilisées dans un cadre non phytopharmaceutique. L'utilisation de peintures antisalissure sur la coque des navires provoque une contamination non négligeable par différentes matières actives métalliques (cuivre), organométalliques (tributylétain, TBT) ou organiques (diuron, irgarol 1057).

**I.1.2.1.2. Les substances eutrophisantes :**

Les substances eutrophisantes ne peuvent être considérées comme contaminants chimiques en termes de substances toxiques. Les rejets d'azote et de phosphore dans les milieux aquatiques peuvent provoquer le développement excessif d'organismes végétaux dans les eaux de surface, conduisant à des phénomènes d'eutrophisation que l'on observe dans les eaux continentales ainsi que dans les eaux marines littorales.

**I.1.2.1.3. Les substances organiques de synthèse :**

Les substances organiques de synthèse représentent un très grand nombre de substances. Il comprend les solvants chlorés, les agents diélectriques utilisés dans les transformateurs et condensateurs électriques (Pyralène ou PCB), les phtalates, détergents, colorants.

Les substances les plus préoccupantes pour l'environnement sont les substances organochlorées aux formes très diverses : solvants, PCB, chlorobenzènes, chlorophénols, chloro-alcanes, ainsi que les substances bromées comme les retardateurs de flamme. Il convient de préciser que les dioxines et furanes (PCDD/F) ne sont pas des substances produites par l'industrie chimique mais résultent essentiellement de la combustion plus ou moins complète de substances organochlorées.

#### **I.1.2.2. Pollutions physiques :**

On parle de pollution physique lorsque le milieu marin est modifié dans sa structure physique par divers facteurs. Il peut s'agir d'un rejet d'eau douce qui fera baisser la salinité d'un lieu (par une centrale hydroélectrique), d'un rejet d'eau réchauffée ou refroidie (par une centrale électrique ou une usine de regazéification de gaz liquide), d'un rejet liquide ou solide de substances modifiant la turbidité du milieu (boue, limon, macro déchets...), d'une source de radioactivité [11].

Cependant, le rejet de chaleur dans l'environnement constituant de nos jours une forme de pollution physique du milieu naturel capable de provoquer de vrais bouleversements, car d'un point de vue écologique, il existe un paramètre incontournable qui est la température du milieu. Or, dans certains pays industrialisés, l'augmentation de température en aval des centrales électriques peut atteindre 7 à 8°C, ce qui engendre une modification totale des communautés aquatiques et de leurs modes de fonctionnement [12].

#### **I.1.2.3. Pollution biologique:**

Il peut s'agir de pollution par des micro-organismes (bactéries, virus, champignons) provenant des égouts qui peuvent proliférer à leur arrivée dans le milieu marin, même s'il est vrai qu'il s'agit d'un milieu qui ne favorise pas la vie de la plupart des agents pathogènes [11].

Cette pollution peut résulter du rejet dans les eaux continentales ou littorales d'une grande variété de substances organiques fermentescibles d'origines diverses (effluents urbains, matières fécales, industries, élevages,...) et se traduit par une forte contamination bactériologique. Elle soulève dans bien des cas, de redoutables problèmes d'hygiène publique:

Qualité des eaux potables, salubrité des plages, qui ne sont pas limités aux seuls pays du tiers monde. Cette extension incessante de la pollution microbiologique des eaux

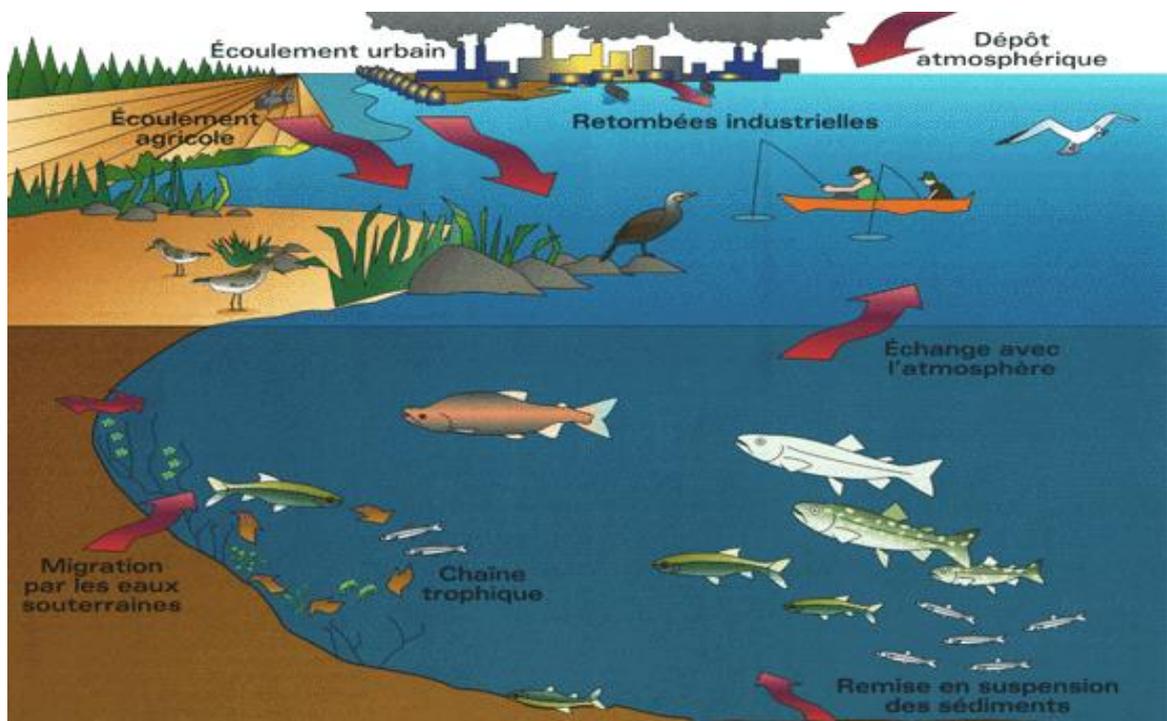
Continentalles et littorales à pour conséquence une recrudescence d'affections pathogènes (colibacilles, hépatites, virus entériques,...) [12].

Il peut également s'agir de l'introduction d'une espèce marine dans une zone où elle est normalement absente et dans laquelle elle a un impact non négligeable (ex : la caulerpe : *Caulerpataxifolia*) [11].

### **I.1.3. Les sources de pollution :**

La majeure partie des polluants rejetés dans l'environnement parvient au milieu marin, soit indirectement par les rivières, le ruissellement ou l'atmosphère, soit directement par les rejets à la mer d'origine urbaine, agricole, ou industrielle [16]. Or, la capacité naturelle des zones côtières à disperser et assimiler les polluants est limitée [17].

Cependant, l'émotion légitime suscitée par les conséquences d'une pollution accidentelle en milieu marin ne doit pas masquer la situation de fond constituée par les apports de pollution chronique d'origine multiple [13] (**Figure 1**)



**Figure 1.1 : Sources et cheminements de la pollution marine[18, 19].**

### **I.1.3.1.La pollution chronique :**

Cette pollution est régulière dans le temps. Le milieu aquatique récepteur doit lutter au quotidien contre ce type de pollution. Ces apports sont multiples soit:

#### **I.1.3.1.1.Ponctuels :**

Concentrés sur une faible superficie, elles sont relativement faciles à identifier, à mesurer et à traiter [20]. Elles proviennent soit d'un déversement permanent ou intermittent plus ou moins conscient, soit d'un événement exceptionnel imprévisible. Elles sont issues par exemple des rejets industriels, rejets urbains. Ces apports engendrent une pollution des milieux aquatiques directement ou par entraînement des substances par ruissellement, drainage ou érosion. Le ruissellement peut entraîner les micropolluants sous forme dissoute, en suspension ou adsorbés sur les sédiments [9].

#### **I.1.3.1.2.Diffus :**

Corresponds à l'infiltration d'eau polluée en faible concentration sur des superficies étendues, leurs mesures et leurs traitements posent donc problèmes particulièrement ardues [20]. La pollution diffuse provient notamment des activités agricoles, mais également du ruissellement après les pluies ou du transport atmosphérique.

#### **I.1.3.1.3.Intégrés :**

Constitués des apports d'eau douces qui proviennent des fleuves, et qui sont chargés par les différents types de polluants [20,19].

Sans oublier les contaminations liées à l'usage du milieu (rejet des sédiments de dragage) et de la navigation maritime (déballastages frauduleux des navires, apports diffus des biocides incorporés dans les peintures antisalissure) [21].

### **I.1.3.2.Pollution accidentals :**

Cette pollution est exceptionnelle. Elle peut avoir des conséquences irréversibles sur la faune et la flore. Elle intervient essentiellement sur les sites industriels et au cours du transport des matières dangereuses tel que les hydrocarbures, les produits chimique et radioactifs. [20].

## **I.2.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 [22]. Elle regroupe des études physico-chimiques et biologiques, permettant de décrire le milieu étudié et de définir son niveau de contamination [22, 23]. Récemment, Emilien Pelletier [22], 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.

### **I.2.1.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 [24, 25]. 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 [26, 22].

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 [27]. 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 [28, 27, 29]. Plusieurs espèces de mollusque bivalves sont utilisées dans les études de toxicologie de l'environnement comme *Dreissenapolyomorpha*[30], *Pyganodongrandis*[22], *Mytilusedulis*[25], *Mytilusgalloprovincia*

*lis*[31,32],*Pernaviridis*[33], *Pernaperna*[28], *Ruditapesdecussatus*,  
*Cerastodermaglaucum*et*Cerastodermaedule*[34].

### **I.2.2.Écotoxicologie chez les bivalves :**

Différents programmes de recherches ont été développés pour comprendre les impacts anthropiques sur l'environnement. Différentes études écotoxicologiques ont vu le jour, recueillant à la fois des informations sur l'écologie, mais également sur les effets toxicologiques de différentes perturbations anthropiques sur l'environnement et les organismes [35]. Les perturbations environnementales peuvent alors être suivies (biomonitoring) et leurs impacts mesurés à l'aide d'espèces bioindicatrices (sentinelles) et de différents biomarqueurs[27, 36]. Un organisme sentinelle est une espèce sensible aux stress environnementaux et anthropiques permettant d'évaluer, à l'aide de biomarqueurs, la qualité de l'environnement dans lequel elle vit. Les perturbations observées chez ces espèces peuvent être physiologiques ou comportementales et peuvent même entraîner la disparition de l'espèce d'intérêt [37]. Le biomarqueur doit permettre d'évaluer et de comprendre les perturbations biologiques, biochimiques, physiologiques et histologiques [38,37] provoquées par différents facteurs de stress qu'ils soient naturels ou anthropiques [39]. Les études de biomonitoring doivent utiliser plusieurs biomarqueurs afin d'avoir le meilleur aperçu des impacts potentiels et de faciliter leur compréhension [40, 41,42].

Depuis l'élaboration du programme « Mussel Watch » par Goldberg en 1975, l'utilisation des mollusques bivalves est répandue afin de suivre l'amélioration ou la dégradation de l'environnement et d'en étudier les impacts biologiques et physiologiques [43]. Puisque la majorité des bivalves se nourrissent de la matière en suspension, ceux-ci doivent filtrer de très grand volume d'eau quotidiennement et par le fait même, peuvent ingérer de grande quantité de contaminants [44, 43,45]. Leur mode de vie sessile et grégaire, leur abondance et leur grande distribution en font une espèce facile à récolter pour étudier les Effets de divers xénobiotiques[46, 43, 45]. Les bivalves sont de bon bioindicateurs de la contamination, puisqu'ils ont la capacité de d'accumuler et de concentrer les différents composés chimiques [47, 48,45]. La bioaccumulation de ces xénobiotiquesvarient en fonction de leurs propriétés chimiques donnant une bonne indication leur biodisponibilité dans l'environnement [46,45]. Les bivalves sont reconnus pour être un bon modèle expérimental puisque leur réaction face à la présence d'un contaminant est relativement constante. En plus de leur accessibilité sur le terrain, il est possible d'obtenir des individus

provenant d'aquaculteur. Il est ainsi possible d'avoir des organismes sains pour différentes études contrôles et de les transplanter (encager) dans des sites pollués. Ces organismes peuvent être utilisés pour évaluer l'effet de différents composés chimiques en laboratoire, que ce soit par des expositions in vivo ou in vitro [46,49].

L'acquisition de connaissances sur le type et le taux de contamination ont permis d'analyser les risques qu'ils représentent à différents niveaux physiologique (immunitaire, reproductif et génétique) [50,51,52,53,54] D'ailleurs, le système immunitaire des bivalves est reconnu pour être particulièrement sensible à la présence de xénobiotiques et aux différents stress environnementaux [55,56,57,58,59].

### **I.3. Les biomarqueurs en écotoxicologie :**

Les biomarqueurs sont des utiles mises en œuvre pour établir un diagnostic de risque environnemental. Leur usage et leur intérêt, notamment dans la détermination du risque de la pollution.

Le terme biomarqueur se réfère à tous les paramètres biochimiques, cellulaires, physiologiques, ou comportementaux qui peuvent être mesurés dans les tissus ou les fluides d'un organisme ou sur l'organisme entier, pour mettre en évidence l'exposition à, ou les effets d'un ou plusieurs contaminants [60]. Contrairement au domaine de la santé humaine où des biomarqueurs sont également utilisés, nous n'incluons pas les mesures dans les tissus des contaminants chimiques eux-mêmes et/ou de leurs métabolites. En réponse à un stress, dont un polluant, l'organisme peut être directement perturbé ou va tenter de s'adapter par une série de mécanismes biologiques.

Ainsi les biomarqueurs mesurés sur un organisme (au niveau infra cellulaire, cellulaire ou tissulaire) peuvent être interprétés comme une réponse adaptative à un stress, telle qu'une pression toxique, ou encore comme un signal d'alerte d'apparition ultérieure de perturbations de fonctionnement de l'organisme, voire de sa population.

#### **I.3.1. Méthodologie :**

Les informations apportées par la mesure de biomarqueurs sur le terrain peuvent concerner des effets systématiques, générés par des causes multiples (contaminants chimiques, stress biologiques, ressources trophiques, température hypoxie ...).

Différentes stratégies peuvent être mises en œuvre pour la mesure de l'exposition et de l'impact de polluant sur les organismes à l'aide de biomarqueurs, d'une part des mesures

sur les organismes autochtones (poissons, bivalves et gastéropodes, crustacés), ou prélevés sur des substrats artificiels (tels que des supports colonisés par le périphyton), d'autre part des mesures sur des organismes artificiellement (encagés) dans le milieu.

La mise en œuvre d'organismes encagés ou prélevés sur supports introduits permet en particulier d'utiliser des individus connus (âge, provenance, maturité sexuelle...) et de standardiser la durée d'exposition, ce qui facilite la comparaison entre organisme contrôle et exposer.

Certain biomarqueurs peuvent contribuer à caractériser le type de contamination chimique. Ils sont généralement classés en biomarqueurs d'exposition, lorsqu'ils signalent l'activation de mécanismes de régulation intrinsèques au métabolisme de l'organisme (qui jouent alors un rôle de système d'adaptation et de défense), ou en biomarqueurs d'effet, qui diagnostiquent un dépassement, éventuellement transitoire des capacités de régulation de l'organisme avec des conséquences sur la viabilité (cellule, tissu, individu).

### **I.3.2. Les limites de biomarqueurs :**

A l'instar de leur utilisation chez l'homme pour évaluer un risque vis-à-vis de la santé, plusieurs auteurs proposent l'intégration des biomarqueurs dans les démarches d'évaluation du risque environnementale tandis que d'autres mettent l'accent sur leur limites[61] : en effet, si pour la santé humaine, le risque doit être quantifié pour une espèce, l'homme et l'individu, à l'inverse, le risque pour l'écosystème devra être établi pour une multitude d'espèces, à partir d'informations sur une quelques espèces, et non seulement pour l'individu, mais également pour la population.

Les principales limitations des mesures de biomarqueurs pour l'évaluation de la qualité des écosystèmes sont ainsi la difficulté à discriminer entre réponse adaptatives <<naturelles>> et réponses aux stress chimique, à explorer des réponses d'une échelle d'organisation biologique à une autre (cellule-individu-population-communauté) et d'une espèce à une autre.

Le manque de connaissances sur la biochimie, la physiologie et le comportement des organismes aquatiques sentinelles utilisés, sur l'amplitude des réponses attendues dans un contexte physiologique normal, limitent en effet souvent l'intérêt des biomarqueurs comme signature (signal d'alarme) d'un stress pouvant être du à des causes biotiques ou abiotiques, d'origine naturelle ou anthropogénique.

### **I.4. Radicaux libres, Stress oxydatif et systèmes de défenses antioxydants :**

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (EAO) [62]. Les radicaux libres sont électriquement neutres ou chargés (ioniques) et comprennent l'atome d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée), etc. (**Tableau 1**).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques très instables qui jouent un rôle dans l'action de certains traitements anticancéreux, de même qu'à l'origine du vieillissement.

Leur structure comprend un électron célibataire qu'ils cherchent à appairer en attaquant et en endommageant les molécules voisines. L'appellation « dérivés réactifs de l'oxygène » n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), peroxyde d'azote (ONOO) [63].

- l'anion superoxyde: O<sup>•-</sup>. La molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde. Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions.
- le radical hydroxyle: OH<sup>•</sup>. Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique.
- le radical peroxyde: ROO<sup>•</sup>.
- l'oxygène singulet : forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité.

**Tableau 1:** Principaux radicaux libres et leur structure chimique [63].

Radicaux libres (nomenclature)	Structure chimique
Radical hydroxyle	OH <sup>•</sup>
Radical hydroperoxyde	HOO <sup>•</sup>
Radical peroxyde	ROO <sup>•</sup>
Radical alkoxyde	RO <sup>•</sup>
Peroxyde d'hydrogène*	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Peroxynitrite	ONOO•
Anion superoxyde	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>

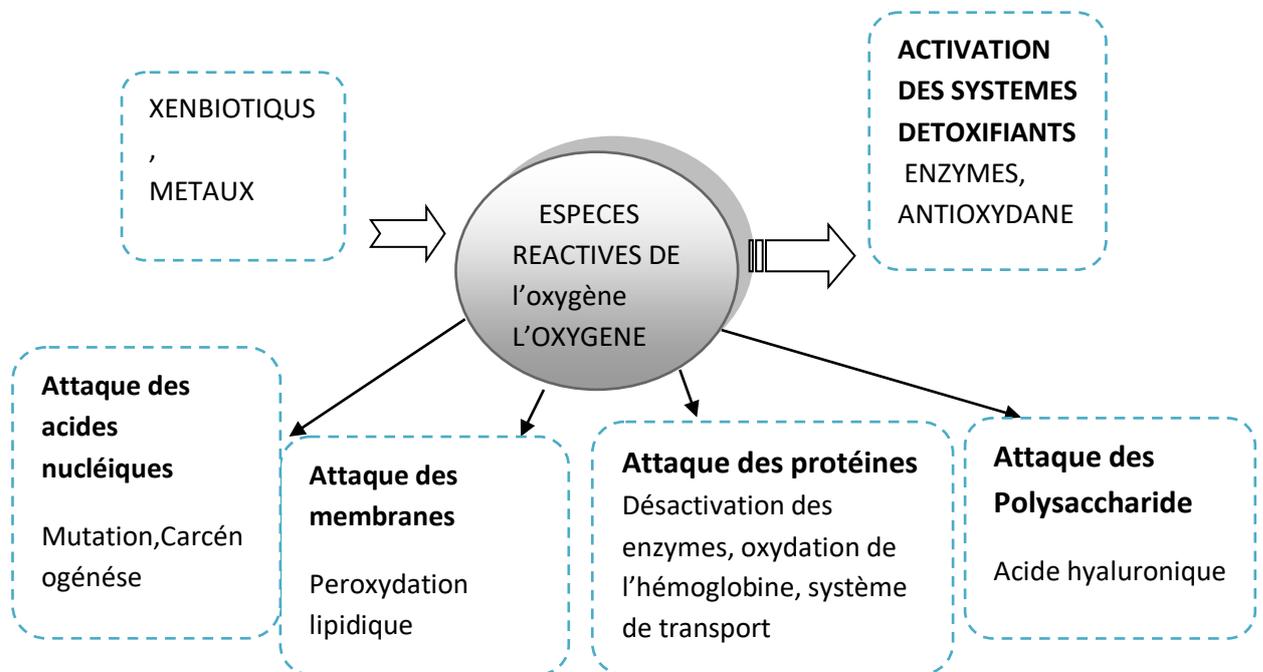
#### **I.4.1.Stress oxydant :**

L'origine du stress oxydant chez les organismes aérobies provient de la consommation intracellulaire de la molécule d'oxygène qui est essentielle pour de nombreuses fonctions physiologiques mais qui génère dans le même temps la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou « ReactiveOxygenSpecies » (ROS) qui sont potentiellement toxiques pour la cellule. Le terme d'espèces réactives de l'oxygène inclut les différentes formes actives de l'oxygène (comme le radical hydroxyle (OH•) ou l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)) et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ainsi que les espèces radicalaires qui peuvent en être les initiateurs [64, 65,66, 67, 68, 69].

La réactivité des ROS, peut être à l'origine d'effets biologiques néfastes. Toutefois, la formation d'espèces réactives ne s'accompagne pas systématiquement de phénomènes de toxicité. En particulier, certaines espèces réactives sont des intermédiaires de processus physiologiques normaux (respiration cellulaire ou les phénomènes inflammatoires)[69, 70].Ainsi, les cellules des êtres aérobies, en état d'oxydoréduction normal, ont une concentration basale en radicaux libres de l'oxygène non nulle. Du fait de leur très grande réactivité, ces dérivés de l'oxygène peuvent réagir avec la plupart des composés cellulaires. Le contrôle rigoureux de leur formation et de leur élimination par le biais de différents systèmes antioxydants préserve donc les cellules de leurs effets délétères [64, 67, 68, 69]. Par ailleurs, les polluants chimiques sont d'importants producteurs de ROS. En effet, les xénobiotiques connus pour leurs propriétés redox comme les quinones, les métaux de transition, les colorants diazoïques, les herbicides bipyridyles et les composés aromatiques nitrés induisent la formation de radicauxsuperoxydes[64].

On définit le stress oxydant lorsque la formation des ROS excède les capacités de défense du système antioxydant. Au niveau cellulaire, il se traduit par l'altération et plus particulièrement l'oxydation des composants tels que l'ADN, les protéines et les lipides et par une perturbation généralisée de la balance redox (ratios GSH/GSSG et NADH/NAD<sup>+</sup>).

Ses effets cytotoxiques se traduisent par des perturbations structurales et fonctionnelles comme des inhibitions enzymatiques, des dégradations des protéines, de la peroxydation lipidique, des processus inflammatoires et des phénomènes de mort cellulaire (fig 3) [71, 72, 73, 74].



**Figure 1.2:** Schéma général des dommages provoqués par les espèces réactives de l'oxygène (d'après [71]).

#### **I.4.2. Conséquences du stress oxydant :**

Les radicaux libres sont responsables de dommages sur toutes les molécules biologiques comme les lipides, les protéines, les acides nucléiques, ou les hydrates de carbone [62]:

Au niveau de l'ADN, les radicaux libres peuvent induire des effets oxydatifs et mutagènes ou un arrêt des réplifications. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brins [75].

Les lipides sont une cible privilégiée des radicaux libres. Ceux-ci provoquent en effet l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) des phospholipides membranaires (principaux constituants des membranes des cellules), mais aussi des organites cellulaires et des noyaux. Ce phénomène est appelé peroxydation lipidique ou lipopéroxydation aboutissant à la formation de LDL oxydées qui sont captées par des macrophages,

formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux [62].

Les radicaux libres peuvent aussi agir sur les macromolécules en provoquant des inactivations enzymatiques, des fragmentations de ces molécules (collagène, protéoglycannes, acide hyaluronique) et la formation de dimères ou d'agrégats protéiniques dans les membranes cytoplasmiques[75].

#### **I.4.3.Implications pathologiques du stress oxydatif :**

En raison de leur réactivité élevée, les espèces réactives interagissent avec toute une série de substrats biologiques conduisant à l'altération de l'homéostasie cellulaire de l'organisme. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine de phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré.

En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine) . Cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardio vasculaires, maladie de Parkinson, les inflammations gastro-intestinale, ulcères, les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau[76].

#### **I.5.Antioxydants :**

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi

toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive [75]. Ils agissent en formant des produits finis non radicaux, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur. En même temps, les antioxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable [63].

### **I.5.1.Origines des antioxydants :**

Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories:

- les enzymes antioxydants directement synthétisées par l'organisme.
  - les nutriments antioxydants dont les apports sont nécessaires par l'alimentation.
- Cette dernière classe d'antioxydants nous intéresse particulièrement puisque nous verrons s'il est possible de renforcer les défenses de l'organisme en augmentant les apports exogènes de ces différentes molécules.

### **I.5.2.Les systèmes antioxydants (systèmes antioxydants enzymatiques) :**

Un système de défense primaire: composé d'enzymes et de substances anti oxydantes

- Lesuperoxydedismutase (SOD) : diminue la durée de vie de l'anion superoxyde  $O_2\cdot$ .
- La catalase : transforme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en simple molécule d'eau
- La glutathion peroxydase (GPx) : détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques
- Les molécules piègeurs : le glutathion (GSH), l'aide urique, les protéines à groupement thiols, ubiquinone, ...etc.

Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.

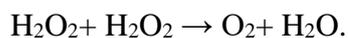
Un système de défense secondaire: composé d'enzymes protéolytiques, des phospholipases, des ADN endonuclease et ligase, des macroxyprotéinases.

**Exemple :** les tocophérols. Ces molécules sont dites « chainbreaking ». Elles réagissent avec les ROO° et/ou les R°, bloquant ainsi les réactions de propagation. Ce type d'antioxydant permet d'éviter le passage de formes peu réactives (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) à très réactives (OH°).

### **1.5.3.La Catalase :**

La catalase est une enzyme appelée conventionnellement (EC 1.11.1.6) présente au niveau des peroxysomes, c'est une hémoprotéine tétramérique dont chaque sous unité

contient un groupement héminique avec Fe<sup>3+</sup> lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH, H<sup>+</sup> qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène. La dissociation des sous unités résulte d'une perte de l'activité catalase. C'est une enzyme importante dans le système de défense antioxydant protégeant les organismes contre un stress oxydatif. Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



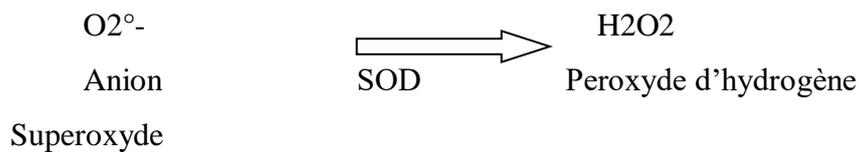
Les peroxysomes sont des organites cellulaires qui ont des rôles très importants en particulier dans le métabolisme des ROS, la catalase est l'une des enzymes majoritaires,

cependant ils contiennent beaucoup d'autres enzymes qui génèrent l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tel que les Flavioprotéines déshydrogénases .les mitochondries (du foie) et les réticulum endoplasmiques ne contiennent que peu d'enzyme catalase, les peroxydes d'hydrogène

produits à leurs niveaux ne seront pas décomposés que s'ils diffusent aux peroxysomes [77,78,79, 64,80]. La catalase protège les cellules contre les effets délétères des radicaux libres en maintenant les ROS endogènes à des niveaux relativement faibles, et atténuant ainsi les dommages liés à leur grande réactivité[4]. La catalase est un biomarqueur moléculaire de stress oxydant qui est très utilisée chez les organismes aquatiques afin d'évaluer les effets des xénobiotiques organiques et minéraux en conditions expérimentales ou naturelles.

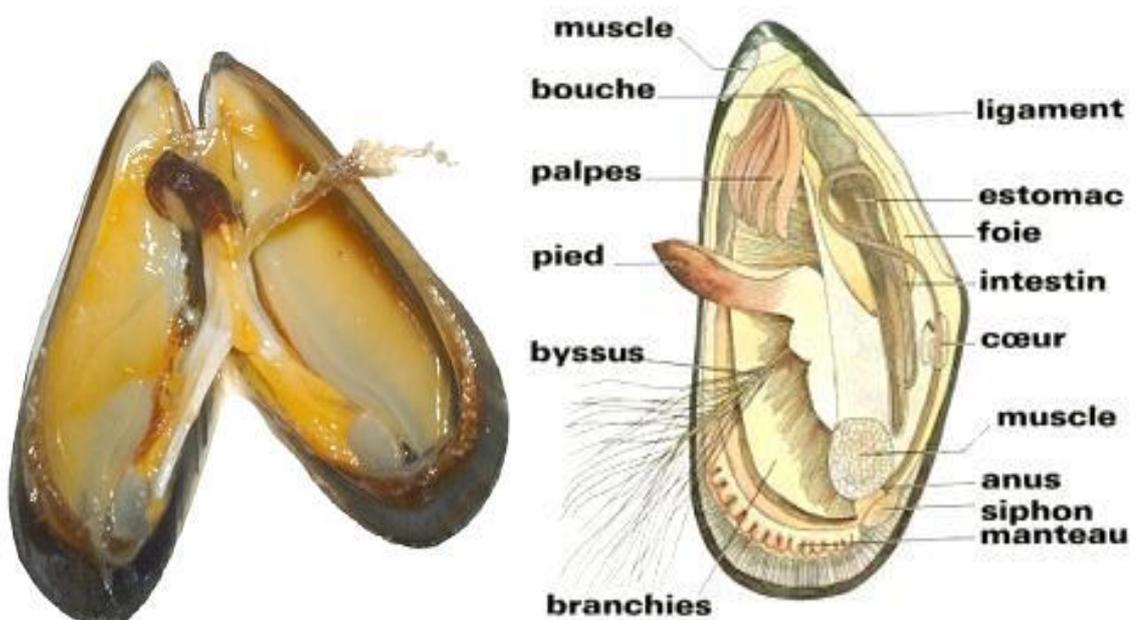
#### **I.5.4. La superoxydedismutase (SOD) :**

La superoxydedismutase est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation de l' $O_2^{\circ-}$  en  $H_2O_2$ .



#### **I.6. Présentation de la moule espèce bioindicatrice (La moule *Mytilus galloprovincialis*)**

##### **I.6.1. Anatomie :**



**Figure 1.3 : Anatomie de la moule [81]**

**I.6.2. Systématique:**

- **Embranchement :** *Mollusques*
  - **Classe :** *Bivalves (Lamellibranches)*
  - **Sous classe :** *Ptériomorphes*
  - **Ordre :** *Mytiloidés (Hétéromyaires)*
  - **Famille :** *Mytilidées (Pélecypodes)*
  - **Genre :** *Mytilus*
  - **Espèce :** *galloprovincialis*
- **La branchie :** organe à la fois impliqué dans les processus de respiration et d'alimentation car jouant le rôle d'un filtre permettant la capture de plancton de taille spécifique puis leur transfert vers le tube digestif.
  - **Le muscle :** la fermeture générale des valves est assurée par deux muscles adducteurs (antérieur et postérieur). Ces muscles sont antagonistes du ligament, qui grâce à son élasticité assure l'ouverture de la coquille.
  - **La glande digestive :** elle assure la digestion et l'absorption des aliments captés par la branchie. Cet organe est encore appelé hépatopancréas car il joue chez cet invertébré un rôle analogue au foie des Vertébrés [82].
  - **Le manteau :** organe enveloppant l'ensemble de la masse animale et assumant à la fois la sécrétion de la coquille et le rôle de support des gonades.

- **Des cellules du « sang »** appelées **hémocytes**: Il s'agit de cellules circulant dans l'hémolymphe et présentant des caractéristiques de certains leucocytes des Vertébrés. Cellules totipotentes, elles interviennent dans les processus de régénération de la coquille et des tissus en cas de blessure et participent à la protection sanitaire (immunité non spécifique) en phagocytant de petites particules et des micro-organismes [83].
- **L'hémolymphe** : une fois éliminés les hémocytes, c'est l'équivalent du plasma des Vertébrés. Chez la moule, ce compartiment correspond essentiellement du point de vue de sa composition saline à l'eau de mer environnante [84]. Il contient aussi quelques protéines et des lipides, circulant sous forme de globules ou de vésicules [85].

#### **I.1.6.3. Répartition géographique :**

L'espèce *M. galloprovincialis* rencontre sur les côtes Atlantiques du sud de l'Irlande et la Cornouaille, sur les côtes Atlantiques de l'Europe et de l'Afrique du Nord, sur le littoral de la Méditerranée à l'exception du sud de la Méditerranée orientale et sur les côtes de l'Adriatique et de mer noire.

#### **I.1.6.4. Utilisation de *Mytilus galloprovincialis* comme espèce sentinelle :**

Les Invertébrés, en particulier les Mollusques bivalves, tels que les moules (*Perna perna*, *Mytilus galloprovincialis*) sont des organismes très appropriés pour étudier les effets biologiques des polluants. Ils ont été étudiés physiologiquement dans le domaine de l'aquaculture et répondent aux critères de sélection d'espèce cible pour des applications de surveillance.

Les mytilidés sont un groupe de faune occupant des habitats dynamiques, des habitats d'estuaires et sont adaptés aux environnements naturellement stressants. Les moules étant sédentaires, sont passivement exposées aux polluants environnementaux et ne succombent pas habituellement à la toxicité aigüe mortelle [2]. Elles accumulent certains composés xénobiotiques de façon passive et selon un certain équilibre avec la contamination du milieu [86], avec un facteur de concentration de  $10^3$  à  $10^5$  [87]. La biotransformation est

souvent considérée comme faible et relativement lente ; de ce fait, la contamination chimique des Mollusques reflète assez bien la contamination du milieu [86]. Elles sont considérées comme étant des **bioindicateurs** fortement utiles, car elles reflètent des conditions d'emplacements spécifiques et accumulent beaucoup de contaminants à des niveaux considérablement plus haut par rapport aux concentrations présentes dans l'eau, fournissant de ce fait, une indication de la concentration biologiquement disponible ; elles sont employées intensivement pour surveiller la qualité de l'eau dans les environnements côtiers et les estuaires [2].

Les moules sont les conducteurs filtreurs intertidaux, connues pour accumuler des niveaux élevés d'oligo-métaux et de composés organiques dans leurs tissus, fournissant une indication intégrée par temps de contamination de l'environnement avec des réponses cellulaires et physiologiques observables. Ces caractéristiques font d'elles de bonnes candidates pour le contrôle de l'environnement depuis le programme « *Mussel Watch* » de 1970 [88].

Elles sont donc considérées comme des organismes de biosurveillance aquatique idéale et ont été déployées dans des programmes de biosurveillance de la pollution dans plusieurs régions du monde [2]. Ces organismes sessiles sont résistants et faciles à collecter et à manipuler pour les expériences de biosurveillance active (The caging ou la transplantation) [1].

Bien que l'utilisation des moules comme bioindicateur ait un certain nombre d'avantages, il existe des limitations intrinsèques à cette approche. Les fluctuations saisonnières dans la charge des corps des contaminants, peuvent compliquer l'interprétation des résultats analytiques. En outre, les paramètres biologiques, comprenant (l'âge, le sexe, la physiologie et le statut de santé) peuvent différer de manière significative et entre les individus. Néanmoins, les moules accumulent les contaminants à plusieurs ordres de grandeurs et intègrent généralement la fraction biologiquement disponible. En plus de fournir une évaluation utile des contaminants chimique dans le temps et l'espace, plusieurs techniques ont été maintenant développées pour établir des réponses biologiques chez la moule permettant, de ce fait, des mesures de produits chimiques et de biomarqueurs chez un même individu [2].

*Mytilus galloprovincialis* représente donc, un excellent bioindicateur quantitatif et qualitatif de pollution côtière, grâce aux nombreux critères de qualité que nous exposons ci-dessous [87]:

- Résistante à la pollution et aux différents stress ; concentre le polluant sans effets létaux, aux concentrations retrouvées dans le milieu avec un facteur de concentration de  $10^3$  à  $10^5$ .
- Sédentaire, elle est donc représentative de la zone d'étude.
- Possède une vie longue, pour permettre l'échantillonnage de différentes classes d'âges.
- Euryhaline ; on la retrouve en milieu estuarien et côtier, supporte les apports d'eau douce et donc résiste aux fluctuations de la salinité.
- Sa large répartition géographique allant aux régions tempérées aux régions subarctiques.
- La possibilité de les transplanter.
- Sa consommation par l'homme, donc vecteur d'éventuelles contaminations.
- Son pouvoir d'utilisation au cours de toute l'année.
- Sa facilité d'échantillonnage, de conservation et de traitement analytique des moules constitue un attrait supplémentaire face aux sédiments, poissons et planctons.

Sur un plan ecotoxicologique, par rapport à d'autres organismes filtreurs, les moules accumulent certains composés xénobiotiques de façon passive et selon un certain équilibre avec la contamination du milieu [89]. La biotransformation de ces xénobiotiques chez ces Mollusques bivalves est souvent considérée comme faible et relativement lente. De ce fait, leur contamination chimique reflète assez bien la contamination du milieu. Ceci explique leur forte utilisation dans les programmes de surveillance de la qualité du milieu marin (RNO, NOAA). Son importance est également due à sa bioconcentration de nombreux métaux présents dans le milieu aqueux aussi bien à partir de l'eau (surtout au niveau branchial) qu'à partir de la phase particulaire [90]. Par contre, son influence aux cycles des saisons est réelle ; de nombreuses études [91, 92] ont montré une relation nette entre les concentrations de différents contaminants métalliques dans la moule et son poids, de sorte que les moules de petite taille, présentent des concentrations plus élevées que les grandes. En effet, l'augmentation de la biomasse, lors des cycles de reproduction, se traduit par une dilution pondérale des métaux bioaccumulés. Par conséquent, ces variations saisonnières

sont la conséquence d'une combinaison de facteurs directement corrélés au poids (cycle sexuels, abondance de nourriture, température) [90].

## **CHAPITRE II**

### **MATERIELS ET METHODES**

Dans le cadre du programme de gestion des écosystèmes aquatiques et de la surveillance environnementale adopté par le CNRDPA de Bou-Ismaïl, dont l'objectif principal est la contribution à la recherche de biomarqueurs comme réponse précoce et susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de santé des milieux marins, nous nous sommes intéressés à étudier la Catalase(CAT) et la Superoxyde Dismutase(SOD) autant que réponse biologique chez la moule *Mytilus galloprovincialis*.

Les différentes expérimentations ont été conduites et réalisées au centre pilote de conchyliculture de CNRDPA-BouIsmaïl. Les dosages biochimiques des biomarqueurs et des protéines ont été réalisé au sein du Laboratoire siège d'analyse physico chimique du CNRDPA.

#### **II.1. Stratégie, démarche et dispositif expérimental :**

La stratégie des tests d'écotoxicité consiste à faire contaminé les moules *Mytilus galloprovincialis*, d'une classe de taille (3,5 à 4,5 cm) par les eaux d'un rejet industriel en mer et ceci, à différentes températures (18C°, 21C°, 24C°,27C°) dans des bacs d'élevage en polyéthylène (54 x 45 x 30 cm) (figure2.1).

Les moules employées comme modèle biologique, sont collectées d'une moulière naturelle située au site de Figuier à Boumerdes.

Une période d'une semaine d'adaptation des moules (acclimatation) avec les conditions expérimentales précède le test de contamination par l'eau de mer contaminé par le rejet industriel. L'ensemble des moules est maintenu dans des conditions environnementales identiques, et l'emploi des pompes à air assure l'aération de l'eau des bacs. Un renouvellement quotidien de l'eau d'élevage est effectué durant la période d'adaptation et le long du cycle expérimental en entier L'adaptation est une étape importante dans la mise en place d'une expérimentation puisqu'elle doit couvrir une période suffisante pour que les organismes s'adaptent aux conditions de laboratoire.

Afin de minimiser au maximum les autres facteurs pouvant constituer une source de perturbation, une mesure des paramètres hydrologiques (température, salinité, pH, oxygène

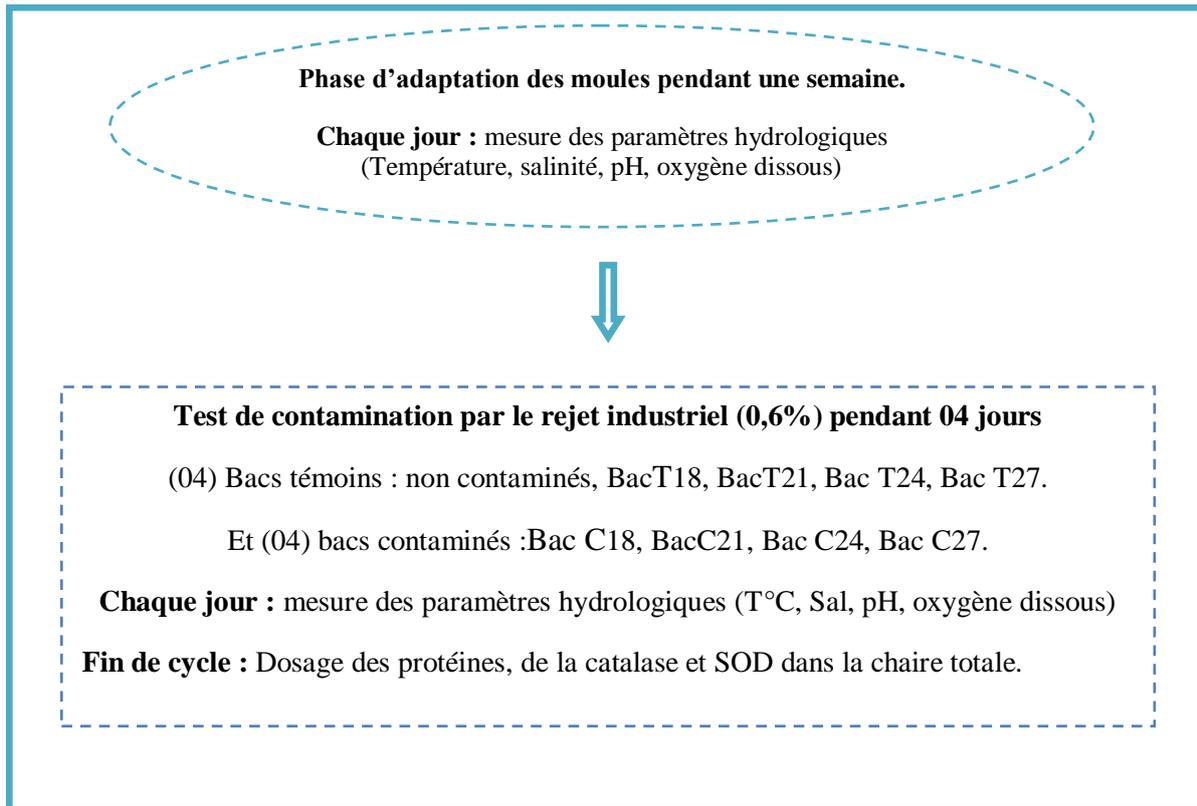
dissous) est effectué chaque jour durant tout le cycle expérimental avant et après le changement d'eau à l'aide d'un multi-paramètre de terrain de type Multi-paramètre WTW(voir annexe).



**Figure 2.1** : Dispositif expérimental

Les moules sont par la suite de l'étape d'acclimatation répartis en huit groupes de tests dans des bacs rectangulaires « (54x45x30cm) » dont chaque bac contient des moules avec le classe de taille étudiée. L'ensemble des moules est incubé dans des conditions environnementales identiques pour une période de 04 jours comme cycle de contamination. Ainsi, les moules sont exposés pendant 4 jours à une concentration constante en polluants de l'eau de rejet industriel (0,6%) et sous un gradient croissant de quatre températures différentes (18°C, 21°C, 24°C et 27°C) en utilisant des thermostats pour maintenir les températures voulues. La manipulation est automatiquement comparée à quatre aquariums témoins (0mg/l polluant).

À la fin du cycle expérimental, les moules sont prélevées pour faire objet des dosages biochimiques des protéines et des enzymes antioxydantes la catalase (CAT) et la Superoxyde Dismutase (SOD),



**Figure 2.2:** Planning expérimental des tests d'écotoxicité de courte durée.

## **II.2.Méthodes analytiques**

### **II.2.1.Échantillonnage :**

L'échantillonnage a porté sur :

- L'eau de mer : pour l'étude de l'excrétion phosphorée et azotée.
- Les moules : pour l'analyse et l'étude des protéines et les biomarqueur biochimique catalase et SOD.

#### **❖ Prélèvement d'eau de mer :**

L'eau de mer prélevée est recueillie dans des flacons en polyéthylène de 500 ml de volume pour assurer les analyses physico-chimiques.

### ❖ Prélèvement des moules :

Les moules sont directement disséquées juste après prélèvement et la chaire récupérée est conservée à  $-30^{\circ}\text{C}$  au maximum 72H après.

### II.3. Suivi et mesure des paramètres au cours de cycle expérimentale



**Figure 2.3** : les analyses physico-chimiques de l'eau de mer

#### II.3.1. Suivi de l'excrétion azotée et phosphorée :

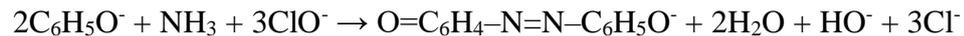
Environ 500 ml sont prélevés chaque jour de chaque bac pour être par la suite filtrées en utilisant une rampe de filtration avec des filtres ordinaires.

Le filtrat ainsi récupéré est destiné au dosage du phosphore et des différentes formes d'azote dissous.

### **II.3.1.1. Dosage de l'azote ammoniacal par la méthode au bleu d'indophénol : [93]**

#### **Principe :**

La méthode décrite mesure la totalité de l'azote ammoniacal, soit  $N-NH_3 + N-NH_4^+$ , symbolisé par  $N-NH_{3,4}$ . Il s'agit de la méthode de *Koroleff (1969)* qui est simple et qui offre une bonne précision ainsi qu'une bonne sensibilité.



Dans un premier temps, l'ammoniac forme une monochloramine avec l'hypochlorite en milieu légèrement basique. Cette dernière réagit avec le phénol en présence d'un excès d'hypochlorite pour former le bleu d'indophénol absorbant à 630 nm.

#### **Mode opératoire :**

03ml du réactif (A), solution de phénol-nitroprussiate (voir annexe A), sont additionnés à 100ml du filtrat récupéré. Directement après homogénéisation, 03ml du réactif (B) solution alcaline d'hypochlorite (voir annexe A) sont ajoutés au mélange.

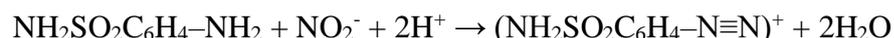
L'échantillon final homogénéisé est placé à l'obscurité pendant une nuit à température ambiante. Ainsi l'absorbance est mesurée à 630nm.

Dans le blanc l'eau distillée remplace les 100ml du filtrat.

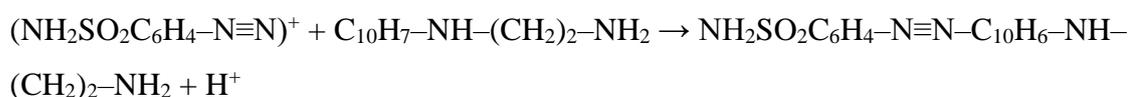
### **II.3.1.2. Dosage de l'azote nitreux : [93]**

#### **Principe :**

Les ions nitrites forment un diazoïque avec la sulfanilamide en milieu acide ( $pH < 2$ ) selon la réaction :



Puis le diazoïque réagit avec le N-naphtyl-éthylènediamine pour former le colorant :



Le colorant rose absorbe à la longueur d'onde de 543 nm.

▪ **Mode opératoire :**

01ml de réactif (C), solution de sulfanilamide (voir annexe A), est ajouté à 50ml de filtrat. Après homogénéisation, on laisse reposer 02 à 08 minutes et on ajoute 01ml de réactif (D) solution de n-naphtyl-éthylènediamine (voir annexe A) au mélange. Après au moins 10 minutes (sans dépasser les 02h) de repos la lecture de l'absorbance des échantillons est faite à 543nm.

Dans le blanc l'eau distillée remplace les 50ml du filtrat.

**II.3.1.3.Dosage du phosphore : [93]**

▪ **Principe :**

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

▪ **Mode opératoire :**

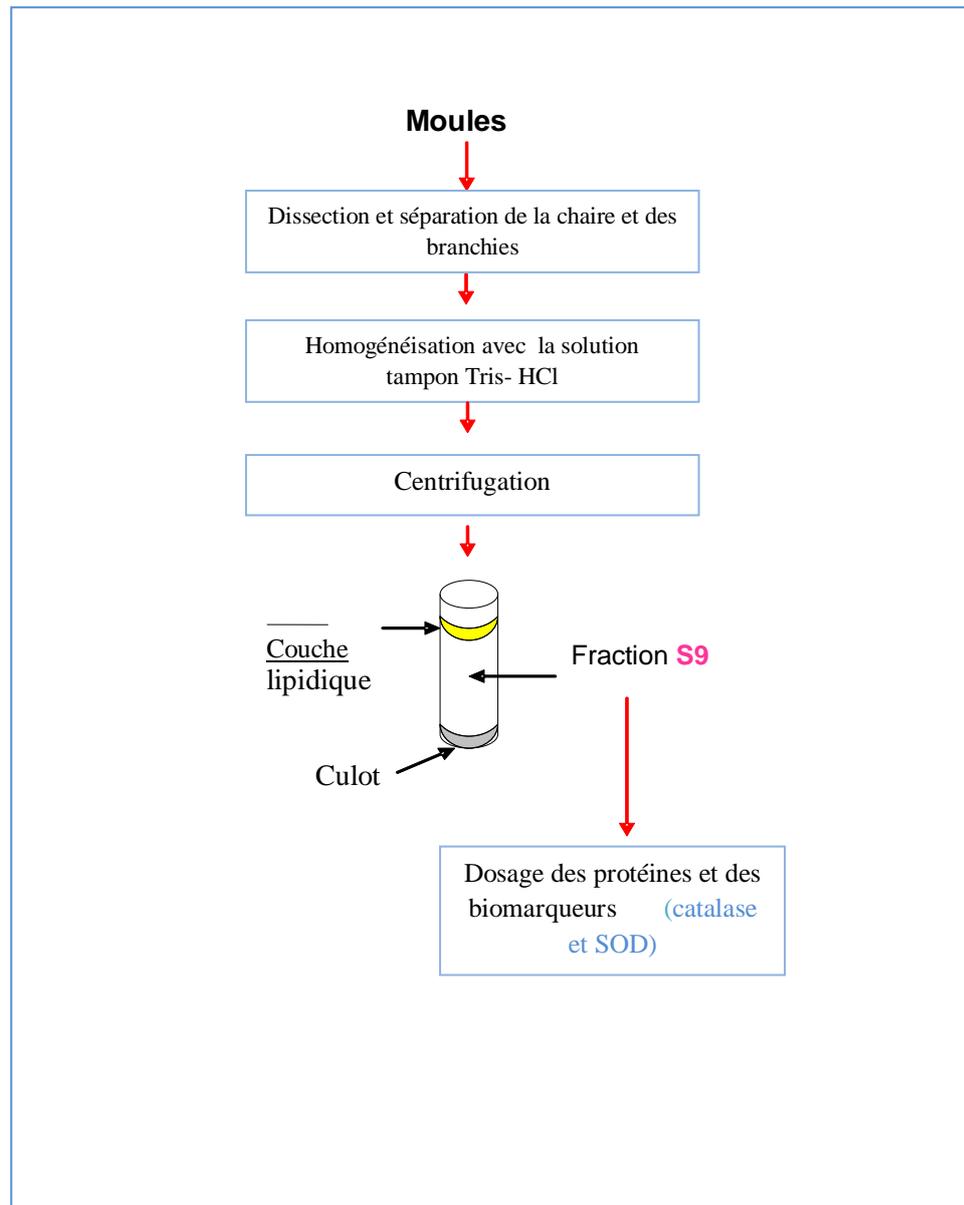
10ml du mélange-réactif phosphore (voir annexe A), préparé à chaque série d'analyses, sont ajoutés à 100ml de filtrat et on homogénéise aussitôt. Après 05minutes de repos la lecture de l'absorbance des échantillons est faite à 885nm.

Dans le blanc l'eau distillée remplace les 100ml du filtrat.

**II.4.1.Préparation des échantillons tissulaires en vue des analyses des biomarqueurs :**

Les dosages biochimiques relatifs aux suivis des biomarqueurs Catalase et Superoxyde Dismutase(SOD), (enzymes de défense antioxydantes) ainsi que le dosage des protéines nécessitent que les tissus biologiques (chaire des moules) fassent l'objet préalable d'une homogénéisation et d'un fractionnement subcellulaire (fig6). L'ensemble de ces procédures se déroulent dans des tampons adaptés. Le tampon dans lequel on homogénéisera devra avoir les propriétés physicochimiques permettant de maintenir la

stabilité des molécules ou organites qu'on désire étudier. On devra apporter une attention particulière à sa composition et à son pH surtout.



**Figure2.4:** Procédures expérimentales des dosages biochimiques.

❖ **Homogénéisation des tissus :**

Les tissus sont homogénéisés à raison de (1/10 m/V) dans le tampon Tris (tris (hydroxyméthyl)aminométhane) (20mM ; pH7,8) en utilisant un mixeur déchiqueteur.

### ❖ Centrifugation de l'homogénat :

La centrifugation de l'homogénat est faite à 10 000t/min pendant 30min à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu (Fraction S9) est utilisé pour doser, les protéines et (catalase, SOD).



**Figure 2.5 :** Homogénéisation des tissus **figure 2.6 :** Centrifugation de homogénat

### II.4.2. Dosages des protéines par la méthode de Lowry : [94]

#### ❖ Principe :

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

La méthode développée par *Lowry et al* [94] combine une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration

bleue qui s'ajoute à celle du biuret. Cette méthode a été tellement utilisée que l'article original de Lowry est un des articles scientifiques les plus cités au monde.

❖ **Mode opératoire :**

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

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

Par la suite, 0.5ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué extemporanément au 1/2 est additionné au mélange (il est important d'agiter juste après l'addition de ce dernier). L'ensemble est mis au repos à l'obscurité au moins 30min. Ainsi la lecture de l'absorbance est faite à 660nm.

La gamme d'étalonnage est réalisée à partir de la solution de sérum albumine bovine (SAB) étalon mère à 7,6G%. Les étalons filles sont ainsi obtenus par dilution de la solution mère.

**II.4.3.Dosages de la Catalase par mode cinétique :**

❖ **Principe :**

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

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

Dans notre pratique l'activité catalase est déterminée selon la méthode de *Lartilot* décrite par *Gülüzaret al [95]*.

❖ **Mode opératoire :**

Dans notre pratique, 2.5ml du substrat (100µl solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% ; 2.4ml tampon phosphate 75mM à pH7) sont placés dans une cuvette du spectrophotomètre déjà réglée sur le mode cinétique.

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

**II.4.4.Dosages de la SOD (Méthode au Pyrogallol) :**

❖ **Principe :**

La superoxyde dismutase SOD est l'enzyme antioxydante chargée d'éliminer les ions superoxydes. Les molécules les plus souvent utilisées comme cibles des ions superoxydes sont le NBT et le Pyrogallol. Nous avons utilisé la technique au pyrogallol. Elle repose sur la compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol (10mM) par les radicaux superoxydes et la dismutation de ces radicaux par la SOD, quantifié par spectrophotométrie à 420nm.

❖ **Mode opératoire:**

Le protocole commence par une préparation du tampon à partir du Tris pH8, 2 (50mmol) et de l'EDTA (1mmol). Puis dissoudre le pyrogallol dans du HCl (0,1N) pour avoir une solution à (10mmol).

Le tampon Tris-EDTA est utilisé pour établir l'auto-zéro du spectrophotomètre. Le tube de réaction de l'auto-oxydation du pyrogallol (tubes contrôles) contient 1ml du tampon Tris-EDTA avec 1ml de la solution pyrogallol. Le tube de réaction de la dismutation par la SOD (tubes tests) contient en plus 50µl de la fraction S9 source d'enzyme de SOD.

Les réactions d'oxydation sont suivies par mode cinétique, alors que la lecture est faite après 45seconde du lancement des réactions.

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

## CHAPITRE III

### RESULTATS ET DISCUSSIONS

#### III.1. Paramètres physico-chimiques

Les eaux marines possèdent un ensemble de caractères physico-chimiques relativement stables dont les principaux sont la température, la salinité, l'oxygène dissous et le pH. Ces facteurs deviennent des marqueurs importants de l'influence anthropique dans le cas des mélanges des eaux de mer avec les eaux des rejets (urbains, industriels...).

Dans la présente étude, ces paramètres ont été mesurés chaque jour avant et après le renouvellement d'eau des bacs expérimentaux.

Dans le but de minimiser au maximum les facteurs stressants tels que le pH, la salinité, l'oxygène dissous..., l'assurance des conditions environnementales optimales pour l'élevage des individus était l'étape primaire avant de commencer les tests d'écotoxicité.

Dans ce travail, la température est prise comme un facteur de stress naturel pouvant perturber le métabolisme et l'activité physiologique des moules.

Durant tout le cycle expérimental, on remarquait que la variation de la salinité était quasi nulle ( $36,33 \pm 0,059\%$ ), et dans l'intervalle des salinités optimales pour la croissance des moules *Mytilus galloprovincialis*. Aussi, aucune différence n'est observée chez les groupes témoins et ceux contaminés. De ce fait, la salinité ne peut constituer un paramètre d'interférence des activités métaboliques des espèces indicatrices. Plusieurs auteurs se concordent sur l'importance de la salinité, leurs résultats montrent son influence autant que facteur abiotique sur l'activité métabolique et surtout des réponses enzymatiques, Ainsi, [96] dans leurs travaux, ont observé une augmentation des teneurs d'ammonium excrété chez le crabe *Scylla serrata* proportionnelle à l'élévation de la salinité.

Aussi, les mesures du pH étaient presque identiques dans chaque bac ce qui n'influe pas sur les réponses biologiques des moules traduites par les biomarqueurs de stress catalase et SOD.

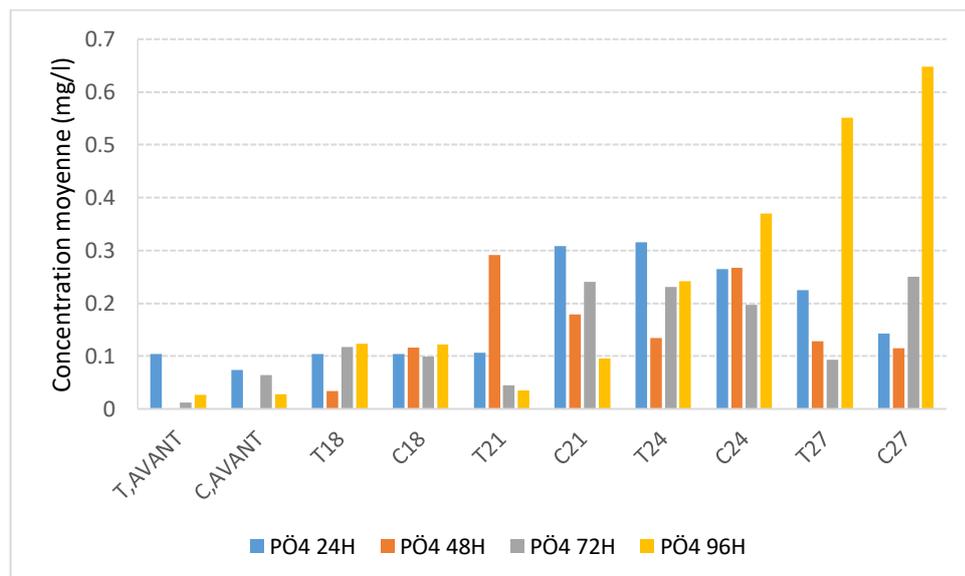
Par ailleurs, les valeurs journalières de l'oxygène dissout mesurées durant le cycle expérimental (moyenne de 6mg/l) répondaient aux exigences des spécimens. Au sens large, la respiration est l'ensemble des mécanismes physico-chimiques et biochimiques qui fournissent à l'être vivant l'énergie nécessaire à son métabolisme. De manière classique, on distingue la fraction de l'énergie totale allouée à la croissance somatique et au métabolisme général, de celle allouée à la croissance gonadique et à la reproduction [97]. Dans certaines conditions environnementales stressantes, l'approvisionnement maximal de tous les organes ne peut être assuré. Conséquences : mauvaise croissance, mauvais état de santé [64,77].

Comme conclusion des paramètres physico-chimiques, et à l'exception de la température, les stress pouvant exercer les conditions expérimentales ne sont pas probables à exister, l'unique stress altérant les moules est bien la conjugaison de l'effet de la température avec celui du rejet polluant.

### III.2. Étude de l'effet de la température et du polluant sur l'excrétion Azotée et Phosphorée (eau d'élevage)

#### ❖ L'excrétion phosphorée :

Les résultats obtenus concernant l'excrétion phosphorée sont représentés dans la figure (3.1).



**Figure 3.1:** Étude de l'effet conjugué de la température avec la contamination par le rejet industriel sur l'excrétion phosphorée.

T, avant : teneur de l'eau de mer naturelle en phosphore ; C, avant : teneur en phosphore après ajout de contaminant

Pour comparer les concentrations des sels nutritifs dans les bacs d'élevage, on procédait d'abord à déterminer les concentrations des éléments nutritifs dans l'eau de mer naturelle du site de prélèvement et ceci chaque jour dans le but d'étudier la variation de ces éléments dans le milieu naturel. L'objectif était de différencier les concentrations du milieu naturel de celles qui résultent de l'activité métaboliques des moules dans les bacs d'élevage.

Ainsi, on constata d'après la figure (3.1), que les variations des teneurs en phosphore sont très faibles dans le milieu naturel et les concentrations ne dépassent pas 0,1 mg/l. Aussi l'ajout de polluant industriel (rejet) n'a conduit pas à une augmentation des tenures en phosphore dans les bacs de contamination et ceci le long du cycle expérimental. On conclue donc que le rejet utilisé comme contaminant est pauvre en éléments phosphorés.

Par ailleurs, et d'après le graphe (figure 3.1), on constate que les concentrations en phosphore, dans les bacs maintenus à 18°C, sont presque identique dans les bacs de contaminations et ceci comparativement aux bacs témoins. Les tenures étaient proches de 0,1mg/l.

Ainsi l'effet de la température (18°C) et/ou de la contamination sur l'excrétion phosphorée des individus de moules *Mytilus* n'est pas remarquable.

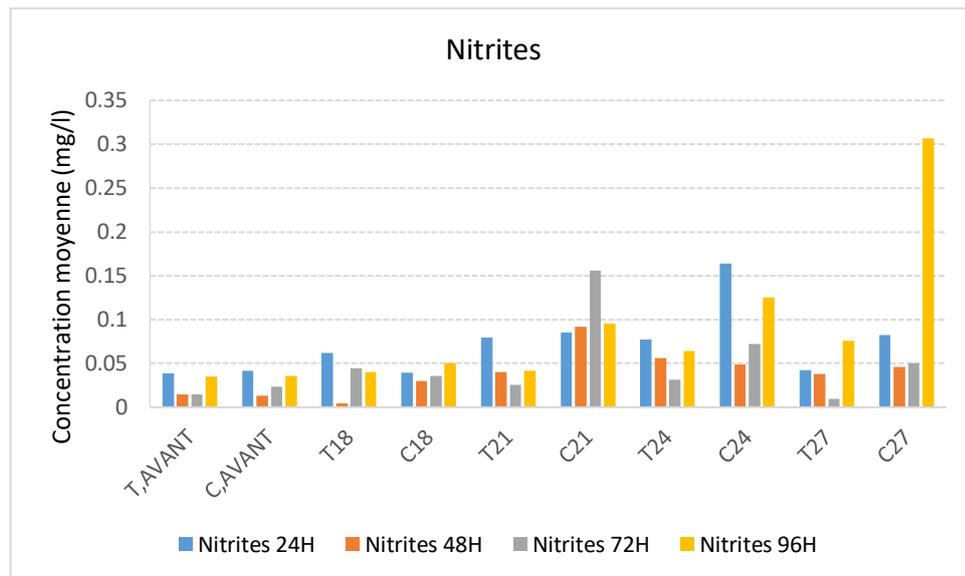
Dans l'eau des bacs témoins, on mesurait un pic de concentration en phosphore (0,2911mg/l) au 2<sup>ème</sup> jour d'incubation. Par la suite, les tenures rechutent considérablement comparativement au pic mesuré. Ainsi, il est difficile de conclure sur l'effet de la température 21°C sur l'excrétion phosphoré en absence de contaminant. Par contre, chez les individus contaminé et maintenus à 21°C, l'excursion phosphorée est induite cette fois-ci sous l'effet conjugué de la présence de contaminant.

Pour les températures de 24°C et 27°C, on mesurait des augmentations considérables dans l'activité métabolique de l'excrétion phosphorée chez les deux groupes de test témoin est contaminé. Cependant, les valeurs relevées dans les bacs de contamination étaient supérieures à celles mesuré dans les bacs témoins. Le polluant semble avoir un effet remarquable en plus de l'effet de la température.

### ❖ L'excrétion azotée :

Dans les figures (3.2 et 3.3), sont illustrées les valeurs moyennes du suivi des paramètres azotés.

Les variations des teneurs en nitrites en fonction de la température, chez les deux groupes de tests témoins et contaminés, sont graphiquement indiquées dans la figure (3.2).



**Figure 3.2 :** Étude de l'effet conjugué de la température avec la contamination par le rejet industriel sur les teneurs en nitrites.

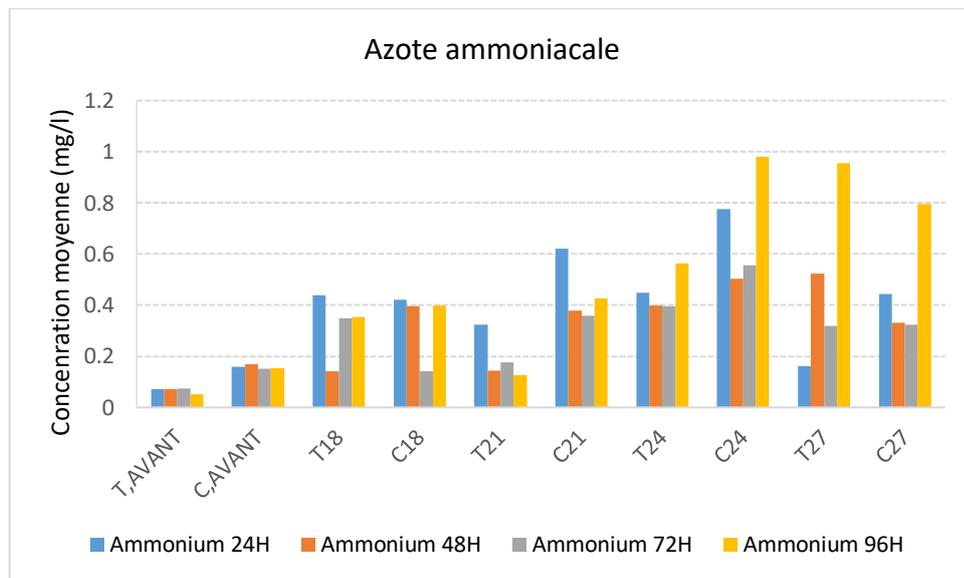
T,avant : teneur de l'eau de mer naturelle en nitrites ; C,avant : teneur en nitrites après ajout de contaminant

Comme se fut le cas des orthophosphates dans l'eau de mer naturelle du site d'approvisionnement, les concentrations mesurées de l'élément nutritif  $\text{NO}_2^-$  étaient très faibles entre (0,01 et 0,038 mg/l) (fig3.2). Aussi l'introduction du polluant (effluent industriel à 0,6%) dans les bacs de contaminations n'a conduit à aucune augmentation remarquable de la concentration en nitrite dont les teneurs oscillaient entre 0,01 et 0,04 mg/l.

Pour les bacs de 18°C (proche de la température de milieu naturel) les variations des concentrations en nitrite sont faibles et se rapprochent de 0,05mg/l chez les deux groupes de test témoin et contaminé. L'activité métabolique des moules ne semble pas être affectée. L'effet de la température 21°C sur les individus témoins ne semble pas claires dont on a mesuré des faibles augmentations en concentration nitrites et ceci comparativement aux teneurs de l'eau de mer naturelle. Par contre, l'introduction de polluant à cette même

température a conduit à une augmentation nettement remarquable des tenures en  $\text{NO}_2^-$ . Le contaminant révèle un effet direct plus important que celui de la température. Ce constat est confirmé encore chez les individus témoin incubé à  $24^\circ\text{C}$  et  $27^\circ\text{C}$  dont les variations des tenures en nitrites étaient très faibles. Aussi, de forte augmentation des teneurs en  $\text{NO}_2^-$  est relevée dans les bacs de contamination à  $24^\circ\text{C}$  mais surtout à  $27^\circ\text{C}$ .

Les variations des teneurs en azote ammoniacal en fonction de la température, chez les deux groupes de tests témoins et contaminés, sont illustrées dans la figure (3.3).



**Figure 3.3:** Étude de l'effet conjugué de la température avec la contamination par le rejet industriel sur les teneurs en azote ammoniacale.

T,avant : teneur de l'eau de mer naturelle en ammonium ; C,avant : teneur en ammonium après ajout de contaminant

Les analyses des teneurs de l'eau de mer en sels nutritifs ont révélé de faibles teneurs d'ammonium, de phosphore et de nitrite. Ainsi, l'apport exogène des sels nutritifs pouvant provenir d'une source de contamination anthropique (rejet anthropogénique) reste peu probable pour l'eau approvisionnée pour l'élevage des moules de la présente étude.

Concernant l'élément azoté  $\text{NH}_4^+$ , l'introduction du polluant (rejet industriel) a conduit cette fois-ci à une augmentation remarquable de la concentration ammoniacale dans l'eau des bacs de contamination.

Les teneurs dans l'eau de mer naturel étaient stables et variaient entre 0,05 et 0,07 mg/l. De là, on conclue que le rejet industriel employé comme agent contaminant est très riche en  $\text{NH}_4^+$ .

Par ailleurs, l'excrétion azotée semble être très influencée par le gradient température. Ainsi des augmentations proportionnelles des tenures azotées sont relevées dans l'eau de mer des bacs témoins à 18°C, 21°C, 24°C et 27°C. Aussi l'agent contaminant (effluent industriel) marque son effet additionnel dont on a mesuré de fortes concentrations dans l'eau de mer des bacs contaminés.

Ainsi, et à la lumière de ces résultats, on peut conclure que la contamination des moules *Mytilus* par un effluent réel a eu un effet sur l'excrétion phosphorée et azotée et cela par l'élévation des teneurs en métabolites (surtout l'azote ammoniacal, comme élément majeure de l'excrétion azotée) et ceci en corrélation positif avec le gradient d'élévation de la température.

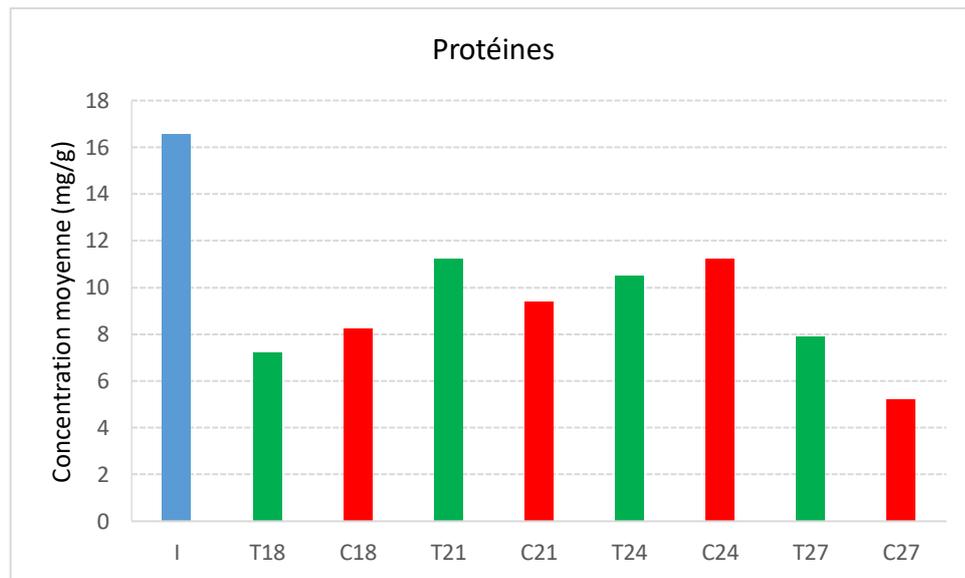
Selon *Arumugan et al.*, [98], l'oxyde nitrique et les nitrites qui sont les produits finaux de leur oxydation sont impliqués dans le système de défense des bivalves marins.

Dans notre cas d'étude, la régulation de l'activité métabolique chez la moule *Mytilus* semble être perturbée, sous l'effet de la température mais surtout de l'effet additionnel de la contamination, à cause de l'inhibition des enzymes impliquées dans leur synthèse, il s'agit entre autre de l'Oxyde Nitrique Synthétase et de la NADPH-Synthétase. L'activité permanente de ces enzymes prouve l'efficacité du système de défense et l'effet protecteur contre les dommages causés par l'exposition au polluant. En effet, Les polluants chimiques sont connus par leur pouvoir à générer des molécules très réactive : les ROS (Reactive Oxygen Species) responsables d'altérations cellulaires et plus particulièrement l'oxydation des composants tels que l'ADN, les **protéines** et les lipides et par une perturbation généralisée de la balance redox (ratios GSH/GSSG et NADH/NAD<sup>+</sup>)[64,99,100,101, 102].

Toutefois, il est à noter que l'excrétion des composés azotés est fortement influencée par les facteurs abiotiques plus particulièrement la température. Ainsi, *Novas et al.*, [103] dans leurs études ont signalé des fortes productions des composés azotés en été qu'en hiver sous l'effet d'exposition des moules *Mytilus galloprovincialis* aux composés organiques HAP. D'autres paramètres comme l'état physiologique, le stress entrent en ligne de compte et peuvent aussi influencer l'activité métabolique [104].

### III.3. Résultats du dosage des protéines

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



**Figure 3.4:** Étude de l'effet conjugué de la température avec la contamination par le rejet industriel sur les teneurs en protéines dans la chaire des moules.

D'après les résultats obtenus, l'exposition à l'eau de mer contaminée a engendrée une variation des concentrations des protéines dans la chaire des moules. Ainsi, une déplétion remarquable des tenures en protéines est mesurée chez les deux groupes de test à la fin du cycle expérimental et ceci comparativement à l'échantillon initiale.

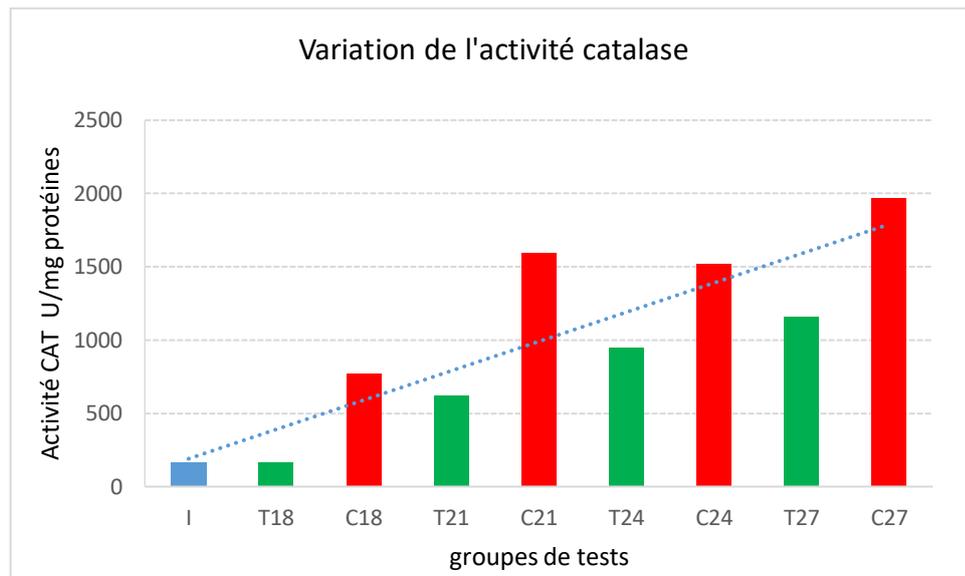
De nombreux stress physique et/ou chimiques peuvent entraîner la mobilisation des réserves énergétiques. Dans le cas de stress sévères les protéines peuvent être mobilisées. D'une manière générale, la réponse est vers une diminution des réserves énergétiques (glycogène, lipides, protéines) suite à l'exposition en laboratoire ou *in situ* à différents types de contaminants [64].

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 et cette demande peut induire le catabolisme protéique. De plus la diminution des teneurs protéiques peut être due à la formation de lipoprotéines qui seront utilisées pour la réparation des dommages au niveau des cellules, des tissus et des organes [97, 101, 105].

### III.4. Résultats du dosage de la catalase

Plusieurs travaux relatent l'utilisation de la catalase comme biomarqueur de défense traduisant l'état de santé des organismes indicateurs [106,107, 108, 109, 110].

Les résultats issus du dosage du biomarqueur catalase au niveau de la chaire des moules sont graphiquement représentés dans la figure (3.5)



**Figure 3.5 :** Variation de l'activité catalase chez la moule *Mytilus galloprovincialis* dans les deux groupes de test témoin et contaminé.

L'objectif de la présente étude était d'étudier l'effet conjugué de la pollution avec l'augmentation de la température dans le but de simuler l'effet de la saison en présence de source polluante. Nonobstant, nous avons pris une concentration constante de polluant (rejet industrielle) pour simplifier la comparaison entre effet saisonnier et celui de la pollution.

D'après le graphe (fig3.5), nous constatons que les moules *Mytilus* maintenues à 18°C en absence de contamination présentèrent une activité catalase identique à celle mesurée chez les individus de prélèvement initial. De fait la période d'adaptation n'avait aucun effet stressant possibles pour les moules.

La température de l'eau de mer au jour du prélèvement initial des moules était 17°C. Par ailleurs et avec l'élévation de la température on constate une augmentation proportionnelle

de l'activité CAT chez les individus témoin. La plus forte activité catalase (1156,481 U/mg protéine) est relevée sous l'effet de la température de 27°C.

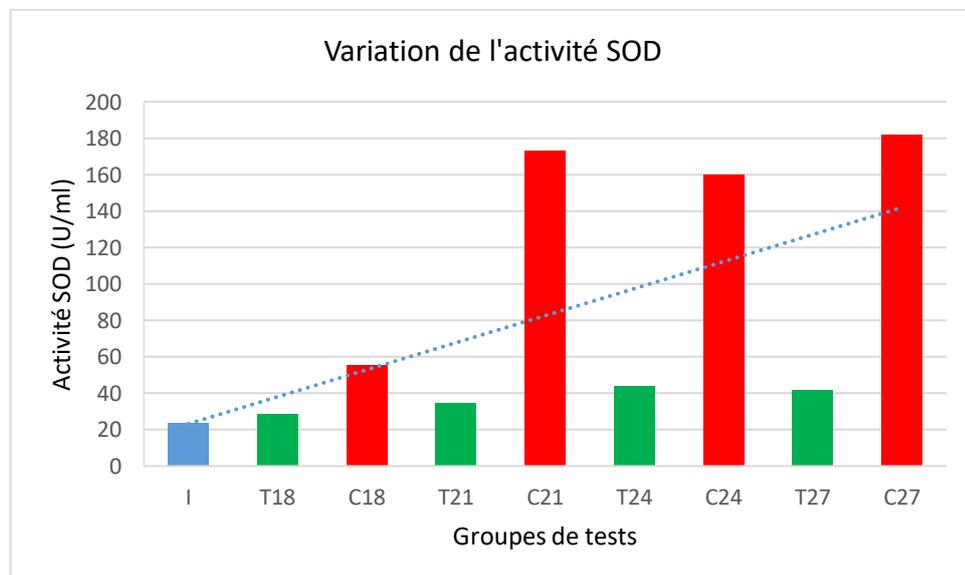
En revanche, les activités atteintes chez les témoins étaient nettement inférieures à celles mesurées chez les moules contaminés (fig3.5) et ce pour les différentes températures testées. Le résultat étant l'effet additionnel de la présence de polluant dans le milieu.

En ce référant à une étude antérieure faite par (*Kritli Nabil, 2012*), l'effet de l'augmentation de la concentration en polluant à une température constante (22°C) a conduit à une élévation de l'activité de l'enzyme antioxydant CAT sous l'effet de la plus forte concentration en polluant.

Cette même activité est relevée dans notre étude à la température d'exposition de 21°C. Delà, on conclue l'effet important de l'augmentation de la température sur les réponses biologiques de la moule *Mytilus*. Le résultat obtenu peut traduire l'effet de la saison chaude sur la dynamique des moulières naturel.

### III.5. Résultats du dosage de la SOD

La figure (3.6) ci-dessous représente la variation de l'activité de l'enzyme SOD chez les moules des deux groupes de test témoins et contaminés.



**Figure 3.6:** Variation de l'activité SOD chez la moule *Mytilus galloprovincialis* dans les deux groupes de test témoin et contaminé

D'après le graphe de la figure (12), on constate que l'élévation de la température conduisit à une augmentation de l'activité SOD chez les moules témoins (max : 43,88U/ml à

24°C). Néanmoins, les activités atteintes ne sont pas très importantes et ceci comparativement à l'activité SOD mesurée chez les moules du prélèvement initial (23,53U/ml).

Ainsi, la SOD ne paraît pas très sensible à l'augmentation de la température. Dans la saison chaude la température de l'eau de mer des moulières naturelle avoisine les 26°C.

Par ailleurs, et sous l'effet additionnel de la contamination par l'effluent réel, les activités SOD démontrèrent des taux d'induction très importants (182,0656U/ml) de l'ordre de sept fois plus grand que ceux des témoins ou du prélèvement initial. La SOD étant plus sensible à la contamination qu'à la température.

Comparativement aux activités CAT, l'activité SOD semble être plus sensible à la présence de polluants chimiques dans le milieu qui exercent un effet inducteur très important de l'activité enzymatique via à la production des espèces réactifs de l'oxygène ROS. Les xénobiotiques sont les précurseurs des ROS pour exercer les effets délétères au niveau cellulaire.

### **III.6. Discussion générale**

Les eaux usées industriel varient d'une industrie à l'autre, elles peuvent contenir des produits toxiques, des métaux lourds, des polluants organiques, des hydrocarbures...

L'accumulation des substances chimiques dans les organismes est à l'origine du stress oxydant [101, 105, 111, 112, 113].

La moule est un bivalve filtreur accumulateur des micropolluants. Elle peut concentrer les éléments traces à des concentrations supérieures à celles rencontrées dans son environnement. Pendant tout processus physiologique d'échange avec le milieu environnant, les molécules exogènes pénètrent à travers les barrières biologiques séparant l'environnement interne de l'organisme du milieu externe. L'accumulation des substances chimiques dans les organismes est à l'origine du stress oxydant.

En effet, par leurs propriétés redox, de nombreux xénobiotiques tels que les hydrocarbures, les métaux, les quinones ou encore certains pesticides sont connus pour exercer leurs effets délétères par le biais de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La réactivité des ROS peut être à l'origine d'effets biologiques néfastes (oxydation des composants tels que l'ADN, les protéines, les lipides et perturbation généralisée de la balance redox) chez

les invertébrés. En effet, les organismes aquatiques ont développé des systèmes antioxydants leur permettant de faire face à la production de ROS. Comme nous l'avons discuté auparavant, l'enzyme de défense antioxydante CAT est connue pour être induite afin de faire face au stress oxydant. Mesurée chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, l'activité catalase peut nous renseigner sur le niveau de la pollution et le degré d'altération de la cellule.

Pour pouvoir maîtriser la formation de ces espèces réactives, les cellules disposent d'un complexe antioxydant de défense constitué d'enzymes (superoxyde dismutase SOD, catalase CAT, glutathion peroxydase) et de molécules qui piègent les espèces radicalaires au niveau des membranes (vitamine E,  $\beta$ -carotène) ou de la phase aqueuse (acide ascorbique, acide urique et glutathion). Les enzymes de défense antioxydantes CAT et SOD sont connues pour être induites afin de faire face au stress oxydant [101, 107, 113, 114].

Donc l'augmentation de l'activité catalase et SOD chez les moules nous indique que l'eau de mer est fortement polluée par le rejet industriel. Les biomarqueurs de défense comme la catalase et la SOD sont de plus en plus employés dans divers programmes de recherche et en utilisant différentes espèces indicatrices de vertébrés et d'invertébrés. Mesurées chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, l'activité CAT et SOD peuvent nous renseigner sur l'état de santé des organismes et le niveau de la pollution des milieux.

Plusieurs travaux réalisés ont étudié l'effet de la température et de la salinité sur l'activité métabolique, l'accumulation des polluants et les réponses des biomarqueurs chez la moule Méditerranéenne. [115, 116].

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que la moule *Mytilus* possède un certain nombre de caractéristiques qui en font d'elle d'excellent bioindicateur de la qualité du milieu marin dont son importance est déjà été soulignée dans de nombreux travaux de recherche [101, 107, 113, 114, 115, 116].

En conclusion, la pratique des biomarqueurs, dans notre présente étude, s'est avérée très intéressante de point de vue précocité de repense des signaux mesurés et leurs corrélations avec la contamination et le gradient de températures testées. Ils peuvent en effet, constituer un complément évident des programmes de surveillance chimique en traduisant un risque pour les organismes des écosystèmes aquatiques. De ce fait, les biomarqueurs peuvent être

employés et trouve encore une forte pertinence écologique plus particulièrement dans le cas d'un programme de surveillance à long terme des milieux marin côtiers.

Par ailleurs, l'intégration de ces variables biologiques dans un réseau pérenne de surveillance et mesures fournira aux gestionnaires des milieux aquatiques une meilleure information sur la tendance évolutive des milieux surveillés (signe de bonne gestion ou d'une dégradation), et permettra aux scientifiques de mieux comprendre le fonctionnement des systèmes étudiés.

## CONCLUSION

Cette étude avait comme objectif l'étude de l'effet d'une exposition aiguë au laboratoire à un effluent réel (rejet industriel), sous un gradient croissant de la température, sur les activités enzymatiques et métaboliques de la moule *Mytilus galloprovincialis* prise comme espèce sentinelle de niveau de contamination des eaux côtières.

Les facteurs environnementaux tels que l'oxygène dissous, la salinité et le pH de l'eau de mer étaient constants durant tout le cycle expérimental, ainsi leur l'influence sur les réponses biologiques est peu probable.

La perturbation du métabolisme des individus exposés aux contaminants de l'effluent, et à la différence de l'effet de la température, traduite par l'augmentation de production de l'azote ammoniacal et du phosphore est le résultat direct de la présence du polluant dans le milieu. Donc la mesure des activités métaboliques s'est avérée une approche très intéressante.

Une déplétion des teneurs en protéines de la chaire totale traduit la perturbation des réserves protéiques des moules produites durant le cycle de contamination. Cependant, la compréhension de l'influence des polluants sur le métabolisme énergétique nécessite que ces résultats soient complétés par davantage de paramètres et notamment la mesure des teneurs du glucose et des lipides.

Les réponses enzymatiques obtenues dans la présente étude permettent de qualifier la catalase et la SOD comme biomarqueurs de défense très pertinents, sensibles et rapides. Cette qualification est justifiée par la corrélation positive entre l'activité enzymatique et l'effet combiné de la contamination et l'élévation de la température. Ainsi, l'effet saisonnier peut être clairement distingué de l'effet de la pollution où cette dernière a conduit à une induction importante et rapide des enzymes de défense antioxydantes CAT et SOD.

Les enzymes du stress oxydatif peuvent être influencées par des facteurs intrinsèques ou extrinsèques indépendants de la volonté du chercheur. Ainsi, pour pallier les variations des réponses des biomarqueurs dues à ces facteurs l'approche multimarqueurs semble être une clé prometteuse pour une interprétation meilleure des résultats et ainsi une évaluation plus

précise de l'état de santé du milieu aquatique. Cette approche est basée sur le dosage simultané des autres biomarqueurs de stress oxydant tel que la Glutathion-S-Transférase (GST), le Glutathion réduit (GSH) ainsi que la Malon dialdéhyde (MDA) qui est liée à la peroxydation lipidique, résultat du stress oxydant causé par les ROS et dont la génération est en relation avec la présence de polluants chimiques (éléments traces métalliques et/ou organiques).

## References BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] NASCI, C.NESTO, N.MONTEDURO, R.A. DA ROS, L. (2002). Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring in the Lagoon of Venice (NE Italy). Mar. Environ. Res. 54, p. 811–816.
- [2] NICHOLSON, S. & LAM, P. K. S. (2005). Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (*Mytilidae*: Bivalvia).ELSEVER. Environment International 31, p. 121-132.
- [3] VIARENGO, A.CANESI, L. (1991).Mussels as biological indicators of pollution. Aquaculture 94, p. 225–243.
- [4] Vidal-liñán, L.Bellas , J.Campillo, J.A. Beiras R. (2010). Intergrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain).Chemosphere 78, 265-272 . Elsevier.
- [5] Moriarty F. (1990). Ecotoxicology. The study of pollutants in Ecosystems. Academic Press, London, 289p.
- [6] Butler P & Lowe J. (1978). Flowing sea water toxicity tests using oyster (*Crassostrea virginica*). In Bioassay Procedures for the Ocean Disposal Permit Program, EPA-600/9-78-010, 25-27.
- [7] Ramade F. (1998). Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau. Ediscience Paris, FRA. 785p.
- [8] Burton G, (1992). Sediment toxicity assessment. Lewis Publishers, London, 211p.
- [9] RNB (1999). Réseau National de Bassin. Les micropolluants dans les cours d'eau français, 3 années d'observations (1995 à 1997). Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement et les agences de l'eau.France.
- [10] Mouchel J-M, Thévenot D. (2003). Support de cours d' Ecotoxicologie du CEREV « Centre d'Enseignement et de Recherche Eau Ville environnement ».

- [11] **Gravez V & Bernard G. (2006).** Pollution marine : Les définition. [www.com.univ-mrs.fr](http://www.com.univ-mrs.fr).
- [12] **Vincent M. (2006).** Etude d'expertise en Aquaculture - Environnement - Pêche – Pollution. Saint-Maximin – France.
- [13] **Marchand M. (2002).** Pollution marine et contamination chimique. Peut-on éliminer les substances chimiques dangereuses du milieu marin ? IFREMER, DEL/PC.
- [14] **Marchand M & Kantin R. (1997).** Contaminants chimiques en milieux aquatiques. Oceanis Vol. 21(2), 1995, Vol. 22(3), Vol. 23(4).
- [15] **Marchand M & Brunot C. (1997).** L'environnement littoral et marin. Institut français de l'environnement. Etudes et Travaux n°16 : 116 pp.
- [16] **Lacaze J. C. (1993).** Les biocénoses marines et littorales de Méditerranée. Synthèse, menaces et perspectives. Bellan-Santini D., Lacaze J.C., Poizat C. eds. Secrétariat de la Faune et de la Flore. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- [17] **IFREMER. (2003).** Comportement des polluants. Rapp. Annuel.
- [18] **Gingras D. (1997).** Capsules-éclair sur l'état du saint-laurent. Environnement Canada, région du Québec, conservation de l'environnement, centre saint laurent.coll.billan.
- [19] **USEPA. (2006).** Les grands lacs. Cheminement de la pollution. Atlas écologique et manuel des ressources. 4eme chapitre.
- [20] **Brémond R & Perrodon C. (2005).** Les paramètres de la qualité des eaux : Aspects qualitatifs de la pollution.
- [21] **Beauchamp J. (2003).** La pollution littorale. Université de Picardie Jules Verne.
- [22] **Pelletier, E. Campbell, P.C.G. Denizeau, F.(2004).** “ Ecotoxicologie moléculaires : Principes fondamentaux et perspectives de développement”, Presse de l'université de Québec, Québec, (2004), 502 p.
- [23] **Essedaoui, A. Sif, D. (2001).** “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.

[24] **Megateli, S. (2010).** “ 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.

[25] **Letendre, J. (2009).** “ Effets combinés de l'intertidalité et de la contamination chimique chez *Mytilus edulis* : Mécanismes enzymatiques anti-oxydants et approche protéomique”, Thèse de doctorat, Université du Havre, France, (2009), 243 p.

[26] **Lagadic, L. Caquet, T. Amiard, J-C. Ramade, F. (1998).** “Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l’environnement ”, Edition TEC & DOC, Paris, (1998) ,320 p.

[27] **Amiard, J.C. Amiard- Triquet, C. (2008).** “ Les biomarqueurs dans l’évaluation de l’état écologique des milieux aquatiques” ; Edition TEC & DOC, Paris, (2008), 375 p.

[28] **Azdi, M. (2006).** “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.

[29] **Garric, J. Morin, M., Vincent-Hubert, F. (2012).** “Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage”, Sciences Eaux & Territoires N° (01), (2012), pp 12-17.

[30] **Bourgeault, A. (2010).** “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.

[31] **Merzouki, M.Talib, N.Sif,J. (2009).**“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.

[32] Casas, S. (2006). “ 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.

[33] Rajkumar, J.S.I. John-Milton, M.C. (2011). “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.

[34] Chaabouni, R. (2009). “Utilisation et mise au point au niveau moléculaire de biomarqueurs pour étudier la répartition spatiale de la contamination au voisinage d’une source de pollution ”, Thèse de Doctorat, Université de Sfax, Tunisie, (2009) ,233 p.

[35] Gestal C, Roch P, Renault T, Pallavicini A, Paillard C, Novoa B, Oubella R, Venier P & Figueras A (2008) Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics. *Rev Fish Sci* 16(1): 133-156.

[36] Gagné F, Blaise C, Pellerin J, Fournier M, Durand MJ & Talbot A (2008) Relationship between intertidal clam population and health status of soft-shell clam *Mya arenaria* in the St. Lawrence Estuary and Saguenay Fjord (Québec, Canada). *Environ Int* 34: 30-43.

[37] van der Oost R, Beyer J & Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149.

[38] Lam PKS & Gray JS (2003) The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar Pollut Bull* 46: 182-186.

[39] Hylland K (2006) Biological effects in the management of chemicals in the marine environment. *Mar Pollut Bull* 53(10-12): 614-619.

[40] Moore MN, Allen JI & McVeigh A (2006) Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar Environ Res* 61(3): 278-304.

[41] Hylland K, Tollefsen KE, Ruus A, Jonsson G, Sundt RC, Sanni S, Utvik TIR, Johnsen S, Nilssen I, Pinturier L, Balk L, Barsiene J, Marigomez I, Feist SW & Borseth JF (2008) Water Column monitoring near oil installations in the North SEA 2001-2004. *Mar Pollut Bull* 56: 414-429.

[42] Raftopoulou EK & Dimitriadis VK (2010) Assessment of the health status of mussels *Mytilus galloprovincialis* along Thermaikos Gulf (Northern Greece): An integrative biomarker approach using ecosystem health indices. *Ecotox Environ Safe* 73: 1580-1587.

[43] Zorita I, Ortiz-Zarragoita M, Apraiz I, Cancio I, Orbea A, Soto M, Marigomez I & Cajaraville P (2008) Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using mussels as sentinel organisms. *Environ Pollut* 153(1): 157-168.

[44] Pipe RK & Coles JA (1995) Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immun* 5: 581-595.

[45] Pellerin J & Amiard JC (2009) Comparison of bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in two marine bivalves (*Mytilus edulis* and *Mya arenaria*). *Comp Biochem Phys C Toxicol Pharmacol* 150: 186-195.

[46] Goldberg ED (1975) The Mussel Watch: a first step in global monitoring. *Mar Pollut Bull* 6: 111.

[47] Fournier M, Pellerin J, Clermont Y, Morin Y & Brousseau P (2001) Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161: 201-211.

[48] Blaise C, Gagné F, Pellerin J, Hansen PD & Trottier S (2002) Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay fjord with the softshell clam *Mya arenaria*. *Environ Toxicol* 17: 170-186.

[49] Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J & Jiang G (2008) Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta* 606: 135-150.

- [50] **Lemaire N, Pellerin J, Fournier M, Girault L, Tamigneaux E, Cartier S & Pelletier E (2006)** Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *Mytilus* spp. from farm sites of eastern Quebec. *Aquaculture* 261: 729-751.
- [51] **Li H, Parisi MG, Toubiana M, Cammarata M & Roch P (2008)** Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. *Fish Shellfish Immunol* 25: 143-152.
- [52] **Pellerin J, Fournier M, Gauthier-Clerc S, Blaise C, Garnerot F, Amiard JC & Gagné F (2009)** Qu'en est-il de l'état de santé des myes au Saguenay? Un bilan d'études sur plus d'une décennie. *Rev Sci Eau* 22 : 271-289.
- [53] **Ruiz Y, Suarez P, Alonso A, Longo E, Villaverde A & San Juan F (2011)** Environmental quality of mussel farms in Vigo estuary: Pollution by PAHs, origin and effects on reproduction. *Environ Pollut* 159: 250-265.
- [54] **Gust M, Gélinas M, Fortier M, Fournier M & Gagné F (2012)** In vitro immunotoxicity of environmentally representative antibiotics to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Environ Pollut* 169: 50-58.
- [55] **Luengen AC, Friedman CS, Raimondi PT & Flegal AR (2004)** Evaluation of mussel immune responses as indicators of contamination in San Francisco Bay. *Mar Environ Res* 57: 197-212.
- [56] **Galloway TS & Goven AJ (2006)** Invertebrate immunotoxicology. Immunotoxicology and Immunopharmacology, Luebke R, House RV & Kimber I (Édit) CRC Press, Boca Raton. p 365-384.
- [57] **Malagoli D, Casarini L, Sacchi S & Ottaviani E (2007)** Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish Shellfish Immunol* 23: 171-177.

**[58] Gagné F, Blaise C, Pellerin J, Fournier M, Gagnon C, Sherry J & Talbot A (2009)** Impacts of pollution in feral *Mya arenaria* populations: The effects of clam bed distance from the shore. *Sci Total Environ* 407: 5844-5854.

**[59] Hannam ML, Bamber SD, Sundt RC & Galloway TS (2009)** Immune modulation in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to North Sea produced water. *Environ Pollut* 157: 1939-1944.

**[60] Deplage, M.H (1994)** The rationale basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Non destructive biomarkers in vertebrates, in : FOSSI, M.C., LEONZO, C., Eds. Lewis Publishers, p.271-296.

**[61] FORBES, V. PALMQVIST, BACH, L (2006)** The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol.25, p.272-280.

**[62] Favier, A. (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, p108-115.

**[63] Haton C (2005).** Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France, pp : 43.

**[64] Amiard Jean-Claude, Claude Amiard-Triquet (2008)** Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Edition Tec et Doc Lavoisier. ISBN : 978-2-7430-1017-1.

**[65] Nordberg, J. et Arnér, E. S. J (2001)** Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine* 31: 1287-1312.

**[66] Gutteridge, J.M. et Halliwell, B (1993)** Transition metal ions and antioxidant proteins in extracellular fluids. In: *Atmospheric Oxidation and Antioxidants*, Scott G. (eds), 3, Elsevier Publisher, UK.

**[67] Staniek, K., et Nohl, H (2000)** Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochimica Biophysica Acta* 1460: 268-275.

- [68] **Fridovich, I (1975) Superoxide dismutases.** Annual Review of Biochemistry 44: 147-159.
- [69] **Fenton, H.J.H, (1894).** Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. Journal of Chemical Society 65: 899-910.
- [70] **Winston, G. W, Regoli, F. Dugas, A. J. Jr, Fong, J. H, Blanchard, K.A, (1997).** A rapid gas chromatographic assay for determining the oxydoradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. Free Rad. Biol. Med., 24(3): 480-493.
- [71] **Lackner, C. Daufeldt, S, Wildt, L, Alléra, A. ( 1998).** Glucocorticoid-recognizing and -effector sites in rat liver plasma membrane. Kinetics of corticosterone uptake by isolated membrane vesicles. III. Specificity and stereospecificity. J. Steroid Biochem. Mol. Biol; 64 (1-2):69-82.
- [ 72] **Halliwell, B. ( 1987).** Oxidants and human disease: some new concepts. FASEB Journal 1: 358-364.
- [73] **Sies, H. (1991).** Oxidative stress: introduction in oxidative stress, oxidants and antioxidants, Sies H. (ed.) Academic Press Publisher, London, San Diego.
- [74] **Cossu, C. Doyotte, A. Jacquin, M. C. et Vasseur, P. (1997) b.**Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène. In: Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. et Ramade, F. (eds), 125-148, Masson, Paris.
- [75] **Shimizu, H. (2004).** Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study, *Stroke*,**35** (9) : 2072-2077.
- [76] **Roberts, CK., Sindhu, K.K.(2009).**Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*, **84** : 705–712.
- [77] **Lagadic L., Caquet T., Amiard J-C., Ramade F., (1997).** Biomarqueurs en écotoxicologie, Aspects fondamentaux. Edition Masson, Paris, ISBN : 2-225-83053-3 ; ISSN : 1275-0026.

[78] **Orbea A. Ortiz-Zarragoitia M. Solé M. Porte C. Cajaraville M.P. (2002).** Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalves molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology* 58,75-98.Elsevier.

[79] **Khessiba A, Roméo M, Aïssa P. (2005).** Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environmental Pollution* 133, 257-281. Elsevier.

[80] **Gharbi-Bouraoui S, Gnassia-Barelli M, Roméo M, Dellali M, Aïssa P, (2008).** Field study of metal concentrations and biomarker responses in the neogastropod, *Murex trunculus*, from Bizerta Lagoon (Tunisia). *Aquatic Living Resource*. 21, 213–220. EDP Sciences, IFREMER, IRD.

[81] **Comité National de la Conchyliculture. (2006).** Biologie des moules <http://www.coquillages.com/index.php?rub=1&page=42&type=theme&id=40>

[82] **Pagliassotti M.J, Davis S.N, Cherrington.A.D. (1994).** The role of the liver in maintaining glucose homeostasis : AustinR.G. Landes Company.

[83] **Fisher W.S. (1988).** Environmental influence on bivalve hemocyte function. *Am. Fish. Soc. Special Pub.* 18: 225-237.

[84] **Lubet P. and Delongcamp D. (1969).** Etude des variations annuelles des constituants Lipidiques chez *Mytilus Edulis* L. à Luc sur Mer. *C.r. Soc. Biol.* 163: 1110-1112.

[85] **Martin M.C. Zwingelstein G. Jouanneteau J. (1970).** Composition des lipides de différents tissus de *Mytilus galloprovincialis*. *Ann. Inst.Michel Pacha* 2: 27-35.

[86] **BOCQUENE, G. CHANTEREAU, S. BEAUSIR, E. RAFFIN, B. (2002).** MONERIKA : suivi des effets biologiques du pétrole de l'ERIKA sur la moule (*Mytilus edulis*) des zones contaminées. *Projet N° 7 ; Rapport de contrat IFREMER-MEDD-INERIS*, p. 28.

[87] CASAS, S. (2005). Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, en milieu méditerranéen. Thèse de doctorat, p. 314

[88] GOLDBERG, E. D. (1980). The International Mussel Watch. National Academy of Sciences, Washington, DC.

[89] LIVINGSTONE, D.R. (1991). Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: Gilles, R. (Ed.), Advance in Comparative and Environmental Physiology, vol. 7. Springer, Berlin, p. 45–185.

[90] NAKHLE, K. F. (2003). Le mercure, le cadmium et le plomb dans les eaux littorales libanaises : Apports et suivi au moyen de bioindicateurs quantitatifs (Eponges, bivalves et gastéropodes). Thèse de doctorat. Interactions toxiques dans les écosystèmes. Université Paris 7, p. 246.

[91] COSSA, D. & RONDEAU, J. G. (1985). Seasonal, geographical and size-induced variability in mercury content of *M. edulis* in an estuarine environment: a reassessment of mercury pollution level in the estuary and gulf of St Laurent. Mar. Biol. (88), p. 43- 49.

[92] COSSA, D. & LASSUS, P. (1989). Le cadmium en milieu marin, biogéochimie et ecotoxicologie. Etude en soutien à la définition des normes. édition Ifremer, Brest, France, p. 111.

[93] Aminot A, Chaussepied M, 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Centre National pour l'Exploitation des Océans, (CNEXO).395p.

[94] Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr N.J, Randall R.J, 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.

[95] Gülüzar A, Ozlem A, Seyhan T, Mustapha C, 2006. 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 143, 218-224. Elsevier.

- [96] **Paital B, Chainy G.B.N, 2010.** Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151,142–151. Elsevier.
- [97] **Hélène J, 2006.** Manger ou Nager faut-il choisir, Influence de la demande métabolique sur la hiérarchisation des fonctions chez le Bar *Dicentrarchus labrex*. UMR : 24p.
- [98] **Arumugan M, Romestandb B, Torreillesb J, 2000.** Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquatic Living Resource*. 13, 173–177.
- [99] **Deviller G, 2003.** Traitement par lagunage à haut rendement algal (LHRA) des effluents piscicoles marins recyclés : évaluation chimique et écotoxicologique. Thèse de doctorat, Université MontpellierI, 172p.
- [100] **Kopecka J, Lehtonen K. K, Barsiene J, Broeg K. J, Gercken J, Pempkowiak J, 2006.** Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdansk (southern Baltic). *Marine Pollution Bulletin* 53, 406–421. Elsevier.
- [101] **Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. J, Valavanidis A, 2007.** Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin* 54, 1361–1371. Elsevier.
- [102] **Verlecar X. N, Jena K. B, Chainy G.B.N, 2008.** Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76,745-752. Elsevier.
- [103] **Novas A, Barcia R, Ramos-Martínez J, 2007.** Nitric Oxide production by Haemocytes from *Mytilus galloprovincialis* shows seasonal variations. *Fish and Shellfish Immunology* 23, 886-891. Elsevier.

[104] **Pascal P, 1999.** Traitement des effluents piscicoles marins par lagunage a haut rendement algal. Thèse de doctorat, université de Montpellier I, 220p.

[105] **Gülüzar Atli, Mustafa Canli, 2007.** Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. Elsevier.

[106] **Varanka Z, Rojik I, Varanka I, Nemcsók J, Ábrahám M,2001.** Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 128, 467-478. Elsevier.

[107] **Borković S. S, Šaponjić J. S, Pavlović S. Z, Blagojević D. P, Milošević S. M, Kovačević T. B, Radojičić R. M, Spasić M. B, Žikić R. V, Saičić Z. S,2005.** The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. Comparative biochemistry and physiology, Part C 141, 366-374. Elsevier.

[108] **Barillet S, 2007.** Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'Uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). Thèse de doctorat, université Paul Verlaine de Metz, 475p.

[109] **Villa-Cruz V, Davila J, Viana M.T, Vazquez-Duhalt R, 2009.** Effect of broccoli (*Brassica oleracea*) and its phytochemical sulforaphane in balanced diets on the detoxification enzymes levels of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a carcinogenic and mutagenic pollutant. Chemosphere 74, 1145–1151. Elsevier.

[110] **Meknachi A, 2010.** Utilisation du poisson tilapia *Oreochromis niloticus* et la moule *Mytilus galloprovincialis* comme bioindicateurs du niveau de pollution par les métaux traces : modélisation de la bioaccumulation. Thèse de Magister, Université Saad Dahleb- Blida, 172p.

[111] **Gu Jing, Yu Li, Liping Xie, Rongqing Zhang, 2006.** Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 144, 184–190. Elsevier.

[112] **Sandra M. Monteiro, Juan M. Mancera, Antonio Fontainhas Fernandes, Mario Sousa, 2005.** Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of

*Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 141, 375 – 383. Elsevier.

[113] **Michiel H.S. Kraak, Yvonne A. Wink, Suzanne C. Stuijzand, Marion C. Buckert-de Jong, Chris J. de Groot, Wim Admiraal, 1994.** Chronic ecotoxicity of Zn and Pb to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Aquatic Toxicology 30, 77-89. Elsevier.

[114] **Dellali M, Roméo M, Aissa P, 2001.** Suivi de l'activité catalase des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. Oceanol. Acta 24, 263-271.

[115] **Laura E. Petes, Bruce A. Menge, Gayle D. Murphy, 2007.** Environmental stress decreases survival, growth, and reproduction in New Zealand mussels. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 351, 83–91. Elsevier.

[116] **Daniele Fattorini, Alessandra Notti, Rossella Di Mento, Anna Maria Cicero, Massimo Gabellini, Aniello Russo, Francesco Regoli, 2008.** Seasonal, spatial and inter-annual variations of trace metals in mussels from the Adriatic sea: A regional gradient for arsenic and implications for monitoring the impact of off-shore activities. Chemosphere. Elsevier

## Annexe A : Matériel et dispositif expérimental



Figure A.1: Bacs d'élevage des moules pour les tests d'écotoxicité aiguë



**Figure A.2 :** GPS de type Garmin, GPS 12. **Figure A.3 :** Multi-paramètres YSI 556.



**Figure A.4 :** Spectromètres UV- Visible. **Figure A.5 :** Thermomètre salinomètre de type Cond 330i WTW



**Figure.6 :**(A)

**Figure.6 :** (B)

**Figure.6 :** (C)

**Figure.6 (A) :** mesure de taille des moules avec le Pied à coulisse.

**Figure.6 (B) :** pesée des moules.

**Figure . 6 (C) :** Dissection des moules pour dosages biochimiques.

## Réactifs et solutions chimiques

### Dosage de l'azote ammoniacal

**Réactif (A) :** Solution de phénol-Nitroprussiate de sodium (eau distillée, 35g de Phénol, 400mg de Nitroprussiate de sodium pour 1litre) ;

**Réactif (B) :** Solution alcaline d'hypochlorite (280g de citrate trisodique, 22g de Soude, solution d'hypochlorite de sodium correspondant à 1,4g de Chlore soit 44ml d'une solution à 10° de chlore).

### Dosage des nitrites

**Réactif (C) :** Solution de Sulfanilamide (eau distillée, 5g de Sulfanilamide, 50ml D'acide chlorhydrique d=1,18 pour 500ml).

**Réactif (D) :** Solution de N-Naphthyléthylène-diamine (eau distillée, 0,5g dichlorohydrate de N-Naphthyléthylène-diamine

### Dosages des protéines par la méthode de Lowry

#### 1- Réactif de Lowry A

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Na}_2\text{CO}_3 \dots\dots\dots 1\text{g} \\ \text{NaOH (0.1N)} \dots\dots\dots 50\text{ml} \end{array} \right.$$

#### 2- Réactif de Lowry B

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O} \dots\dots\dots 5\text{g} \\ \text{Tartrate de Na et K} \dots\dots 10\text{g} \end{array} \right. \quad \text{Le tout dans 1litre}$$

### 3- Réactif de Lowry :

Mélanger le jour de la manipulation

{ 50ml Lowry A  
1ml Lowry B