

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



Université Badji Mokhtar
ANNABA

جامعة باجي مختار
عنابة

Faculté des Sciences
Département des Sciences De La Mer
Laboratoire Ecosystèmes Marins et Littoraux

THESE DE DOCTORAT

Etude de la qualité des eaux du golfe d'Annaba par l'utilisation

d'un mollusque sentinelle, la moule

(*Perna perna* L) : essai in vivo et in situ.

Application à la biosurveillance de l'environnement marin

Soutenance Mai 2009

Présentée Par

M^{me} Khati Hadj Moussa
Wyllia

Devant la commission d'examen composée de

Mr S. BENYACOU, Professeur à l'Université d'Annaba (président du jury)

Mr M. BENSOUILAH, Professeur à l'Université d'Annaba (rapporteur)

Mme M. ROMEO, Docteur d'Etat (HDR), Nice. France (rapporteur)

Mme C. COSSU, Maitre de conférences (HDR), Université de Metz. France (examinatrice)

Mr K. OUALI, Maitre de conférences A, Université d'Annaba (examineur)

Mr M. BAIRI, Maitre de Conférences A, Université d'Annaba (examineur)

«Ce sont les mots qui conservent les idées et qui les transmettent. Il en résulte qu'on ne peut perfectionner le langage sans perfectionner la science, ni la science sans le langage.»

Antoine -Laurent DE LAVOISIER

-Remerciements-

Le monde marin a toujours été pour moi un univers attractif qui a baigné ma jeunesse et qui fera toujours partie intégrante de ma vie. Lorsque j'ai commencé mes études supérieures, mon vœu était de pouvoir appliquer les Sciences à ce lieu aussi captivant qu'envoûtant et qui n'a pas fini de livrer ses secrets. L'occasion m'est donnée ici de pouvoir remercier les nombreuses personnes que j'ai rencontrées et qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici.

Je tiens avant toute chose à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Mourad Bensouilah, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez portée pendant ces années. J'ai tiré bénéfice de vos conseils avisés pour avancer petit à petit afin d'obtenir les résultats exposés dans ce manuscrit. Merci pour le temps que vous m'avez consacré lors de la correction de ce mémoire et l'autonomie que vous m'avez laissée dès le début et pendant ces quatre années.

Que Messieurs, professeur Slim Benyacoub, Docteur Bairi et Ouali Kheireddine Maître de Conférences à l'Université d'Annaba soient ici remerciés de l'intérêt qu'ils témoignent à ce travail en acceptant de participer au jury de cette thèse.

Mes plus vifs remerciements et ma reconnaissance vont à mes responsables scientifiques, en particulier Monsieur Ouali, ton aide m'aura été d'un grand secours, je t'ai demandé énormément de conseils et tu as toujours répondu présent.

A Madame Romeo Michèle, chargée de recherche au CNRS à l'Université de Nice, notre première rencontre remonte à Zarziz en 2005. J'étais alors très impressionnée et intimidée de rencontrer l'auteur des nombreuses publications que j'avais lues avec intérêt. Vous m'avez alors, très vite mise à l'aise et cela a été avec un grand plaisir et un grand intérêt scientifique de vous avoir en tant que co-directrice de thèse. Je vous remercie d'avoir accepté de vous impliquer dans ce travail malgré vos nombreuses responsabilités. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir estimée capable de réaliser cette thèse, merci d'avoir toujours été là. Vous m'avez permis de m'affirmer en tant que chercheuse ; Merci de votre formidable foi en la science, je pense que vous avez réussi à me la transmettre en partie ! Grâce à vous, j'ai pu avoir une vision globale de ce qu'était ce milieu, et c'est aussi grâce à vous, que j'ai envie d'y trouver ma place malgré les difficultés. Merci également de m'avoir accueillie en stage et d'avoir financé tous les dosages de métaux. Je pourrai continuer pendant des pages, mais je pense que vous savez toute la gratitude que je vous porte ! De manière plus générale, merci de m'avoir fait prendre goût à la recherche.

Mes plus vifs remerciements et toute ma reconnaissance à Madame Gnassia-Barrelli, merci de votre encadrement scientifique et vos expertise de chimiste m'ont permis de mieux comprendre la spéciation des métaux mais surtout l'importance des précautions nécessaires pour réaliser les prélèvements, et analyses des contaminants ainsi que la détermination des différentes concentrations lors d'expérimentation in vivo.

Des remerciements très particuliers, au Docteur Carole Cossu-Leguille, Maître de Conférences à l'Université de Metz, qui à travers une simple question par mail, nous avons liés une amitié sans contrefaçon. Merci de la confiance que tu m'as accordé. Ton soutien de tous les

instants a été un élément indispensable à la réussite de ce travail, Merci. En amitié, les actes comptent plus que les mots, alors je n'en dirai pas plus. C'est aussi à Metz que des amitiés se sont construites et ce genre de liens m'a tellement aidé qu'un simple merci ne suffira.

Merci à toi Sophie pour ton amitié, pour avoir sacrifier de ton temps à m'enseigner des techniques de dosage. Merci de ton écoute et des fous-rires que nous avons partagé ensemble.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire « R.O.S.E » pour leur précieuse aide fournis lors des dosages de métaux, je ne connais pas tous leur nom, mais, une pensée particulière leur est adressée.

Merci également à mes collègues et amies le Docteur Sbartai Hana et Azzizi Nawel, qui m'ont aidé à plusieurs reprises et soutenue moralement.

J'exprime également ma reconnaissance à Madame Bidouche linda pour m'avoir successivement accueilli au niveau du laboratoire de pollution atmosphérique de la Wilaya d'Annaba et qui m'a permis de réaliser mes dosages de biomarqueurs après une interruption de 9mois.

Je remercie quand même l'équipe du laboratoire de Biologie appliquée de m'avoir ouvert ses portes au début de mes premières manips et de m'avoir permis l'utilisation de l'homogénéisateur durant quelques mois de travail, avant de me les refermer quelques temps après.

Merci à l'ingénieur du laboratoire de Biologie Végétale, Madame Nadia pour sa gentillesse et sa disponibilité sans limite. Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes du laboratoire E.M.M.AL, car les croiser dans le couloir est toujours agréable ! Je remercie également la précieuse Zohra, qui m'a tant aidé dans mes manips.

Un grand merci à Madame Aribi Nadia, Professeur au niveau du Département de Biologie animal qui a su se montrer extrêmement patiente face à mes nombreuses questions de statistiques.

A mes beaux parents, qui ont été un soutien sans faille tout au long de ces quatre années, je veux vous dire Merci, surtout pour les moments où vous deviez me garder mes enfants lors de mes nombreux déplacements à l'étranger. C'est en partie grâce à vous si je suis arrivée au bout, et vous savez que cela a été loin d'être facile. J'espère juste que vous êtes fiers de moi...

Une pensée particulière pour le Docteur et amie Nouacer Sabah, qui a été une deuxième maman pour mes enfants grâce à toi, j'ai pu effectuer mon long stage à Metz sans avoir le cœur serré. Merci de ton amitié.

Une pensée affectueuse à Georges Bailly, le meilleur ami à mon père, qui a tous fait pour ne pas me laisser dormir à la belle étoile le jour où je devais effectuer mon dernier stage de finalisation, pour sa gentillesse et son humour incomparable.

Et puis, le travail exposé dans ce mémoire n'aurait pu être réalisé sans le soutien et l'amicale attention de nombreuses personnes, à tous ceux que j'ai oubliés et à ceux qui lisent la page des remerciements comme ça, juste pour voir, un petit merci car vous avez tous participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

*Je remercie enfin les **mytilus** du genre perna de leur indispensable coopération et d'avoir bien voulu se laisser ramasser sans difficulté (quoique ??). Sacrifiés pour la Science...*

La dernière pensée va à celui qui est dans mon cœur, Jalel. Merci de ta présence, de ton soutien au quotidien, d'avoir supporté bien des fois mon sale caractère et mon humeur désagréable. Sans toi mes moules n'auraient pu arriver jusqu'à ma paillasse; Merci pour les nombreux prélèvements, pendant les mauvais temps où il faisait très froid et à mer très agitée, nul n'aurait pu avoir le courage de plonger et de me ramasser des bivalves dans des eaux de rejets usées et d'être la première enseignante chercheur d'avoir fait un échantillonnage de moules au niveau même du célèbre Oued Seybouse.

Incontestablement, la thèse est un aboutissement, et je ne peux m'empêcher de penser à demain....

Avant-propos

Une partie des résultats rapportés dans ce mémoire a donné lieu à une publication dans une revue scientifique à comité de lecture et des communications dans des congrès scientifiques internationaux :

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

KHATI W., OUALI K., BENSOUILAH M., GNASSIA-BARELLI M. et ROMEO M. Effet du Cadmium sur certains biomarqueurs de stress chez la moule *Perna perna* du golfe d'Annaba (Algérie). Mesogée N° 63:51-57. **2008**.

SOUISSI M., **KHATI HADJ MOUSSA W.**, OUALI K., ROUACHDIA R., DJABOURABI A. BENSOUILAH M. Proportioning of biomarkers (GSH, GST, AchE, catalase) indicator of pollution at *Gambusia affinis* (Teleostei fish) exposed to cadmium. Environmental Research Journal 2 (4): 177-181, **2008**.

Communication orale

KHATI W., BENSOUILAH M., GNASSIA-BARELLI M. et ROMEO M. Variation saisonnière des métaux et leurs effets sur les mécanismes de défense chez une espèce sentinelle la moule *Perna perna* récoltée au niveau de la Seybouse (Algérie) ». Congrès International « Impacts Anthropiques sur le milieu Marin. ISMAL le 27-28 octobre **2008**.

K. HADJ MOUSSA W., ROMEO M., BENSOUILAH M. Effet d'un xénobiotique sur le métabolisme du glutathion chez la moule, *P. perna* : Application à la biosurveillance de l'environnement marin. Séminaire nationale de l'interaction Biologie Environnement (SNIBE). Skikda, **2008**.

K. HADJ MOUSSA W., GNASSIA-BARELLI M., ROMEO M., BENSOUILAH M. Défense antioxydante chez *P. perna* dans la biosurveillance du golfe d'Annaba. Congrès internationale de Biotechnologie, Tunis ; **2008**.

KHATI W., BENSOUILAH M., GNASSIA-BARELLI M. et ROMEO M. Les métaux inducteurs de stress chez la moule, *Perna perna* du golfe d'Annaba (Algérie). Premier séminaire International sur la Biodiversité et Ecosystèmes Littoraux ; Oran du 27 au 29 novembre **2007**.

Communications affichées

KHATI W., BENSOUILAH M., GNASSIA-BARELLI M. et ROMEO M. Etude des effets des contaminants chimiques chez une espèce sentinelle (*Perna perna*) du golfe d'Annaba. 1^{er} Séminaire international sur la Biodiversité, Environnement et santé, El Tarf du 12 au 14 Novembre **2007**.

KHATI W., OUALI K., GNASSIA-BARELLI M ; DJEBAR A. et ROMEO M. Intérêt des systèmes antioxydants dans le cadre d'une approche multi marqueurs chez des bivalves du golfe d'Annaba exposées aux polluants (Algérie). 1^{er} Congrès Méditerranéen d'Océanographie de l'USTHB, Alger : 20- 22 novembre **2006**.

KHATI W., GNASSIA-BARELLI M ; DJEBAR A. et ROMEO M. Mécanismes d'action des systèmes enzymatiques de défenses chez, *Perna perna* vis-à-vis du stress des métaux- Algérie-. 31ème Congrès de l'union des Océanographes de France, Santé et Environnement Marin à Nantes : 2 – 3 novembre **2006**.

KHATI W., GNASSIA-BARELLI M ; DJEBAR A. et ROMEO M. Mécanismes d'action des systèmes enzymatiques de défenses vis-à-vis du stress des métaux- Algérie- 31ème Congrès de l'union des Océanographes de France, Santé et Environnement Marin à Nantes **2006**.

LISTE DES ABREVIATIONS

• MES	matières en suspension
• OMS	mondiale de la santé
• ADN	acide désoxyribonucléique
• HAP	hydrocarbures aromatiques polycycliques
• PCBs	polychlorobiphényles
• MDA	malondialdéhyde
• GST	glutathion transférase
• GSH	glutathion réduit
• ROS	reactive Oxygen Species » ou Espèces Réactives de l'Oxygène
• ADP	adénosine diphosphate
• $O_2^{\cdot -}$	L'anion superoxyde
• H_2O_2	peroxyde d'hydrogène
• OH^{\cdot}	radical hydroxyle
• SOD	superoxyde dismutase
• SeGPx	glutathion peroxydase sélénium-dépendante
• SeGPxInd	glutathion peroxydase sélénium-indépendante
• GSSG	glutathion oxydé
• GRd	glutathion réductase
• GCL	glutamate cystéine ligase
• GCS	glutamyl cystéine synthétase
• γ -GC	γ - glutamyl cystéine
• Pi	phosphate inorganique
• $\mu g/L$	microgramme par litre
• Mm	milimoles
• mg/l	milligramme par litre
• Pr	Prélèvement
• I.C	indice de condition
• EDTA	acide diéthylènediaminetétraacétique
• DTNB	acide 5,5 dithiobis-2- dinitrobenzène
• CDNB	chloro -2,4- dinitrobenzène
• GS-DNB	1-glutathion-2,4- dinitrobenzène
• HCl	acide chloridrique
• nmoles	nano moles
• min	minutes
• LOG	logarithme
• TLM	temps Létal Moyen
• mm	millimètre
• Lt	longueur totale
• Pt	poids total
• p.s	poids sec
• Im	indice métallique
• SOS	stress on stress
• $CdCl_2$	chlorure de cadmium
• BaP	Benzo(a)pyrène
• CL	concentration létale

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution de l'activité biologique en fonction des concentrations en métaux essentiels (A) et non essentiels (B).....	7
Figure 2 : Représentation schématique des trois groupes de facteurs interagissant dans le processus de bioaccumulation des métaux traces chez la moule.....	9
Figure 3 : Schéma général des dommages provoqués par les espèces réactives de l'oxygène.....	20
Figure 4 : Différentes étapes de la synthèse du glutathion réduit (GSH).....	23
Figure 5 : Disposition des insertions musculaires sur la face ventrale de la coquille de <i>Perna perna</i>	28
Figure 6 : Position taxonomique et description de <i>Perna perna</i>	29
Figure 7 : Cartes représentative de la côte Algérienne.....	30
Figure 8 : Situation géographique des sites au niveau du golfe d'Annaba.....	31
Figure 9 : Site de prélèvement au niveau de la plage El Hnaya.	34
Figure 10: Diagramme représentant les différentes dates de prélèvement dans le golfe d'Annaba au cours des saisons.....	35
Figure 11: Les différents paramètres linéaires de <i>Perna perna</i>	36
Figure 12: Moules exposées à l'anoxie lors de l'expérience du SOS	43
Figure 13: Dispositif expérimental des deux expériences réalisées au laboratoire	44
Figure 14: Evolution saisonnière de la température des eaux du golfe d'Annaba	46
Figure 15: Variation saisonnière de la salinité des eaux du golfe d'Annaba.....	47
Figure 16 : Evolution saisonnière des indices de condition au niveau des sites de l'étude.....	52
Figure 17: Variation saisonnière de la concentration en cadmium dans les moules provenant des différents sites de l'étude.....	54
Figure 18: Variation saisonnière de la concentration en cuivre dans les moules provenant des différents sites de l'étude.....	55
Figure 19: Variation saisonnière de la concentration en zinc dans les moules provenant des différents sites de l'étude.....	56
Figure 20: Activités de la GST en nmoles/min/mg de protéines dans les branchies (Br) et les glandes digestives (GD) de <i>Perna perna</i> prélevée aux différentes saisons des cinq sites de l'étude.....	58
Figure 21: Taux de glutathion en nmoles/mg de protéines dans les branchies (Br) et les glandes digestives (GD) de <i>Perna perna</i> prélevée aux différentes saisons de cinq sites de l'étude.....	59

Figure 22: Comparaison des TL 50 des moules collectées au niveau de tous les sites de l'étude.....	61
Figure 23: Effet de l'exposition au cadmium sur la variation du taux de GSH (nmoles/mg protéines) dans les branchies des moules exposées 7jours.....	62
Figure 24: Effet de l'exposition au cadmium sur l'activité de la GST (nmoles/min/mg protéines) dans les branchies des moules exposées 7jours.	63
Figure 25: Effet de l'exposition au cuivre sur la variation du taux de GSH (nmoles/mg protéines) dans les branchies des moules exposées pendant 7jours.....	64
Figure 26: Effet de l'exposition au cuivre sur l'activité de la GST (nmoles/min/mg protéines) dans les branchies des moules exposées pendant 7jours.....	64
Figure 27: Effet de l'exposition au cadmium sur la variation du taux de GSH (nmoles/mg protéines) dans les branchies des moules exposées pendant 7jours.....	65
Figure 28 : Effet de l'exposition au cadmium sur l'activité de la GST (nmoles/min/mg protéines) dans les branchies des moules exposées pendant 7jours.....	66
Figure 29: Différentes droites de régression reliant les biomarqueurs et les concentrations de cadmium testées dans l'expérience.....	66
Figure 30: Bioaccumulation du cadmium en été et sa relation avec les teneurs en GSH et les activités GST.	67
Figure 31: Bioaccumulation du cuivre en été et sa relation avec les teneurs en GSH et les activités GST.	68
Figure 32: Bioaccumulation du cadmium en hiver et sa relation avec les teneurs en GSH et les activités GST.	69
Figure 33 : Accumulation du Cadmium en été et en hiver.....	70.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Concentrations en métaux traces dissous dans l'eau de mer et distribution en fonction de la profondeur.....	1
Tableau II : Comparaison des concentrations pour les 5 métaux étudiés chez les mollusques bivalves des deux réseaux de surveillance français.....	2
Tableau III : Utilisation industrielle des métaux lourds (d'après Chambost-Manciet, 2002).....	3
Tableau IV : Liste des différents biomarqueurs mesurés chez les mollusques.....	4
Tableau V : Analyse du matériel standard de référence Tort 2 (Hépatopancréas de homard fourni par le Conseil National de Recherches du Canada).....	5
Tableau VI : Méthodes de références et unités utilisées pour l'analyse des biomarqueurs.....	6
Tableau VII : Variation saisonnière de la Température dans les eaux du golfe d'Annaba.....	annexe1
Tableau VIII : Variation saisonnière de la salinité dans les eaux du golfe d'Annaba.....	annexe1
Tableau IX : Paramètres biométriques qui ont fait l'objet de l'étude, date et site de collecte. N= nombres d'individus, moyenne géométrique, IC = indice de condition.....	48
Tableau X : Equation de régression reliant la longueur (L), à la largeur (l) et à la hauteur (h) de la coquille chez <i>P. perna</i> au cours des quatre saisons.....	50
Tableau IX : Expressions mathématiques de la relation taille (en mm) – poids (en gr) chez <i>P. perna</i> aux cours des saisons.....	51
TableauX : Nombre d'échantillons mesurés pour l'analyse des métaux	53
Tableau XI: Concentrations en métaux chez les moules des deux sexes prélevées en Hiver. Les valeurs médianes trouvées sur l'ensemble des côtes de France par l'IFREMER pour les moules <i>Mytilus</i> sp.....	annexe3
Tableau XII : Concentrations en métaux ($\mu\text{g/g p.s}$) chez les moules prélevées en été.....	annexe3
Tableau XIII : Concentrations en métaux ($\mu\text{g/g p.s}$) chez les moules prélevées au printemps....	annexe3
Tableau XIV : Concentrations en métaux ($\mu\text{g/g p.s}$) chez les moules prélevées à l'automne....	annexe3
Tableau XV : Activités GST en nmoles/min/mg de protéines dans les branchies (Br) et les glandes digestives (GD) de <i>Perna perna</i> aux différentes saisons.....	annexe4
Tableau XVI : Teneurs en GSH en nmoles/mg de protéines dans les branchies (Br) et les glandes digestives (GD) de <i>Perna perna</i> aux différentes saisons.....	annexe4
Tableau XVII : Comparaison des concentrations métalliques (moyenne ou domaine de variation) de <i>Perna perna</i> provenant de différente localité.	57
Tableau XVIII : Concentration en métaux <i>in toto</i> (exprimée en poids sec) chez <i>Perna perna</i> après 7 jours d'exposition en été au Cd.	67

Tableau XIX : Résultats de l'accumulation du cuivre <i>in toto</i> (exprimées en poids sec) chez <i>Perna perna</i> après 7 jours d'exposition en été au Cu.....	68
--	----

Tableau XX: Concentration en métaux <i>in toto</i> (exprimées en poids sec) chez <i>Perna perna</i> après 7 jours d'exposition au Cd pendant l'hiver.....	69
---	----

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I. Les métaux en milieu marin	4
1.1 Les métaux en méditerranée	6
1.2. Rôle biologique.....	7
1.3. Métabolisme des métaux chez les moules.....	7
1.3.1. Bioconcentration.....	8
1.3.2. Bioaccumulation.....	9
1.3.3. Stockage et excrétion.....	9
1.4. Choix des métaux étudiés.....	10
1.4.1. Cadmium.....	11
1.4.2. Cuivre.....	12
1.4.3. Zinc.....	13
1.4.4. Facteurs influençant la bioaccumulation des métaux.....	14
1.4.5. Mécanismes de détoxification des métaux.....	15
II. Biomarqueurs : Outils pour évaluer la toxicité des polluants.....	15
2.1. Stress oxydant et systèmes de défenses antioxydants.....	18
2.1.1. Sources des espèces réactives de l'oxygène.....	19
2.1.2. Espèces Réactives de l'Oxygène.....	19
2.1.3. Principaux systèmes antioxydants.....	20
2.2. Variation des systèmes de défenses en condition de stress.....	25
2.3. Intérêt des expériences de laboratoire.....	27
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	
1. Identification et biologie du modèle biologique.....	28
2. Présentation de la zone de l'étude.....	30
2.1. Caractéristiques générales du littoral Algérien.....	30
2.2. Stratégie d'échantillonnage.....	35
2.3. Mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau.....	35
2.4. Mesure des paramètres biologique	36

3. Analyse des métaux.....	38
4. Analyse des Biomarqueurs.....	40
4.1. Protéines.....	40
4.2. Glutathion.....	41
4.3. Glutathion transférase.....	41
4.4. Stress on stress.....	42
5. Expériences de Laboratoire.....	44

CHAPITRE III : RESULTATS DE TERRAIN

1. Données physico-chimiques.....	46
1.1. La température.....	46
1.2. La salinité.....	47
2. Analyse des paramètres biométriques	47
2.1. Caractères métriques.....	49
2.2. Indice de condition.....	51
3. Accumulation des métaux chez <i>Perna perna</i>.....	52
3.1. Accumulation du cadmium.....	53
3.2. Accumulation du cuivre.....	54
3.3. Accumulation du zinc.....	55
4. Biomarqueurs	57
4.1. Glutathion Transférase.....	58
4.2. Glutathion Réduit.....	59
4.3. Mesure du biomarqueur du stress générale.....	60

CHAPITRE IV : EXPERIENCES DE LABORATOIRE

1. Influence des métaux sur la réponse biomarqueur.....	61
1.1. Effet du cadmium sur les taux du GSH et l'activité de GST (expérience été).....	62
1.2. Effet du cuivre sur les taux du GSH et l'activité de GST (expérience été).....	63
1.3. Effet du cadmium sur les taux du GSH et l'activité GST (expérience hiver).....	65

2. Bioaccumulation des métaux.....	
2.1. Accumulation du cadmium (expérience d'été).....	67
2.2. Accumulation du cuivre en été.....	68
2.3 Accumulation du cadmium en hiver.....	69

CHAPITRE.V :DISCUSSION.....	71
------------------------------------	-----------

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

REFERENCES

ANNEXES

RESUMES

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les zones côtières sont exposées à toute une série de menaces, parmi lesquelles la commission mondiale de l'environnement et de l'aménagement a pu citer en 1987 la surexploitation, la pollution due aux activités sur le continent, les apports sédimentaires et les émissions transportées par l'atmosphère. Les réponses aux grandes questions scientifiques que pose la protection de l'environnement littoral passent nécessairement par une meilleure connaissance des mécanismes de toxicité, afin d'améliorer l'évaluation prédictive des impacts. Aujourd'hui, les connaissances acquises sur le fonctionnement des écosystèmes permettent une meilleure appréciation de la capacité d'acceptation du milieu. Ceci pose la question des stratégies de surveillance de l'environnement, mais également des méthodologies permettant de connaître les tendances d'évolution à long terme des paramètres de qualité du milieu et des niveaux de contamination des populations. L'écotoxicologie marine est maintenant en mesure de proposer un premier élément de réponse à l'évaluation de l'effet des polluants par le développement d'indicateurs biologiques ou bioindicateurs.

Le concept de "biomarqueurs" retient depuis ces dernières années l'attention croissante des écotoxicologues car il constitue un outil très intéressant pour la détection des effets de l'exposition d'organismes aux polluants. Un biomarqueur peut être défini comme une réponse provoquée par un composé xénobiotique et dont la mesure indique qu'un organisme ou une population a subi un stress.

L'objectif d'un programme de surveillance biologique est d'évaluer l'état de santé de l'écosystème marin et de prédire les effets à long terme des polluants. La qualité d'un biomarqueur est donc d'intégrer les différents stress environnementaux auxquels sont soumis les organismes marins. L'interprétation de la réponse mesurée par un biomarqueur est parfois délicate car tout test de toxicité a ses propres limites. Dans le but d'améliorer le diagnostic des effets biologiques, il est donc recommandé de développer des tests de toxicité complémentaires et de mesurer chimiquement les concentrations de polluants dans les tissus ou le sédiment marin.

Aujourd'hui, les milieux aquatiques drainent et recueillent la majorité de contamination chimique. Cependant, bien qu'il existe une altération de la biodiversité dans certains de ces milieux, on constate que les organismes qui subsistent se sont adaptés à ces stress constants.

Certaines espèces sont même capables de survivre et de se reproduire dans des milieux considérablement dégradés. L'adaptation des êtres vivants à ces milieux se traduit, entre autres, par la mise en place et le développement de systèmes de défense.

Une bonne connaissance de la biologie des espèces est donc, une condition essentielle à leur sélection comme bioaccumulateur. Des connaissances sur le mode de vie, la stratégie de nutrition, la reproduction, la croissance, la durée de vie sont aussi nécessaires. Les bioaccumulateurs idéaux doivent donc répondre à plusieurs critères de sélection (Philips, 1980 ; Phillips et Rainbow, 1994). Ils doivent être :

- sessiles ou sédentaires afin de représenter la région où ils se développent,
- abondants, faciles à identifier, présents tout le long de l'année et suffisamment gros pour offrir une quantité adéquate de tissus pour les analyses.
- robustes et tolérants aux variables physico-chimiques, permettant ainsi les expériences de transplantation *in situ* et *in vitro*.

Dans ce contexte, deux axes différents, l'étude de biomarqueurs *in situ* et l'analyse de métaux (cuivre, zinc, cadmium) ont été choisis dans cette étude pour évaluer l'effet de la pollution sur l'état de santé du golfe d'Annaba à travers la moule *Perna perna*.

L'objectif de cette tâche est d'étudier des caractères biologiques différents, qui vont refléter une réponse plus globale de l'organisme et qui sont supposés mieux rendre compte des effets de la contamination sur les organismes et potentiellement, sur les populations (Amiard et Amiard-Triquet, 2008), d'une part et d'autre part, de contribuer à compléter les données sur la pollution marine des zones côtières de la baie d'Annaba. La présence de métaux lourds surtout le zinc, le cuivre, le plomb et le cadmium rend, importante l'analyse des métaux dans les tissus de la moule *Perna perna* prise en tant que modèle ayant un potentiel utilisable en biosurveillance de l'environnement.

La complexité du métabolisme des polluants chimiques et des mécanismes de détoxification chez les organismes incite à considérer l'interface chimie/biologie comme une composante majeure de la surveillance de l'état de santé des écosystèmes aquatique, permettant de diminuer les incertitudes dans le processus de gestion du risque. Ainsi, nous avons choisi d' :

- Etudier les processus biologiques : suivis de la croissance: suivis biométrique et pondéral afin de déterminer les différents modèles d'allométrie et les différents indices de conditions en fonctions de 4 saisons différenciées.
- De valider le test de vitalité ou **test du stress on stress** qui est un test intégré dans les programmes de biosurveillance des écosystèmes côtiers, il n'est certes pas un biomarqueur spécifique mais, il permet une évaluation globale de l'état de santé des organismes et de leur milieu de vie.
- D'étudier les variations de biomarqueurs d'exposition et plus particulièrement, les systèmes antioxydants qui sont des systèmes de détoxification uniformément répandus dans le monde vivant, de nombreux travaux ont confirmé leur intérêt comme biomarqueurs d'exposition et de toxicité en écotoxicologie aquatique : d'une part, lors d'étude en conditions contrôlées au laboratoire (essais permettant d'identifier les niveaux d'exposition sans dangers ou au contraire associés à l'apparition d'effets indésirables, réversibles ou non), d'autre part lors d'étude de terrain sur des sites présentant des profils de contamination différents. Les systèmes antioxydants étudiés sont ceux impliquant le glutathion et les enzymes associées à son métabolisme (les activités glutathion S-transférases) au niveau de deux organes, la branchie et la glande digestive. Nous avons donc mesuré la concentration en glutathion (GSH) et les activités glutathion S-transférases chez les moules.
- Nous nous sommes proposés, d'analyser l'accumulation de quelques éléments métalliques tels que (Cd, Zn et Cu) mesurables à l'état de traces, et il a été démontré que les niveaux mesurés dans les tissus sont corrélés avec l'exposition (Kraal *et al.* 1995 ; Odzak et Zvonaric, 1995 ; Liang *et al.* 1999), et sont très ubiquitaires dans le milieu marin.

Enfin, les résultats obtenus nous ont permis de montrer que le glutathion (et la GST) jouent un rôle central dans la détoxification des métaux lourds (surtout du cuivre) et de les proposer en tant qu'outils biologiques dans l'évaluation de la qualité du milieu et dans le suivi de la pollution de notre littoral.

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La complexité du métabolisme des polluants chimiques et des mécanismes de détoxification chez les êtres vivants incite à considérer l'interface chimie/biologie comme une composante majeure de la surveillance des effets des polluants. Nous avons donc étudié les deux aspects: la chimie par l'accumulation des polluants au niveau de nos organismes les moules *Perna perna* et la réponse « biologique » des organismes aux polluants constituée par les biomarqueurs.

I. Les métaux en milieu marin

L'Homme de par ses activités professionnelles ou domestiques évolue dans un environnement fait d'un mélange de substances, véritable « soupe chimique » d'origine naturelle ou anthropique, minérale ou/et organique. La nature de toutes ces substances est loin d'être connue de manière exhaustive, puisqu'elle résulte d'un ensemble de réactions de dégradations chimiques et biologiques, s'effectuant parallèlement à leur échange entre les trois grands compartiments air, eau, sol (écosystèmes terrestres), sédiments (écosystèmes aquatiques) et à leur diffusion au sein de ces milieux.

La pollution de l'environnement aquatique par les substances toxiques est un des problèmes majeurs auxquels doit faire face la société actuelle. Ces substances entrent dans les systèmes aquatiques par des sources ponctuelles et diffuses, tendent à s'accumuler dans les sédiments et, dans plusieurs cas, à se concentrer dans les chaînes alimentaires aquatiques. Cette dégradation de la qualité des ressources a des répercussions sociales et économiques importantes. En principe, des actions doivent être entreprises pour restaurer la qualité des milieux aquatiques. Pour être efficaces, ces actions, qui sont coûteuses, doivent s'appuyer sur une connaissance des processus qui contrôlent les échanges des substances toxiques entre les sédiments, l'eau et les organismes aquatiques. Elles doivent également s'appuyer sur une évaluation objective de leurs effets sur l'écosystème aquatique.

Le milieu marin, biotope particulièrement riche, est caractérisé à la fois par une remarquable stabilité de ses propriétés fondamentales et une grande variabilité de ses micros constituants. L'eau de mer contient en solution des combinaisons de tous les éléments chimiques mais seulement certains d'entre eux, au nombre de douze, ont des concentrations égales ou supérieures au mg.L^{-1} . Ces douze éléments majeurs interviennent pour 99,4 % en masse du

total de la croûte terrestre (O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, Ti, H, P et Mn par ordre d'abondance). Les éléments traces, au nombre de 68, ne représentent en masse que 0,6 % du total et sont à des concentrations inférieures à 10^{-6} M dans l'eau de mer (Miquel, 2001; Neff, 2002).

Ces éléments traces sont engagés dans des réactions biochimiques et contribuent à l'équilibre du milieu marin. Mais l'apport de contaminants métalliques, par l'intermédiaire des effluents industriels et de l'atmosphère, des fleuves et de leur estuaire, peut modifier la composition de l'eau de mer qui peut devenir toxique pour les plantes et les animaux.

L'étude de l'interaction entre les contaminants et les barrières biologiques est d'un intérêt considérable pour la compréhension des phénomènes écotoxicologiques, particulièrement la bioaccumulation et les transferts à travers les chaînes trophiques. Les processus impliqués sont très complexes et sont influencés par le contaminant (taille de la molécule, spéciation chimique, etc.), l'organisme récepteur (propriétés membranaires, composition chimique, processus actifs, etc.) et l'environnement intra et extracellulaire (température, pH, etc.).

Un métal est un élément chimique, issu le plus souvent d'un minerai doté d'un éclat particulier, bon conducteur de chaleur et d'électricité, ayant des caractéristiques de dureté et de malléabilité, se combinant aisément avec d'autres éléments pour former des alliages utilisés par l'homme depuis l'Antiquité.. C'est le cas du fer (Fe), du cuivre (Cu), du zinc (Zn), du nickel (Ni), du cobalt (Co), du vanadium (V), du sélénium (Se) (Métalloïdes), du molybdène (Mo), du manganèse (Mn), du chrome (Cr), de l'arsenic (As) et du titane (Ti) (Miquel, 2001). D'autres ne sont pas nécessaires à la vie et peuvent être même préjudiciables comme le mercure (Hg), le plomb (Pb), le cadmium (Cd) et l'antimoine (Sb) (Métalloïdes).

Les métaux sont présents dans l'ensemble des milieux aquatiques dont le milieu marin. Ils se présentent sous deux formes chimiques : dans la phase dissoute et au sein de la fraction particulaire. Les métaux appartenant à la fraction particulaire sont adsorbés au niveau de particules non dissoutes en suspension dans l'eau de mer. Ces particules peuvent être minérales ou organiques et peuvent être ingérées par des organismes marins. Ceci est le cas des bivalves qui sont des animaux filtreurs s'alimentant grâce à la filtration d'importantes quantités d'eau. La contamination des organismes par les métaux peut être étendue à la phase dissoute. Dans cette phase, sont présents des ions potentiellement complexables par des ligands qui présentent une grande affinité pour les ions métalliques

1.1. Les métaux en Méditerranée

La Méditerranée est une mer semi fermée, entourée de trois continents, les apports atmosphériques et telluriques sont donc importants.

Les premières mesures fiables d'éléments traces, réalisées en 1983, ont montré des profils verticaux très différents en Méditerranée de ceux mesurés dans les océans Atlantique et Pacifique (Ruiz-Pino *et al.* 1990; Ruiz-Pino *et al.* 1990; Ruiz-Pino *et al.* 1991). Dans ces deux océans, pour le zinc et le cadmium, par exemple, les profils verticaux s'apparentent à ceux des éléments nutritifs, à savoir de très faibles concentrations en surface et une augmentation progressive en profondeur. En Méditerranée, ces métaux traces sont plus concentrés dans les couches supérieures que dans les couches inférieures où ils restent en quantité relativement stable. Ces profils particuliers en Méditerranée ont été interprétés par un état non stationnaire, les apports superficiels étant plus forts que le transfert vertical par l'activité biologique et les mouvements hydrologiques. Cette caractéristique a permis aux chercheurs d'analyser avec plus de facilité l'évolution de la concentration des métaux traces (mercure, cadmium, plomb, cuivre et zinc) provenant de l'atmosphère et des rivières: dus pour l'essentiel aux activités humaines (Tableau.1).

Tableau 1: Concentrations en métaux traces dissous dans l'eau de mer et distribution en fonction de la profondeur (Roméo, 1991)

Métal	Concentration	Distribution	Références
Cd	8 ng. L ⁻¹	Homogène Méditerranée	Béthoux <i>et al.</i> , (1990)
Cu	100 ng. L ⁻¹	Homogène Méditerranée	Béthoux <i>et al.</i> , (1990)
Zn	200 ng. L ⁻¹	Homogène Méditerranée	Béthoux <i>et al.</i> , (1990)
Hg	0,5 – 2,5 ng. L ⁻¹	Atlantique	Cossa <i>et al.</i> , (1990)
Pb	50 – 100 ng. L ⁻¹ 30 ng. L ⁻¹	Surface Profondeur Méditerranée	Béthoux <i>et al.</i> (1990)

1.2. Rôle biologique

Les études portant sur le rôle et l'assimilation des éléments métalliques ont été réalisées majoritairement dans le but de comprendre l'impact des pollutions par les métaux sur les communautés marines.

Les métaux peuvent avoir un rôle bénéfique pour la croissance, le métabolisme, ils sont appelés métaux essentiels, ce sont principalement le fer, le cuivre, le cobalt, le manganèse,

En revanche certains métaux n'ont pas de rôle biologique connu à ce jour, ce sont notamment le cadmium, le plomb et le mercure. La figure ci-dessous représente l'évolution de l'activité physiologique d'un organisme en fonction de la concentration en métal dans le milieu (fig. A : métaux essentiels, fig. B métaux non essentiels).

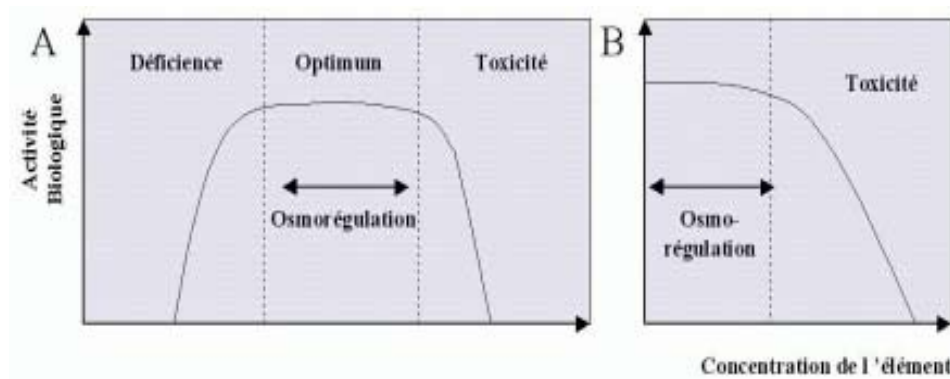


Figure 1: Evolution de l'activité biologique en fonction des concentrations en métaux essentiels (A) et non essentiels (B) (selon, Charissou, 2004).

Pour ces deux groupes, des effets néfastes sur l'activité biologique apparaissent lorsque ce processus de régulation sature. Pour les métaux essentiels, ces effets néfastes interviennent à la fois en présence de trop faibles ou de trop fortes concentrations dans l'environnement. Il y a une concentration optimale qui permet un métabolisme correct ; alors que, dans le cas des métaux non-essentiels, les organismes vivent à une concentration tolérable dans le milieu, au-delà de cette concentration des phénomènes de toxicité apparaissent.

1.3 Métabolisme des métaux chez les moules

Les organismes vivants possèdent des mécanismes d'absorption, de transport et d'élimination des métaux (Roesijadi, 1992 ; Hassler *et al.* 2005).

1.3.1.Bioconcentration

La bioconcentration est un cas particulier de bioaccumulation, elle peut être définie comme étant l'assimilation et l'accumulation d'une substance chimique par un organisme à partir de son environnement ou de son alimentation. La biodisponibilité des métaux est le facteur clé qui détermine les concentrations tissulaires métalliques. C'est donc l'accroissement direct de la concentration d'un contaminant lorsqu'il passe de l'eau à un organisme aquatique. Le facteur de concentration (FBC) peut être défini comme une constante issue du rapport de la concentration d'un élément dans un organisme en état d'équilibre à sa concentration dans le biotope (Veith *et al.* 1979; Ramade, 1992). Dans ce cas là, la biodisponibilité des métaux pour les organismes marins dépend de la forme chimique sous laquelle ils se trouvent ainsi que de leur richesse dans le milieu. La forme chimique des métaux est liée aux propriétés physico-chimiques du milieu. Si les métaux sont souvent indispensables au déroulement des processus biologiques (oligo-éléments), nombre d'entre eux peuvent s'avérer contaminants pour diverses formes de vie, lorsque leur concentration dépasse un seuil, lui-même fonction de l'état physico-chimique (spéciation) de l'élément considéré (Chiffoleau *et al.* 2001).

A titre d'exemple, le tableau II, compare les niveaux de contamination métallique dans les moules, trouvés dans le cadre des réseaux de surveillance le long de la côte française permettant d'observer les différences entre les différents réseaux de surveillance de la Méditerranée.

Tableau II : Comparaison des concentrations pour les 5 métaux étudiés chez les mollusques bivalves des deux réseaux de surveillance français. Concentrations exprimées en mg.kg⁻¹ de poids sec de chair (RNO, 1974-2004; Andral et Stanisière, 1999; Andral *et al.* 2001).

	Hg (mg.kg ⁻¹) Moy. Min-Max	Pb (mg.kg ⁻¹) Moy. Min-Max	Cd (mg.kg ⁻¹) Moy. Min-Max	Cu (mg.kg ⁻¹) Moy. Min -Max	Zn (mg.kg ⁻¹) Moy. Min - Max
RNO Méditerranée	0,1 0,03- 0,6	0,9 0,03- 17,3	2,62 0,1 - 34,6	5,9 2,3 - 29,7	153,3 47- 371
RNO Atlantique	0,1 0,01- 0,3	0,9 0,01- 2,5	2,18 0,6- 6,8	7,2 5 - 9,9	113,4 40- 407
RINBIO 1998	0,2 0,1 - 0,5	1,2 0,9 - 3,7	1,8 0,7- 2,8	6,7 4,2 -14,5	123,3 85,2 - 178,8
RINBIO 2000	0,1 0,05- 0,34	0,9 0,1 - 5,85	1 0,5- 5,4	7,4 5,2-18,3	148,3 116,1-203,2

1.3.2 Bioaccumulation

La bioaccumulation est le processus par lequel un organisme vivant absorbe une substance à une vitesse plus grande que celle avec laquelle il l'excrète ou la métabolise. Elle désigne donc la somme des absorptions d'un élément par voie directe et alimentaire par les espèces animales aquatiques ou terrestres (Ramade, 1992). La bioaccumulation est donc le résultat des processus par lesquels le contaminant entre dans l'organisme et des processus de décontamination, une combinaison des mécanismes d'excrétion vers l'environnement et de biotransformation endogène (Ribeyre et Boudou, 1989). Dans le cas d'accumulateurs de métaux tel que les bivalves, l'excrétion ne compense pas leur assimilation.

Trois groupes de facteurs intimement liés, interviennent dans les interactions entre les composés métalliques et les barrières biologiques (Figure. 2) :

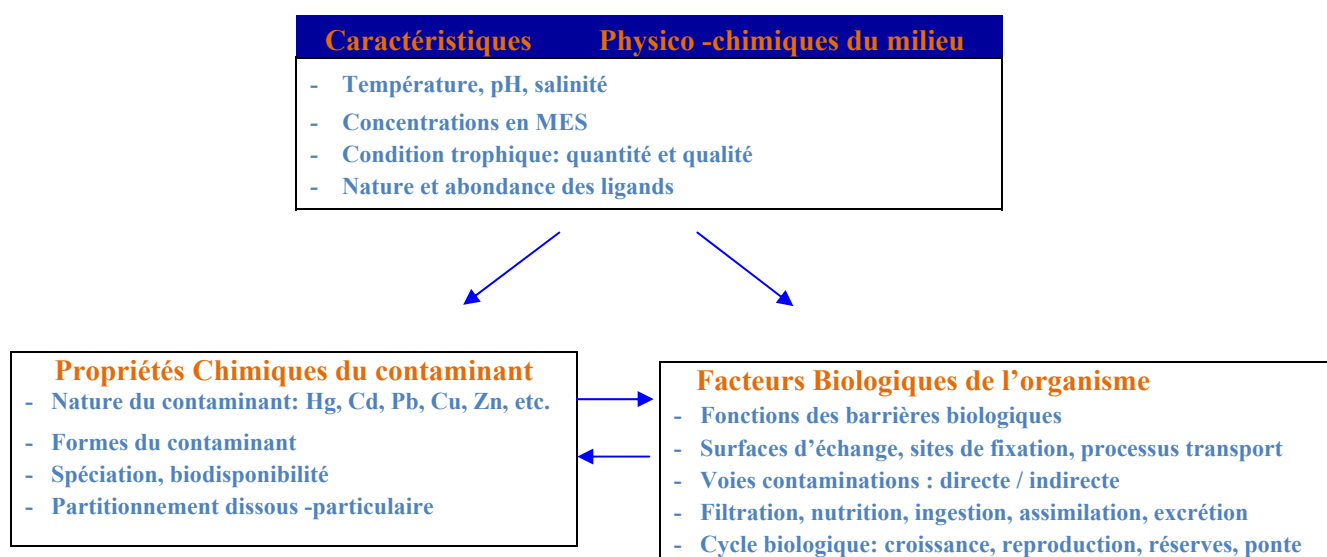


Figure 2 : Représentation schématique des trois groupes de facteurs interagissant dans le processus de bioaccumulation des métaux traces chez la moule.

1.3.3. Stockage et excrétion

Les organismes sont, dans une certaine mesure, capables de développer une acclimatation physiologique pour faire face à une exposition continue aux métaux en étant séquestrés (Depledge et Rainbow, 1990). Dans ce cas là, il existe plusieurs voies possibles d'élimination des métaux par les cellules :

1) Les métallothionéines, protéines de faible poids moléculaire très riches en groupement thiol (-SH), prennent en charge les métaux dans le cytosol. Ce système est le système majoritaire de détoxification des métaux chez les poissons (Olsson *et al.* 1998), il est moins important chez les invertébrés (Amiard *et al.* 2006); La synthèse de ces protéines est induite par une augmentation de l'exposition aux métaux. Ces protéines assurent ainsi la régulation des concentrations intracellulaires de différents éléments métalliques essentiels ou non (Hamilton et Mehrle, 1986). Les métallothionéines sont d'ailleurs utilisées comme biomarqueurs, indices précoces d'une pollution aux métaux lourds par exemple chez la palourde (Bebianno et Serafim, 1998).

2) Les lysosomes, dans lesquels les métaux entrent soit par des ATPases calciques, soit après incorporation par les métallothionéines et dégradation de ces dernières (Viarengo, 1989; Depledge et Rainbow, 1990).); Il faut noter que, si les métaux ainsi séquestrés n'induisent plus d'effet toxique pour l'organisme (ils ne sont plus biodisponibles), ils ne sont pas pour autant nécessairement excrétés, et peuvent s'accumuler dans les tissus (McGeer *et al.* 2003). Ils peuvent ainsi représenter un danger pour les prédateurs.

3) La défécation est une autre voie d'excrétion qui permet de supprimer les métaux contenus dans le tractus digestif. Chez *Mytilus edulis*, le fer, le zinc et l'arsenic peuvent également être excrétés à travers le byssus (George *et al.* 1976).

1.4. Choix des métaux étudiés

Dans cette étude, trois métaux seront étudiés en particulier: le cadmium, le cuivre et le zinc. Pourquoi distinguer ces trois métaux ? Pour le cadmium, il y a d'une part une raison historique en raison de son affinité avec le soufre qui permettait d'identifier les protéines « qui précipitent lourdement » ou donnent facilement des sels (sels de cadmium, sels de plomb, etc.). De plus, il se transporte et change de forme chimique, il a une conductivité électrique élevée qui explique son utilisation dans de nombreuses industries. Enfin, ce métal non essentiel présente une toxicité pour l'homme, entraînant notamment des lésions neurologiques rénales plus ou moins graves.

Pour compléter l'étude, le Cu et le Zn seront aussi évoqués. En effet, contrairement au Cd, ces deux métaux sont indispensables au déroulement des processus biologiques et ne deviennent toxiques qu'au-delà d'un certain seuil. Les activités humaines ont largement modifié le cycle

naturel de ces éléments : des taux élevés proviennent de décharges de l'industrie (Tableau. III). L'exploitation pétrolière, l'exploitation minière et l'incinération des déchets contribuent également à la dispersion des métaux lourds dans l'environnement. Ils finiront par se déverser dans les mers et océans.

Tableau III : Utilisation industrielle des métaux lourds (d'après Chambost-Manciet, 2002)

Mercure	Piles, peintures, fongicides, catalyseur dans l'industrie chimique, thermomètre,
Cuivre	Tentures de textiles, pigments de peinture, revêtement métallique, canalisation,....
Plomb	Agent antirouille, additif aux plastiques, batteries, ciment,
Cadmium	Pigments, batteries, ciment, produits agrochimiques, revêtements de surfaces,....

I.4.1 Cadmium

Ses propriétés physiques et chimiques, proches de celles du calcium, lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus.

Le modèle de l'ion libre (Free Ion Activity Model, FIAM - Morel, 1983) permet de décrire la biodisponibilité du cadmium qui détermine l'efficacité du transfert à travers les membranes biologiques. Celle-ci dépend alors de la forme chimique du métal. Tessier *et al.* (1993) mettent en évidence une relation linéaire entre le cadmium bioaccumulé dans les branchies et l'activité du Cd^{2+} , le cadmium se comportant comme un analogue du calcium (rayon ionique $\text{Ca}^{2+} = 0,97 \text{ \AA}$ et $\text{Cd}^{2+} = 0,99 \text{ \AA}$). Conséquence, l'accumulation et les effets induits sont étroitement dépendant des conditions d'exposition déterminant la spéciation du cadmium. La dureté (taux de calcium) et le pH, facteurs abiotiques de la colonne d'eau sont deux paramètres majeurs régissant l'entrée du Cd (Markich et Jeffree, 1994 ; Jumarie *et al.* 2001). Il peut remplacer parfois le Zn dans des systèmes enzymatiques carencés en Zn chez le plancton (Price et Morel, 1990; Lane et Morel, 2000) ; ce qui signifie qu'il a peut être un "rôle" biologique. Il existe, cependant, un ensemble de variables physicochimiques du milieu (salinité, pH, potentiel redox, caractéristiques sédimentologiques, nature géochimique des particules, concentration en chlorures) qui gouvernent les transformations du cadmium dans l'environnement (Gonzalez *et al.* 1999; Chiffoleau *et al.* 2001).

La toxicité du cadmium a été révélée lors de l'apparition d'une maladie rhumatismale au Japon en 1947. La cause de cette maladie dénommée « Itai Itai » n'a été découverte qu'en 1961 et rendue publique qu'en 1968, après analyse du riz consommé par les malades. Ce riz présentait une surabondance en cadmium due à la présence en amont de la rivière Jintsu qui irriguait les rizières, d'une mine de zinc relargant du cadmium dans l'eau (Ramade, 2000). Les teneurs en cadmium étaient dix fois plus élevées que dans les régions alentours.

Le cadmium atteint les milieux aquatiques par la voie atmosphérique ou par lessivage des sols et rejets directs anthropiques (Miramand *et al.* 2000). L'épandage d'engrais sur les terres agricoles apporte vraisemblablement un minimum de 70 tonnes de cadmium par an dont une partie mineure est lessivée par les pluies et rejoint ainsi les eaux littorales. En effet, une grande partie du cadmium est retenue par les sols et une autre est absorbée par la végétation (Cossa et Lassus, 1989). En milieu marin, c'est le chlorocomplexe CdCl_2 qui prédomine.

Depuis le 1^{er} janvier 2003, le règlement communautaire N° 466/2001 de la Commission Européenne du 8 mars 2001 a réduit de moitié les teneurs maximales acceptées en cadmium dans les bivalves pour leur consommation. La nouvelle norme est de 5 µg/g de poids sec ou alors de 1µg/g de poids frais (Commission du 8 mars, 2001).

1.4.2 Cuivre

Les concentrations moyennes en cuivre dans les eaux continentales sont largement en dessous du seuil de 1 mg/L conseillé par l'OMS pour l'alimentation humaine en eau potable. Cependant, si les contaminations en cuivre n'occasionnent pas de risque important pour l'homme, le cas est différent concernant les risques environnementaux. On peut relever de fortes concentrations en cuivre dans les eaux et sédiments dans des zones influencées par des activités anthropiques spécifiques, par exemple des activités minières ou industrielles, avec une utilisation dans les biocides à base de cuivre. Le cuivre est parfois utilisé pour d'autres usages : en complément des engrais sur les sols tourbeux pauvres et déficients en cuivre, ce qui augmente de ce fait le rendement des collectes, il est depuis longtemps connu pour son effet fongicide sur les végétaux. Pour des raisons semblables, le cuivre est donné en complément alimentaire pour l'élevage des moutons et autres animaux de pâturage. Pour finir, citons des applications marginales de sulfate de cuivre dans les plans d'eau - réservoirs pour contrôler le développement algal (Haughey *et al.* 2000), et l'application de peintures anti-salissures à base de cuivre disponibles sur le marché sont toutes constituées par une ou plusieurs matières actives toxiques,

c'est ainsi qu'il se retrouve à forte concentration dans les eaux des ports et des marinas (Roméo *et al.* 2003). Le cuivre est présent dans l'environnement de manière ubiquiste. Le transport par le vent des poussières de sol, les éruptions volcaniques, les décompositions végétales, les feux de forêts et les aérosols marins constituent les principales sources naturelles d'exposition. Les principales sources anthropiques sont l'industrie du cuivre et des métaux en général, l'industrie du bois, l'incinération d'ordures ménagères, la combustion de charbon, d'huile et d'essence et la fabrication de fertilisants (phosphate). Les déchets de cuivre peuvent également provenir des processus de production et utilisations ci-après: alliages de cuivre, fabriques de pâte à papier et papier, fabriques de papier et carton, production et utilisation de catalyseurs chimiques, raffinage du pétrole, algicides...

Le cuivre est un élément essentiel chez l'homme et l'animal, il est cofacteur spécifique de nombreuses enzymes et métalloprotéines de structure intervenant dans un métabolisme oxydatif, la respiration cellulaire, la pigmentation (OMS-IPCS, 1998). Il a une importance capitale dans le fonctionnement des processus biologiques. Chez les mollusques et certains crustacés, le sang renferme un pigment respiratoire à base de cuivre : l'hémocyanine.

La toxicité du cuivre pour les organismes est globalement basée sur ses interactions avec les protéines, enzymes, acides nucléiques et métabolites, de la paroi cellulaire, de la membrane et dans le cytoplasme (Flemming et Trevors, 1989). Elle dépend également, de la forme chimique du cuivre et de son état d'oxydation. Les caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, dureté, teneurs en autres inorganiques) agissent sur le degré de dissociation entre les formes métalliques et ioniques du cuivre.

1.4.3 Zinc

Le Zinc est un élément essentiel, impliqué dans la synthèse et le fonctionnement des enzymes, la synthèse des protéines et le métabolisme des carbohydrates, sa présence est nécessaire au développement des organismes (Doull *et al.* 1980). Les organismes possèdent donc des mécanismes d'absorption, de transport et d'élimination du zinc (Kranzberg et Stockes, 1989 ; Roesijadi, 1992 ; Hassler *et al.* 2005). Chez les invertébrés aquatiques, ce métal est absorbé via l'activité respiratoire et alimentaire, il entre dans l'organisme par diffusion (Simkiss et Taylor, 1995). Dans l'organisme, le zinc se trouve dans les branchies, les muscles, les reins, mais surtout dans l'hépatopancréas (Al-Mohanna et Subrahmanyam, 2001). Une fraction du métal accumulé dans ces organes est stockée sous forme non toxique dans les granules qui seront excrétés, permettant ainsi la détoxification des métaux lourds tels que le zinc, mécanisme communs chez les invertébrés aquatiques (Hare, 1992 ; Masala et O'Brien, 2002, Masala *et al.* 2002), tandis que

la fraction toxique du zinc reste disponible dans le cytoplasme des cellules (Rainbow, 2002). Les ions libres se lient sur les protéines cytosoliques de fort poids moléculaire, cette modification de structure des biomolécules perturbe leur fonctionnement qui peut mener jusqu'à la nécrose (Roesijadi, 1992).

Comme pour les autres métaux, les apports de zinc dans le milieu marin comprennent le ruissellement, l'écoulement des cours d'eau, les effluents domestiques et industriels rejetés directement dans la mer par des émissaires, le déversement des eaux usées et des boues industrielles, et les rejets par voie atmosphérique.

1.4.4 Facteurs influençant la bioaccumulation des métaux

La bioaccumulation des métaux lourds, quel que soit l'organisme considéré, est sous la dépendance directe de sa physiologie (Martoja et Elkaïm, 1980) elle même conditionnée par un ensemble de facteurs abiotiques comme la salinité, température, turbidité, saison, ... et de facteurs biotiques tels que la taille, l'âge, le sexe... (Cossa *et al.* 1979 ; Simpson, 1979 ; Métayer *et al.* 1982 ; Rainbow *et al.* 1990). En ce qui concerne les facteurs abiotiques, Pigeot (2001) a montré un effet site en relation avec la source cadmiée, un effet immersion et un effet saison. Plusieurs hypothèses ont été résumées dans la littérature pour expliquer les fluctuations saisonnières des concentrations : changements de l'activité biologique des mollusques, augmentation de la biodisponibilité de nourriture phytoplanctonique résultant de fortes températures et de plus longs jours au printemps (plus de luminosité) et changements de la biodisponibilité des métaux induits par une montée des concentrations de métabolites dans l'eau. D'autres auteurs (Bryan, 1973 ; Frazier, 1975 ; Phillips, 1976 ; Majori *et al.* 1978 ; Boyden et Phillips, 1981 ; Ritz *et al.* 1982; Amiard *et al.* 1986 ; Phelps et Hetzel, 1987 ; Pigeot, 2001) attribuent les variations saisonnières à la taille et au poids des organismes en relation avec la maturité sexuelle.

1.4.5 Mécanismes de détoxification des métaux

Les métaux sont isolés du milieu cellulaire et rendus chimiquement inertes vis-à-vis des fonctions cellulaires chez les bivalves. Ainsi, les mollusques bivalves peuvent survivre dans des milieux fortement contaminés par les métaux lourds (Jeantet *et al.* 1985 ; Phillips, 1990). Cette

adaptation génétique ou physiologique implique le développement de mécanismes de détoxification. Ce mécanisme a été démontré chez les moules (*Mytilus edulis* et/ou *Mytilus galloprovincialis*) (Nolan et Duke, 1983 ; Frazier, 1986 ; Pavicic *et al.* 1994a ; Bebianno et Langston, 1992) et chez les huîtres (*Crassostrea gigas* ou *Crassostrea virginica*) (Siewicki *et al.* 1983 ; Gillot *et al.* 1989 ; Roesijadi *et al.* 1989). Il existe plusieurs autres types de réponses à la contamination métallique chez les invertébrés : la mobilisation d'un ensemble de ligands cytosolubles dont les métallothionéines dont on a parlé plus haut (George, 1990 ; Cosson *et al.* 1991) et la séquestration du métal dans les lysosomes ou granules (Brown, 1982 ; George, 1990 ; Viarengo et Nott, 1993).

II. Biomarqueurs : Outils pour évaluer la toxicité des polluants

A l'heure actuelle, il existe deux approches permettant d'évaluer les effets des contaminants de l'environnement dans les milieux récepteurs: l'étude des biomarqueurs, utilisés au niveau de l'individu, et celle des indices biocénotiques, utilisés à l'échelle de populations et d'écosystèmes, ces indices ont déjà fait l'objet de normes en Europe tels que les IBGN =Indice Biologie Global Normalisé. Indices biologiques Globaux Normalisés très employés pour l'étude de la pollution des rivières. Notre thèse portera sur l'étude, chez l'organisme sentinelle, la moule, de deux biomarqueurs : la glutathion transférase et le glutathion que nous avons choisis du fait de leur importance dans le mécanisme cellulaire normal mais aussi dans le cas d'une exposition de l'organisme au stress. Qu'elles soient spécifiquement impliquées dans la protection de l'organisme vis-à-vis des agressions extérieures ou qu'elles soient détournées de leurs fonctions physiologiques pour contribuer à la défense de l'organisme, certaines molécules biologiques ont la particularité de réagir à la présence de toxique(s), l'amplitude de la réponse étant parfois proportionnelle à la quantité de xénobiotiques (Lagadic *et al.* 1997). Ces composantes biologiques peuvent être alors utilisées comme biomarqueurs. Les biomarqueurs ont été définis comme « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental révélant l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic *et al.* 1997). Ils peuvent renseigner sur les mécanismes d'action des polluants, ainsi que sur les systèmes mis en jeu dans la défense de l'organisme contre les effets d'une contamination. Les biomarqueurs sont le plus souvent mesurés chez des espèces sentinelles, comme les bivalves, qui se révèlent être également bioaccumulatrices des contaminants de l'environnement. Ces espèces, présentes naturellement ou mises en cage sur les sites étudiés, sont utilisées dans le cadre d'études de

biosurveillance de la qualité d'un milieu (Roméo *et al.* 2003). Les espèces les plus utilisées sont les espèces marines *Mytilus edulis* (Canesi et Viarengo, 1997) et *Mytilus galloprovincialis* (Porte *et al.* 1991 ; Roméo *et al.* 2003). Ces espèces ont souvent été étudiées dans le cadre de pollution par les HAP (Baumard *et al.* 1998 a, b ; Baumard *et al.* 1999). Les bivalves sont les plus employés pour estimer la qualité générale des écosystèmes continentaux (Cossu *et al.* 2000 ; Charissou *et al.* 2004). Les biomarqueurs sont classés en trois catégories (National Research Council, 1987 ; Lagadic *et al.* 1997) qui sont : les biomarqueurs d'expositions, d'effet, et de sensibilité.

(i) Les biomarqueurs d'exposition traduisent une réponse biologique d'un individu à son environnement. Cette réponse est l'expression de la biodisponibilité des agents chimiques auxquels l'individu est exposé. Elle n'est pas obligatoirement le reflet d'une toxicité. Les marqueurs les plus courants sont ceux impliqués dans la détoxification des xénobiotiques (cytochrome P450, glutathion transférases...) ou les mécanismes de défense cellulaire (enzymes antioxydantes). Si la contamination est de courte durée ou de faible ampleur, les effets enregistrés au niveau de ces marqueurs peuvent être réversibles. Les activités des biomarqueurs recouvrent alors des valeurs proches de celles mesurées avant la pollution. Dans le cas où la charge polluante est élevée, les systèmes de défense cellulaires sont dépassés. Les organismes ne peuvent alors plus se défendre contre les effets de la charge polluante et la toxicité apparaît comme le montre une augmentation des dommages membranaires. (ii) Les biomarqueurs d'effet rendent compte des conséquences néfastes d'un xénobiotique au sein des différents tissus de l'organisme.

Ils apparaissent quand les systèmes de défense dépassés et ne peuvent plus enrayer les effets de xénobiotiques. Ils comprennent par exemple les dommages cytotoxiques et les dommages oxydatifs à l'ADN. (iii) Les biomarqueurs de sensibilité informent sur le rôle des variations génétiques dans les réponses observées. Ils concernent notamment l'expression d'enzymes antioxydantes dont les variations peuvent augmenter la sensibilité des organismes. De nombreux biomarqueurs non spécifiques sont aujourd'hui utilisés dans la surveillance de l'environnement : nous citerons, la stabilité de la membrane lysosomale dont la perturbation subcellulaire s'est donc révélée être un bon indice extrêmement sensible de la condition de la cellule et le stress on stress qui permettent d'évaluer leur état physiologique

Les premiers biomarqueurs étudiés ont été des activités enzymatiques spécifiques capables de répondre à certaines classes de contaminants (Tableau. IV). Ainsi, l'acétylcholinestérase, est inhibée notamment en présence des insecticides organophosphorés et carbamates, le cytochrome

P450, qui est induit par les HAP et les organochlorés, la peroxydation lipidique est considérée comme un marqueur de stress environnementaux. Le malondialdéhyde (MDA) est un résidu de dégradation des lipides endogènes dont l'augmentation des concentrations est considérée comme la conséquence de la peroxydation lipidique (Pompella *et al.* 1987; Sunderman, 1987 ; Roméo et Gnassia-Barelli, 1997). Les glutathion transférases (GST), ont été parmi les premières composantes biologiques étudiées pour évaluer les effets de substances polluantes sur les organismes. Ce sont des enzymes de phase II de la biotransformation des xénobiotiques qui prennent en charges les métabolites de phase I et permettent de rendre ces substances plus hydrosolubles. Les GST constituent un groupe d'isoenzymes catalysant la conjugaison du glutathion réduit (GSH) à une grande variété de substrats. En 1991, Sheehan *et al.* mettent en évidence cette activité chez la moule *Mytilus edulis* et l'utilisent comme indice de pollution chimique. On retrouve cette activité dans différents organes : glande digestive, manteau, pied, mais c'est dans les branchies qu'elle est la plus élevée (Hoarau *et al.* 2002).

Cependant, dans l'environnement, la contamination est multiple et différentes classes de polluants se retrouvent simultanément dans le milieu aquatique. Il est alors intéressant de disposer de marqueurs capables de répondre à une contamination multiple. En ce sens, les systèmes antioxydants présentent un intérêt certain par le caractère aspécifique de leur réponse.

Dans le cas de notre travail, nous nous sommes intéressés particulièrement à l'action du cadmium et du cuivre sur la moule *Perna perna*, nous savons que le cuivre est un métal qui a un rôle oxydant ; il suit la réaction de Fenton (Viarengo *et al.* 1991), en revanche le cadmium ne participe pas à cette réaction mais il augmente la formation intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène et peut provoquer un stress oxydant (Stohs *et al.* 2000). C'est pourquoi nous montrons ci-dessous le stress oxydant et certains biomarqueurs dont des biomarqueurs de défense anti-oxydante.

Tableau IV : Liste des différents biomarqueurs mesurés chez les mollusques

Marqueur biologique		Tissus	Référence analytique	Unités
Glutathion transférase	GST	Branchies	Habig <i>et al.</i> 1974	nmol.mg ⁻¹ P. min ⁻¹
Catalase	CAT	Glande digestive	Grennwald, 1985	μmol.mg ⁻¹ P. min ⁻¹
MalonDiAldéhyde	MDA	Glande digestive	Buege and Aust, 1978	nmol.mg ⁻¹ P.
Adduits à l'ADN	Add	Glande digestive	Genevois <i>et al.</i> 1998	adduits par 10 ⁸ nucleotides
Acétylcholinestérase	AChE	Branchies	Ellman <i>et al.</i> 1961	nmol.mg ⁻¹ P. min ⁻¹
Glutathion	GSH	Branchies	Weckberker et Cory, 1988	μmol.mg ⁻¹ P.

2.1 Stress oxydant et systèmes de défenses antioxydants

L'origine du stress oxydant chez les organismes aérobies provient de la consommation intracellulaire de la molécule d'oxygène qui est essentielle pour de nombreuses fonctions physiologiques mais qui génère dans le même temps la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou « Reactive Oxygen Species » (ROS) qui sont potentiellement toxiques pour la cellule. Les principales sources de production des ROS proviennent de la phosphorylation oxydative de l'ADP, des chaînes de transport d'électron microsomaux, de l'activité phagocytaire et de l'activité de plusieurs enzymes qui produisent des ROS comme molécules intermédiaires. Les xénobiotiques peuvent augmenter la production intracellulaire des ROS, par exemple, au cours de leur réduction, où ils peuvent être transformés en leur radical libre qui va rapidement donner son électron à une molécule d'oxygène et produire un radical anion superoxyde. Celui-ci va à son tour réagir dans une réaction en chaîne et ainsi amplifier le phénomène initial.

Pour pouvoir maîtriser la formation de ces espèces réactives, les cellules disposent d'un complexe antioxydant de défense constitué d'enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase) et de molécules qui piègent les espèces radicalaires au niveau des membranes (vitamine E, β-carotène) ou de la phase aqueuse (acide ascorbique, acide urique et glutathion).

2.1.1 Sources des espèces réactives de l'oxygène

Origine endogène

Les espèces réactive de l'oxygène (ROS) sont produites principalement de manière endogène au niveau des membranes des mitochondries, au cours du transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire (Livingstone, 2001 ; Staniek et Nohl, 2000). Les réactions radicalaires jouent un rôle important dans les systèmes biologiques car elles interviennent dans des réactions métaboliques et physiologiques normales et indispensables à la vie, comme dans la production d'énergie (Betteridge, 2000). Les ROS sont aussi impliquées dans le processus de mort cellulaire programmée ou apoptose (Matès, 2000).

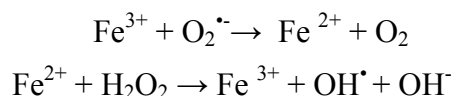
Origine exogène

Des xénobiotiques peuvent initier la production d'espèces radicalaires. Certaines molécules chimiques organiques (carbammates, quinones, phénols, hydrocarbures...), ainsi que des contaminants métalliques ou des métalloïdes (cuivre, zinc, fer, plomb, arsenic...) induisent la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Livingstone, 2001).

2.1.2 Espèces Réactives de l'Oxygène

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui résulte de la capture d'un électron par la molécule d' O_2 au cours de réactions endergoniques catalysées par les flavoenzymes (xanthine oxydase), les lipoxygénases et les cyclooxygénases en présence de métaux de transition tels que le fer ou le cuivre (Cossu *et al.* 1997a ; Nordberg et Arnér, 2001). L'anion superoxyde est essentiellement formé au niveau des membranes des mitochondries (Gutteridge et Halliwell, 1993 ; Staniek et Nohl, 2000). Son incapacité à traverser les membranes lipidiques le confine dans le compartiment où il est formé. Il contribue à la destruction des phospholipides membranaires par attaque nucléophile des liaisons esters entre les acides gras et le glycérol. A pH physiologique, sa dismutation est catalysée par les superoxydes dismutases (Fridovich, 1975). En milieu acide, il peut se dismuter en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) modérément actif, qui franchit aisément les barrières membranaires par diffusion (Cossu *et al.* 1997b ; Nordberg et Arnér, 2001).

Le peroxyde d'hydrogène intervient dans la formation du radical hydroxyle (OH^\bullet), en présence d'anion superoxyde via l'oxydation des métaux de transition par la réaction de Fenton (Fenton, 1894) :



On définit le stress oxydant lorsque la formation des ROS excède les capacités de défense du système antioxydant. Le stress oxydant est à l'origine de dommages au niveau cellulaire (voir schéma en figure. 3) et de différentes pathologies comprenant la carcinogenèse, les maladies cardiaques, l'arthrite rhumatoïde, l'inflammation et le vieillissement (Winston *et al* 1997).

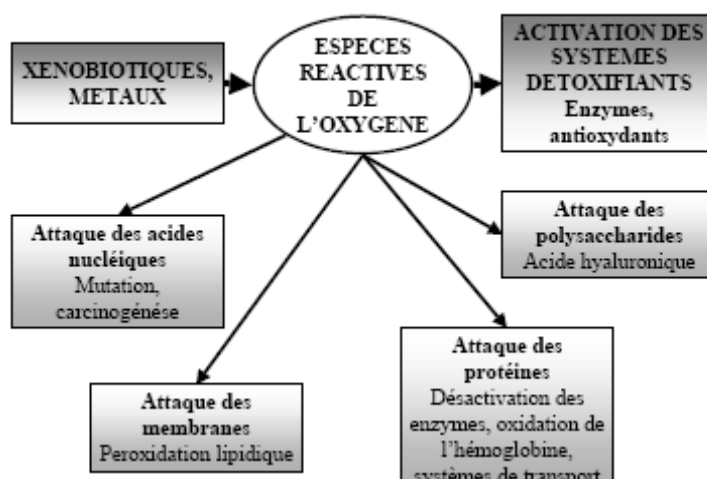


Figure 3: Schéma général des dommages provoqués par les espèces réactives de l'oxygène (d'après Lackner, *et al.* 1998).

2.1.3 Principaux systèmes antioxydants

La surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, ou le dysfonctionnement des mécanismes de défense ou de contrôle physiologique de leur production peut être la cause d'un stress oxydant. Pour Halliwell (1987), un stress oxydant implique la formation d'espèces réactives de l'oxygène et est synonyme de dommages. Sies (1991) le définit comme un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants en faveur des premiers. Pour combattre les effets du stress oxydant, les organismes possèdent des systèmes de défense localisés dans différents compartiments cellulaires et visant à (i) éliminer les espèces réactives de l'oxygène, (ii) induire l'action des

différents systèmes antioxydants et (iii) accroître l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des macromolécules et des membranes cellulaires endommagées par les espèces réactives de l'oxygène (Cossu *et al.* 1997b).

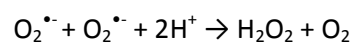
1) Les systèmes enzymatiques de protection

Il faut bien avoir en mémoire que la protection des organismes n'est pas assurée de façon homogène par tous les antioxydants. La concentration des différents enzymes et piègeurs est très inégale selon les tissus. De plus à l'intérieur d'une cellule, des compartiments comme les peroxysomes, les mitochondries, le cytosol ou la membrane disposent de protections différentes et spécifiques. Il existe trois types d'enzymes anti oxydantes majeures qui sont mises en oeuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène : les superoxydes dismutases, les glutathion peroxydases et les catalases.

▪ Les superoxydes dismutases

La première description de cette enzyme par Mc Cord et Fridovich (1969) a été réalisée dans des érythrocytes de bovins. Elles comportent un métal de transition (fer, manganèse, cuivre ou zinc) dans leur site actif (Cossu *et al.* 1997a). L'ion métallique va capter un électron de l'anion superoxyde par une réaction de dismutation et le transférer au noyau imidazole de l'une des histidines du site actif selon la réaction:

SOD



Les SOD ont la particularité de ne pas pouvoir traverser les membranes biologiques, et elles remplissent leurs fonctions de détoxication au sein même du compartiment cellulaire où les ROS sont formées (Staniek et Nohl, 2000). Elles catalysent la dismutation de molécules d' $\text{O}_2^{\bullet -}$ en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

▪ La catalase

La catalase (CAT) est une hémoprotéine tétramérique de 240 kDa, présente dans les hématies et les peroxysomes hépatiques, ayant pour cofacteur un atome de fer (Sokolova *et al.* 2001). Elle réduit rapidement le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire via la réaction :



Sa localisation peroxysomale en fait une enzyme antioxydante complémentaire de la glutathion peroxydase sélénium-dépendante contre la peroxydation induite par le peroxyde d'hydrogène. L'activité catalasique est présente chez les mammifères, les vertébrés et invertébrés aquatiques et les procaryotes (Saint-Denis *et al.* 1998). La catalase est localisée dans les peroxysomes et les glyoxysomes. La baisse d'activité de la catalase, observée par exemple par Ray *et al.* (2002) dans des tissus issus de tumeurs du sein, entraîne des augmentations des taux de peroxyde d'hydrogène qui vont amener la formation du radical OH[•] et initier la lipoperoxydation.

Il existe deux formes distinctes de glutathion peroxydases :

- l'activité glutathion peroxydase sélénium-dépendante SeGPx (EC 1.11.1.9), qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes organiques tels que l'hydroperoxyde du cumène.
- La glutathion peroxydase sélénium-indépendante SeGPxInd (EC 1.11.1) assimilée à une isoenzyme de glutathion transférase (GST), réduit les peroxydes organiques uniquement (Almar *et al.* 1998). Présente dans le cytosol et les mitochondries, cette enzyme catalyse la réduction de l'eau oxygénée et des hydroperoxydes (Cossu *et al.* 1997a).

▪ **La glutathion réductase**

La glutathion réductase (GR) est une enzyme importante pour le maintien d'une activité glutathion peroxydasique. C'est une flavoprotéine dimérique qui joue un rôle à part entière dans le processus de détoxification. Cette enzyme réduit le glutathion oxydé (GSSG, glutathion disulfure) en présence de NADPH, issu de la voie des pentoses phosphates, de manière à régénérer les niveaux de glutathion réduit (Kelly *et al.* 1998) :



▪ **La glutathion transférase**

Est une enzyme de phase II qui intervient dans plusieurs processus physiologiques parmi lesquels figure la défense contre les dommages oxydatifs. Cette enzyme catalyse la réaction

d'addition entre ces composés et le groupement –SH du glutathion pour les rendre plus hydrosolubles (Habig *et al.* 1974 ; Van der Oost *et al.* 1996).

La GST est induite par de nombreux composés dont certains sont également responsables de l'induction des cytochromes P450 et notamment les HAPs et les PCBs (Hoarau *et al.* 2001).

2) Les systèmes non enzymatiques

L'action protectrice enzymatique est complétée par celle de différents antioxydants non enzymatiques se comportant comme des piègeurs de radicaux, citons comme exemple :

▪ Le glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG)

Le glutathion (L- γ - glutamyl - L- cystéinyglycine), est un thiol non protéique le plus abondant dans les organismes vivants (Penninckx, 2000). Dans les cellules, il est majoritairement présent à l'état réduit (GSH) qui est sa forme active. Il est synthétisé *in vivo* par l'action conjuguée de deux enzymes: la glutamate cystéine ligase (GCL) et la glutathion synthétase (Dringen, 2000 en figure 4). Le glutathion agit comme un donneur d'électrons et permet ainsi la désactivation des ROS (Deneke et Fanburg, 1989 ; Winterbourn et Munday, 1990 ; DeLeve et Kaplowitz, 1991). Il est également le substrat des glutathion peroxydases et des glutathion transférases pour la réduction des peroxydes. Hormis son action antioxydante, le glutathion intervient dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la réserve et le transport des cystéines, le transport des acides aminés, le métabolisme des prostaglandines, et la réduction de ribonucléotides en désoxyribonucléotides.

La cytotoxicité induite dans les cellules endothéliales par l'oxyde nitrique et/ou l'anion superoxyde peut être bloquée par le glutathion (Cheung *et al.* 2002). Il intervient aussi dans la conjugaison des substances électrophiles, catalysées par des glutathion transférases. A pH=7, le glutathion, sous sa forme anionique (GS⁻), inactive l'oxygène singulet (Cadenas, 1989).

Une augmentation de la forme oxydée du glutathion (GSSG) traduit un stress oxydant (Sies *et al.* 1998 ; Pocerlich *et al.* 2000).

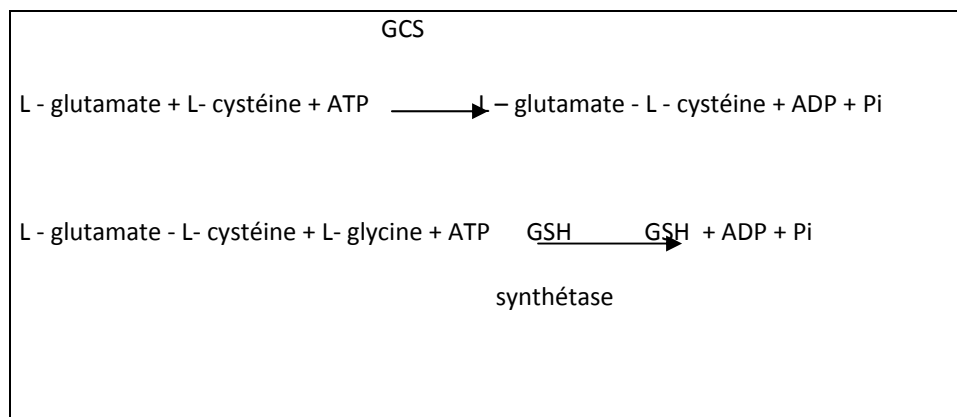


Figure 4 : Différentes étapes de la synthèse du glutathion réduit (GSH) : GCS : γ - glutamyl cystéine Synthétase. D'après Dringen (2000)

Outre le rôle de réserve et le transport de cystéine, le glutathion est un antioxydant majeur de la cellule, grâce à sa concentration élevée et du fait qu'il est le substrat d'importantes enzymes de défenses. Le maintien du taux de GSH cellulaire est crucial, car les mitochondries ne possèdent pas les enzymes nécessaires à sa synthèse et importent le GSH cytosolique (Wang et Ballatori, 1998). Dans les conditions normales, le glutathion sous sa forme réduite (GSH) représente entre 90 et 98% du glutathion total. Dans les conditions physiologiques normales, la GSSG- réductase assure la conversion du GSSG et le maintien du GSH sous sa forme réduite. Pour maintenir cet équilibre redox du rapport $[\text{GSH}] / [\text{GSSG}]$ contre un stress oxydant, l'exportation du GSSG et du conjugués du GSH pourraient être un facteur modulant la sensibilité des cellules au stress oxydant (Schafer et Buettner, 2001).

▪ L'acide ascorbique (vitamine C)

Existe à l'état d'ascorbate à pH physiologique et c'est un antioxydant soluble dans l'eau (Kelly *et al.* 1998). L'ascorbate est un puissant agent réducteur qui réagit directement avec l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et les hydro peroxydes lipidiques. L'acide ascorbique a des propriétés anticarcinogéniques ; ainsi, Drake *et al.* (1996) ont démontré l'intérêt d'un régime riche en vitamine C pour lutter contre les cancers gastriques chez l'homme. De plus, l'ascorbate va régénérer au niveau cytosolique la vitamine E et ainsi, prolonger la durée de vie de cet antioxydant. Paradoxalement, sous certaines conditions (faible concentration, présence d'ions métalliques), l'acide ascorbique peut agir comme un prooxydant en augmentant les dommages oxydatifs aux lipides, à l'ADN et aux protéines.

3) Les protéines de fixation des métaux

Un autre système de protection consiste à séquestrer les métaux sous forme libre impliqués dans la production des espèces radicalaires. La transferrine maintient le fer libre plasmatique à des niveaux très faibles (Gutteridge *et al.* 1982). La lactoferrine est produite par les neutrophiles et joue le même rôle que la transferrine. La céruloplasmine fixe les ions cuivre et oxyde le fer ferreux. L'albumine fixe également les ions cuivre (Gutteridge et Wilkins, 1983).

La nature antioxydante des métallothionéines (dont on a parlé plus haut) est connue chez les mammifères ; en ce qui concerne les invertébrés, Viarengo *et al.* (1999, 2000) ont montré chez *Mytilus galloprovincialis* que les métallothionéines inhibent la réaction de Fenton et donc, réduisent le stress oxydant en se liant aux métaux de transition tels que le fer et le cuivre.

2.2. Variation des systèmes de défenses en condition de stress

L'intérêt majeur des systèmes de détoxification comme biomarqueurs réside dans leur réponse aspécifique, ce qui est intéressant dans le cadre d'une contamination par un mélange de xénobiotiques, comme cela est le cas dans le milieu naturel.

La première réaction des organismes face à une contamination peut être une augmentation de l'activité de ces systèmes (Winston *et al.* 1990), traduisant une adaptation à la pollution et une résistance à la modification de l'environnement (Lagadic *et al.* 1997). Si le stress est transitoire, l'activité des systèmes de détoxification cellulaire peut revenir au niveau des individus témoins. L'induction des systèmes antioxydants permet à l'organisme de limiter la production ou de favoriser la destruction d'espèces réactives de l'oxygène, et empêcher ainsi leurs effets néfastes. Les systèmes antioxydants peuvent être débordés en cas de pollution chronique ou accidentelle par des composés organiques et des métaux présents dans les sédiments des milieux contaminés. En conséquence, des effets toxiques peuvent apparaître.

Les travaux réalisés précédemment, mettent en évidence que tous les systèmes, enzymatiques ou non, impliqués dans la défense de l'organisme n'ont pas tous la même sensibilité face aux polluants. Quand la durée d'exposition n'excède pas 7 jours, le cuivre entraîne une diminution du taux de glutathion réduit chez *Unio tumidus*, exposé pendant 3 jours à 30 µg/L (Doyotte *et al.*

1997), et chez *Mytilus galloprovincialis*, exposée pendant 1 à 7 jours à 0,6 μM (Canesi *et al.* 1999). Chez *Unio tumidus*, cette déplétion en GSH est accompagnée d'une diminution de l'activité de la glutathion réductase, qui ne permet pas de régénérer suffisamment de GSH à partir du GSSG. Chez *M. galloprovincialis*, c'est l'augmentation de l'activité de la GST (qui conjugue le GSH à des composés électrophiles) qui semble expliquer la diminution du taux de GSH. Le cuivre n'induit pas de déplétion ou d'augmentation du taux de GSH dans la glande digestive de *Crassostrea virginica* exposée à des concentrations de 5 à 80 $\mu\text{g/L}$ de cuivre pendant 2 semaines (Ringwood *et al.* 1998a). Quand les huîtres sont exposées à 80 $\mu\text{g/L}$ de cuivre pendant 4 jours, les taux de MDA sont alors plus élevés que chez les témoins. L'exposition au cuivre entraîne également une augmentation du taux de MDA dans les tissus mous de *Ruditapes decussatus* (Roméo et Gnassia-Barelli, 1997) et du poisson. Chez *C. virginica*, les taux de MDA tendent à diminuer et retrouver des valeurs proches des taux des témoins à mesure que la durée d'exposition augmente, tandis que la concentration en métallothionéines est plus élevée (Ringwood *et al.* 1998b).

Après 7 jours d'essai au contact de dérivés du plomb et du mercure, le taux de GSH mesuré dans les branchies et la glande digestive de *Perna viridis* n'est pas significativement différent des témoins (Yan *et al.* 1997) mais augmente après 14 jours.

Si certains auteurs ont décrit l'influence des saisons sur l'activité des systèmes de détoxification cellulaire, d'autres se sont attachés à tenir compte de l'impact des facteurs abiotiques sur la physiologie des bivalves. Ainsi, par exemple, l'augmentation de température *in vitro* stimule la lipoperoxydation dans la glande digestive de la coquille Saint-Jacques (Viarengo *et al.* 1995) et de la patelle *Nucella concinna*, d'autre part, la lipoperoxydation est diminuée dans la glande digestive de bigorneaux (*Littorina littorea*) en anoxie durant 6 jours (Pannunzio et Storey, 1998).

Les études faisant référence aux variations saisonnières des systèmes de défenses antioxydants sont peu nombreuses, alors que de nombreux travaux portent actuellement sur l'influence des facteurs saisonniers sur l'état métabolique des organismes et leurs réponses aux contaminants.

Chez les bivalves, quelques études rapportent des variations des activités des systèmes de détoxification cellulaire au cours de l'année et en fonction des saisons.

En hiver, chez *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*, Viarengo *et al.* (1991) décrivent une diminution de l'activité des systèmes de défenses antioxydants (glutathion réduit et glutathion peroxydases), accompagnée d'une augmentation du taux de malondialdéhyde. De même, Power

et Sheehan (1996) observent une diminution du glutathion réduit en hiver, accompagnée d'une augmentation de l'activité de la GST dans les branchies et la glande digestive de *Mytilus edulis*.

La faible disponibilité de nourriture en hiver peut expliquer une sensibilité accrue au stress oxydant à travers d'autres facteurs tels que la modification de la composition de la membrane en acides gras. Des activités enzymatiques compensatoires telles que la GST (Power et Sheehan, 1996 ; Wilhelm-Filho *et al.* 2001 ; Manduzio *et al.* 2004) peuvent alors être mises en jeu pour compenser la baisse des activités antioxydantes.

En hiver, les bivalves seraient moins aptes à faire face aux effets d'une pollution et présenteraient ainsi une sensibilité accrue aux xénobiotiques (Power et Sheehan, 1996). La production d'espèces radicalaires peut alors être favorisée et entraîner des effets délétères.

2.3. Intérêt des expériences de laboratoire

Ces tests consistent à exposer un nombre connu d'organismes d'une même espèce à une gamme de concentrations en produit chimique. Cette réponse biologique à un toxique est le résultat de l'interaction du produit et de l'organisme exposé. Elle dépend des propriétés chimiques du contaminant et physiologiques de l'organisme, au moment où il est exposé. Chaque espèce présente donc une réponse spécifique à chaque produit chimique. (Parkerton et Konkel, 2000 ; Escher et Hermens, 2002 ; Tremolada *et al.* 2004).

MATERIEL ET METHODES



CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Dans cette partie, nous allons présenter tout ce qui est commun à plusieurs expérimentations, c'est-à-dire l'identification de l'espèce. Seront également décrites les zones d'étude la méthodologie utilisée pour l'étude de la biométrie, les analyses chimiques, biochimiques et les statistiques associées. En un mot la stratégie expérimentale, les dispositifs et méthodes analytiques sont exposés.

1. Identification et biologie du modèle biologique

La moule africaine *Perna perna* est un mollusque bivalve qui possède une charnière munie d'une ou deux dents; fréquemment une dans la valve gauche et 2 dans la valve droite. Les muscles rétracteurs du pied et muscles rétracteur du byssus forment une empreinte médio-dorsale sur la coquille, le muscle rétracteur postérieur du byssus a une empreinte bien visible et adjacente à celle de l'adducteur postérieur, l'intérieur des valves est nacré, blanc rosé (Figure.5). Elle peut atteindre une longueur maximale de 18 cm. On la rencontre dans les substrats durs de l'étage infralittoral et jusqu'à 100 m de profondeur. *P. perna* est une espèce largement répandue dans le monde puisqu'on la rencontre sur les côtes Est et Ouest de l'Atlantique tropical et subtropical, en Amérique du Sud et sur les bords de la Méditerranée (Afrique du Nord : Algérie, Tunisie, Maroc). La moule *P. perna* (Lamarck, 1758), appartient à l'embranchement des Mollusques bivalves de la famille des Mytilidés.

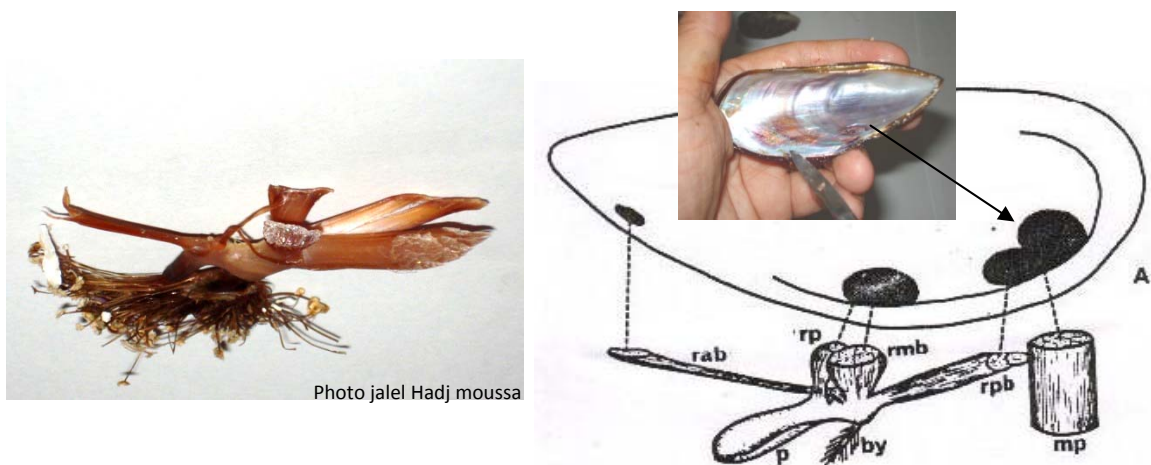


Figure 5: Disposition des insertions musculaires sur la face ventrale de la coquille de *Perna perna* (mp : muscle adducteur postérieur, rmb: rétracteur musculaire du byssus ; rpb : rétracteur postérieur du byssus ; rab : rétracteur antérieur du byssus ; rp : rétracteur du pied ; by : byssus ; p : pied).

a) Morphologie

Comme la plupart des bivalves, les moules sont des animaux filtreurs qui se nourrissent en retenant les éléments en suspension dans l'eau de mer. L'eau est aspirée grâce au siphon inhalant puis filtrée par les filaments des branchies qui agglomèrent dans du mucus les particules nutritives (phytoplancton, zooplancton et autres matières organiques). La moule est un bivalve lamellibranche, sa coquille est constituée à 95 % de carbonate de calcium. Sur la face ventrale (Figure. 6), les bords des deux lobes sont libres, délimitant la cavité palléale. En avant du bouton exhalant, on trouve le vélum qui est un tissu conjonctif et musculaire capable de s'étendre et de se rétracter. Le manteau a un rôle dans la circulation de l'eau, il participe à la respiration et accumule des réserves mais son rôle principal est d'assurer la formation de la coquille. Les muscles adducteurs s'opposent à l'action mécanique du ligament, abducteur, et par leur contraction assurent la fermeture des valves. Le pied (organe de locomotion) est une saillie musculaire située au-dessous de la masse viscérale et comprenant la glande byssogène qui occupe sa plus grande partie où elle forme un sillon entouré, sur presque toute sa longueur. Le byssus (organe de fixation) est constitué de nombreux filaments terminés par un disque adhésif. Les branchies sont au nombre de deux et sont des organes de la nutrition et de la respiration (la moule filtre jusqu'à 3 litres d'eau par heure).

Les bivalves sont des microphages et se nourrissent par filtration de particules en suspension comprenant le phytoplancton, le zooplancton et les résidus organiques ou seston. Ils disposent d'un système digestif, d'un système circulatoire ouvert, d'organes reproducteurs et d'un système nerveux élémentaire.

Embranchement :
Mollusque
Famille : Mytilidés
Classe : Bivalve
Genre : *Perna*
Espece : *perna*

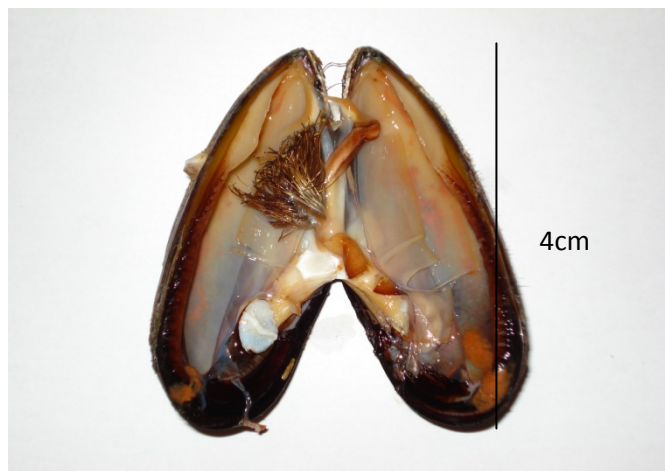


Photo jalel Hadj moussa

Figure 6 : Position taxonomique et description de *Perna perna*

b) Intérêt

La moule est une espèce modèle en écophysiologie. Elle résiste plus de 12 jours à l'émersion et est capable de résister à des modifications du métabolisme, à l'anoxie et l'hypercapnie. Considérant plusieurs critères biologiques et écotoxicologiques, comme leur mode de vie sédimentaire et leur mode de nutrition par filtration, les moules sont considérées comme des espèces sentinelles d'écosystèmes côtiers anthropisés. En effet, elles sont utilisées comme indicateurs biologiques dans des programmes de biosurveillance, afin de mesurer le degré de pollution environnementale à cause de leur capacité à concentrer dans leurs tissus de fortes teneurs en polluants chimiques métaux lourds et contaminants organiques par filtration de l'eau. De plus, leur sédentarité leur interdit toute possibilité de fuite face à une pollution chronique ou soudaine. Les principaux programmes de biosurveillance utilisant des moules sont le « Mussel Watch » (Goldberg *et al.* 1978), (Goldberg *et al.* 2000) et le Réseau National d'Observation (RNO) (Claisse *et al.* 1992), développés pour surveiller la qualité des eaux côtières.

2. Présentation de la zone de l'étude

2.1. Caractéristiques générales du littoral Algérien

L'Algérie dispose d'un littoral d'environ 1280 Km, de la frontière Algéro-Marocaine à l'Ouest à la frontière Algéro -Tunisienne à l'Est ; comme le montre la carte ci après. Ce littoral est caractérisé par un plateau continental réduit à l'exception dans la région de Ghazaouet (Wilaya de Tlemcen) à l'extrême Ouest et la région d'El Kala (Wilaya d'El Tarf) à l'extrême Est.



Figure 7: Carte représentative de la côte Algérienne

La côte Algérienne est caractérisée par ces deux couches d'eaux superposées, l'eau Atlantique modifiée et l'eau Méditerranéenne. En effet, l'eau Atlantique pénètre dans la mer d'Alboran où ses caractéristiques initiales commencent à s'altérer, donnant ainsi naissance à l'eau Atlantique modifiée (Benzohra, 1993). Ce même auteur signale cette eau dans le bassin Algérien où elle se reconnaît dans une couche superficielle de 150m d'épaisseur, avec une température de 15 à 23 °C en surface et de 13,5 à 14 °C en profondeur et des salinités allant de 36,5 à 38 psu. Le long des côtes Algériennes, l'eau Atlantique modifiée décrit un écoulement plus ou moins stable avant de se diviser en deux branches. Dans le bassin algérien, l'eau atlantique modifiée pénétrerait (Milot, 1987 ; Milot, 1993 et Benzohra, 1993) sous forme d'une veine de courant étroite qui donne naissance à des méandres et tourbillons côtier associés à des upwellings. Ces derniers favoriseraient une forte productivité biologique et par conséquent, une augmentation des capacités trophiques du milieu (homogénéiser).

a) Situation géographique du golfe d'Annaba

Le golfe d'Annaba est limité à l'Est par le cap Rosa (8°15'Est et 36°58'Nord) et à l'ouest par le cap de Garde (7°47'Est et 36°58'Nord) ; la distance séparant les deux caps est d'environ (40km), la profondeur maximale des eaux est de 65 mètres. Selon Vaissière et Fredj (1963), le plateau continental est généralement étroit, avec un fond hétérogène ; ce dernier est accidenté, nettement restreint au nord du cap de garde, puis s'élargit dans le golfe jusqu'à 27Km puis se rétrécit légèrement dans le cap Rosa (Figure. 8a et 8b).

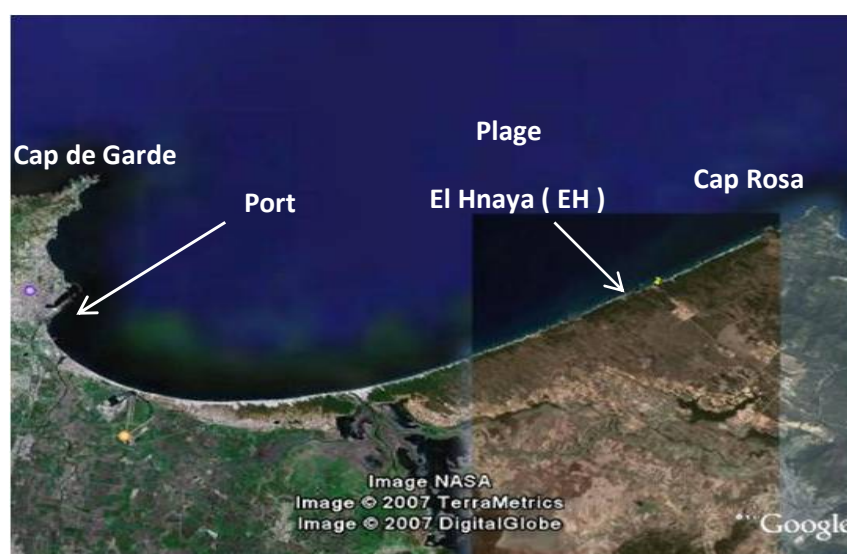


Figure 8a : Situation géographique des sites au niveau du golfe d'Annaba

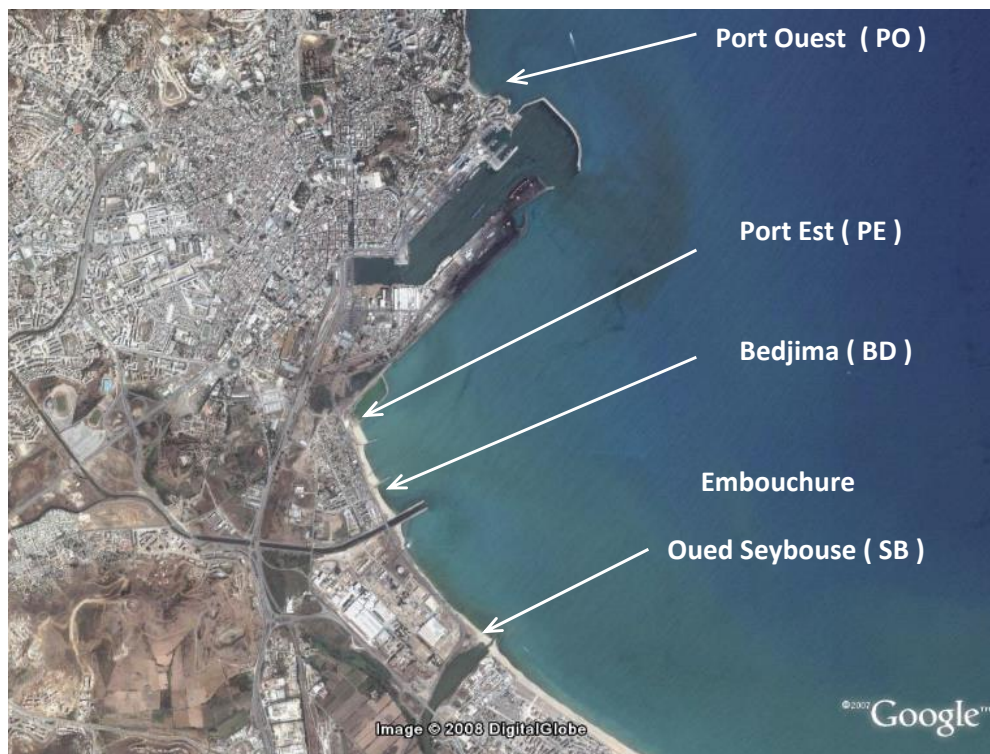


Figure 8b : Situation géographique des sites supposés perturbés.

Du point de vue sédimentologie, le fond marin débute généralement par du sable fin dans le secteur Ouest puis ce sable se mélange avec de la vase fine dans le secteur Est. Une chaîne d'herbiers de posidonies, installée sur des substrats rocheux qui se continuent par des vases terrigènes molles à du sable ou a des débris coquilliers. La température varie entre 16°C en hiver et 28,8°C en été avec une amplitude de 12,8°C (Frehi, 1998) ; La température joue un rôle important dans les variations de densité de l'eau. La salinité varie en fonction des zones, au sud Est, les valeurs variaient de 31,4 à 37,5 psu avec une amplitude de 0,7 psu les variations halines sont dues aux rythmes des débits des oueds Seybouse et Bedjima.

En général, les teneurs en éléments minéraux azotées sont très hétérogènes et s'organisent selon un gradient décroissant depuis la côte vers le large. Selon Frehi (1998), les concentrations maximales sont observées dans les secteurs perturbés (Sud Est), alors qu'au niveau des zones les plus éloignées (Nord Ouest), les teneurs sont deux fois moins élevées pour les nitrates, cinq fois pour les nitrites, treize fois pour l'ammonium et neuf fois pour les phosphates.

Les courants dans le golfe d'Annaba, présentent à son ouverture, après le Cap de Garde, une circulation orientée vers l'Est avec des vitesses fluctuantes selon les saisons pouvant atteindre

0,5 à 1 m/s. Ce courant part de la face Sud Est du Cap de Garde en direction de l'embouchure de l'oued Mafragh (Anonyme, 1976).

Dans le golfe d'Annaba se jettent essentiellement trois oueds : Seybouse, la Mafragh et Bedjima ; ces derniers charrient vers le golfe les eaux de leur bassin versant. Ces eaux charriées se composent d'eaux de pluie, de rejets directs de polluants industriels. Le golfe reçoit aussi les eaux usées urbaines qui ne subissent qu'un traitement sommaire au niveau de la station de traitement des eaux de Sidi Brahim, ainsi que de nombreux autres émissaires provenant des différentes plages qui longent le golfe.

b) Les différents sites de l'étude

Du fait de certains problèmes (difficultés d'accès, absence de moules, etc.), le choix des sites étudiés est fondé sur leur emplacement par rapport aux différents rejets de la source de pollution. Cinq sites de prélèvement de moules ont été choisis, de l'ouest vers l'est. Seront décrits dans cette partie, les sites à proximité de différents rejets et la station de référence étant à l'extrême Est (Figure. 8b).

▪ Les ports Ouest (PO) et Est (PE)

PO : Lat. : 36°N 53'03.0 ; Long. : 07°E 45'41.0

PE : Lat. : 36°N 54'33.0 ; Long. : 07°E 46'29.0

Le Port d'Annaba, fait partie des dix (10) principaux Ports de Commerce d'Algérie. Son champ d'influence s'étend sur douze Wilayas du pays où sont situées des zones industrielles à fort potentiel de développement et des ressources naturelles tels que les mines de fer, de phosphates et les champs pétroliers. Sur le plan industriel, le port d'Annaba se trouve au coeur d'une zone industrielle parmi les plus importantes du pays avec notamment :

- Le complexe sidérurgique d'El Hadjar (fonte, acier, et autres produits sidérurgiques).
- Le complexe d'engrais phosphatés et ammoniac « FERTIAL ».
- Des unités industrielles de fabrications de charpentes métalliques.
- Une moyenne et petite industrie diversifiées dans le domaine agroalimentaire.
- Les mines de phosphate exploitées à « Djebel Onk » et les unités de FERPHOS, Mittal Steel produisant du minerai de fer et du charbon ainsi que SIDER, plus grande usine sidérurgique

intégrée dans la région du Maghreb. Sont toutes reliées par voie ferroviaire directement au port d'Annaba.

Ces 2 sites PO et PE sont des réceptacles de rejets urbains domestiques et industriels (Figure.8b).

- **Oued Bedjima (BD):** Lat.: 36°N 52'39.0; Long. : 07°E 45'54.0

Cet oued traverse les terres agricoles, drainant des eaux usées du complexe sidérurgique d'El Hadjar et des deux zones industrielles Pont Boucher et Sidi Amar.

Ce site est situé à proximité de l'unité de fabrication d'engrais phosphatés et d'ammoniac appelée autrefois complexe « Asmidal ». Les rejets de l'ensemble de l'unité, se jettent directement dans la mer, d'autre part du soufre est rejeté dans l'atmosphère (Figure. 8b).

- **Oued Seybouse (SB):** Lat.: 36°N 52'85.0 ; Long. : 07°E 46'53.0

L'oued Seybouse draine un bassin versant de 6474 km². Il prend naissance dans les hautes plaines des Heractas avant de se jeter dans la mer Méditerranée. Il transporte des rejets de toutes sortes (urbains, industriels, ...) qui ont augmenté, particulièrement dans la partie aval (Guelma - Annaba), caractérisée par une industrialisation importante (cycles, céramique, carrelage, sucrerie, conserveries, lait, métallurgie, ...).

Du fait de l'exode rural massif des villes entières ont été construites au mépris des règles élémentaires de protection de l'environnement. En effet, les rejets des eaux usées se font à même l'oued. Seybouse, eau qui se jette dans la mer, recueille les eaux usées de près de 86 unités industrielles (Tawfiq, 2008) qui ne sont pas traitées. Selon des statistiques, rendues publiques lors d'une récente rencontre consacrée à la gestion durable des ressources hydriques et à la protection du périmètre agricole de la Seybouse, près de 4,5 millions de m³ d'eaux usées se déversent annuellement dans cet oued. Le plus grave est que près de 3 millions de m³ de ce volume sont des huiles usagées provenant des unités industrielles, potentiellement polluantes. Les analyses effectuées au niveau de l'oued Seybouse (Djabari *et al.* 2005) indiquent de fortes concentrations en chlorures (1600 mg/l), nitrates (80 mg/l), nitrites (20 mg/l), ammonium (70 mg/l), phosphores (15 mg/l), mais, une concentration en oxygène dissous presque nulle. Ces concentrations dépassent les normes admises elles sont à l'origine de l'eutrophisation constatée au niveau de l'oued (Figure. 8b). Tous ces éléments font que le site Seybouse est un site pollué.

- **La plage El Hnaya (EH):** Lat. : 36°N 54'24.0 ; Long. : 08°E 07'35.0

La plage « El Hnaya » se trouve à environ 30 km à l'Est d'Annaba entre le village de Berrihane et de Kantra El-Hamra et à 18 km à l'est de l'oued El Mafragh (agriculture et urbanisation). L'îlot sur lequel a été effectuée notre étude est situé au large à environ 500 m de la plage. C'est une station loin de toute pollution (Figure. 8a et 9) et que nous avons considéré en tant que site de référence pour l'ensemble des travaux de la thèse.



Figure 9 : Site de prélèvement au niveau de la plage El Hnaya

2.2 Stratégie d'échantillonnage

Quatre prélèvements saisonniers de bivalves (Figure. 10) ont été effectués au cours de l'année 2006-2007 sur les cinq (5) sites de l'étude. Un prélèvement de moules (une trentaine) par saison destinés à la biométrie a été réalisé le 14 avril 2006 (Pr1), le 13 août 2006 (Pr2), le 10 octobre 2006 (Pr3), et entre le 29 décembre 2006 et le 10 janvier 2007 (Pr4), et un lot d'environ 183 individus pour les analyses chimiques et 640 pour les analyses biochimiques.

Pr1	Pr2	Pr3	Pr4
(14/04/06)	(13/08/06)	(10/10/06)	(29/12/06 et 10/01/07)
PRINTEMPS	ETE	AUTOMNE	HIVER

Figure 10 : Diagramme représentant les différentes dates de prélèvement dans le golfe d'Annaba au cours des saisons.

La collecte des bivalves a été faite à la main et de manière aléatoire comme le stipule Serafim (2001) sans tenir compte du sexe, entre 20 et 50 cm de la surface de l'eau de mer. Chaque récolte de bivalves est répartie dans des bacs en plastique contenant 30 individus baignant dans leur eau d'origine, en fonction de chaque site et pour chaque saison. Ces bivalves sont ensuite conduits au laboratoire afin de procéder à l'analyse biométrique (conservés dans un bac isotherme).

2.3. Mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau

Parmi les facteurs abiotiques, les facteurs physico-chimiques (température, salinité, O₂ dissous, pH, etc.) du milieu jouent un rôle essentiel puisqu'ils influent à la fois sur la forme physico-chimique des métaux (état de valence, adsorption désorption, etc.) donc sur leur biodisponibilité, mais également sur le métabolisme des espèces (osmorégulation, respiration, reproduction, activité trophique, etc.) dont dépendent en partie les cinétiques d'accumulation et d'excrétion des métaux (Karayücel et Karayücel, 2000).

Dans cette étude, deux paramètres ont été mesurés : la température et la salinité, les deux descripteurs de base des masses d'eau, dépendant quasi exclusivement des processus physiques. Les mesures ont été effectuées « *in situ* » au moment du prélèvement, au moyen d'un multi paramètre (Consort 535). L'étalonnage et le calibrage de l'appareil pour chaque paramètre mesuré ont lieu au laboratoire et sur terrain, on immerge la sonde spécifique au paramètre à mesurer pendant quelques secondes et le résultat s'affiche sur l'écran. Les sondes sont rincées à l'eau distillée puis essuyées avec du papier absorbant après chaque manipulation.

2.4. Mesure des paramètres biologique

a) Biométrie

Les bivalves sont triés, nettoyés et débarrassés de leurs épibiontes, avant de prendre les différentes mesures de la coquille réalisée à l'aide d'un pied à coulisse de précision 1/20 mm, cette opération est réalisée rapidement afin d'éviter tout stress, phénomène biologique pouvant être à l'origine d'une baisse de poids de la masse molle totale et par la suite de l'indice de condition comme le montrent Beninger et al. (1984). Ainsi, les paramètres linéaires (en mm) retenus sont (voir figure. 11):

- **La longueur totale (L : prise suivant l'axe antéro -postérieur)**
- **La hauteur (h : distance maximale suivant l'axe dorsa-ventral).**
- **L'épaisseur (l: est la largeur maximale de la convexité des 2 valves réunies)**

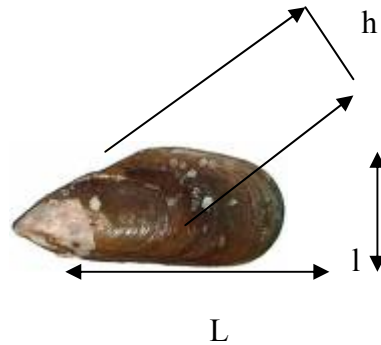


Figure 11 : Les différents paramètres linéaires de *Perna perna*

Chaque individu (pour un effectif de 30) a été pesé à l'aide d'une balance électronique (Sartorius H110, de précision 0,01g près) pour déterminer les paramètres pondéraux suivants:

- **Poids total de la coquille (PT) :** poids total de l'animal (coquille, masse molle et liquide intra valvaire).
- **Poids frais total (PF) :** poids de la masse molle humide totale en gramme de l'animal vivant.
- **Poids sec de la chaire (PS) :** poids sec de la chaire entière de la coquille, obtenu après séchage à l'étuve à 80°C pendant 24 heures au minimum.

b) Croissance relative

L'étude de la croissance relative des bivalves a été faite par l'analyse biométrique qui établit la relation existante entre la taille et le poids par la loi d'allométrie simple qui s'exprime par l'équation suivante :

$$Y = a L^b$$

Y : dimension de l'organe ou proportion du corps étudié

L : Longueur de la coquille.

a : ordonnée à l'origine

b : coefficient d'allométrie

Cette équation peut également être exprimée sous la forme d'une équation linéaire après transformation logarithmique :

$$\text{Log } Y = \text{Log } a + b \text{ Log } L$$

où (Log a est l'ordonnée à l'origine et b est la pente de la droite). Le coefficient allométrique est exprimé par la pente b de l'équation. Pour déterminer le type d'allométrie, la pente a été comparée à une valeur théorique égale à 3, à l'aide du test *t* de Student selon Trigui, (1995), pour la croissance pondérale et à 1 pour la taille.

- si $a = 3$, ou $b = 1$, il y a isométrie : croissance des 2 proportions du corps dans le même sens.
- si $a < 3$, ou $b < 1$, l'allométrie est dite minorante.
- si $a > 3$, ou $b > 1$, l'allométrie est dite majorante.

Les valeurs a et b sont déterminées par l'équation de la régression linéaire, le calcul du coefficient de détermination R^2 donne le degré d'ajustement à cette régression. Dans la littérature, on décrit que si $b \geq 3$ les animaux sont en période de maturité sexuelle, inversement si $b < 3$ ils sont en période de ponte (Cattaneo, 2000).

c) Indice de condition

Dans une étude de suivi environnemental, les indices de condition (IC) ne sont pas des biomarqueurs au sens strict de la définition de Van Gastel et Van Brummelen (1996) mais ils donnent une idée de l'état de santé des individus d'une population (Bodoy et Massé, 1979; Anssel et *al.* 1980; Lucas et Beninger, 1985 et Pellerin-Massicotte et *al.* 1989, de plus ils sont simples à réaliser, de faible coût. Les IC peuvent être affectés par de nombreux paramètres

(alimentation, température, polluants ...) qui seraient dus à une diminution de l'alimentation chez les organismes et modifieraient ainsi ses réserves énergétiques (Amiard *et* Amiard, 1998), ils se calculent par le rapport du poids des tissus mous sur le poids total et sont exprimés en pourcentage (norme AFNOR NF V 45056, septembre 1985).

$$I C = \frac{\text{Poids des tissus mous}}{\text{Poids total de la coquille}} \times 100$$

3. Analyse des métaux

L'accumulation des métaux (Cd, Cu et Zn) est étudiée sur des animaux prélevés sur le terrain ou sur des animaux mise en expérience et exposés à différentes concentrations en métaux. Les animaux sont mis à l'étuve à 60° C jusqu'à obtention d'un poids constant (de 24 à 78 h). Avant d'effectuer l'analyse en métaux des différents échantillons, il faut au préalable leur faire subir une minéralisation, c'est-à-dire une destruction de la matière organique par attaque acide (acide nitrique HNO₃ Suprapur à 65%).

Les pesées, les expériences de minéralisation et les analyses de métaux par spectrophotométrie d'absorption atomique ont été réalisés dans le laboratoire R.O.S.E. « Réponses des Organismes aux Stress de l'Environnement » de l'Université de Nice-Sophia Antipolis (France).

Les échantillons biologiques sont pesés puis placés dans des bombes de minéralisation en téflon avec l'acide nitrique (le volume utilisé est variable en fonction du poids de l'échantillon: 3 mL/ 100 mg de poids sec, puis 1 mL de plus pour 100 mg supplémentaires en se limitant à 10 mL) pendant 12 heures. Les bombes sont alors hermétiquement fermées (afin d'obtenir une élévation de la pression) et mises sur un carrousel disposé dans un four à micro-onde MSD-81D. Les champs de très hautes fréquences engendrés par les micro-ondes au sein du minéralisât provoquent son échauffement par l'agitation intense des molécules.

Le cycle de minéralisation est le suivant :

- **4 minutes à 40% (240 watts) ;**
- **refroidissement 10 minutes ;**
- **4 minutes à 30% (180 watts) ;**
- **5 minutes à 37% (222 watts).**

Les minéralisats sont ensuite récupérés avec de l'eau ultra-pure (Milli-Q) et transférés dans des flacons en polypropylène (Falcon).

Les métaux sont dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique. L'échantillon, c'est-à-dire le minéralisat précédemment préparé, est atomisé. Il est transformé en atomes neutres (vapeur atomique) à l'état fondamental par chauffage soit dans une flamme air-acétylène (atomisation en flamme), soit dans un four graphite (atomisation en four). On irradie cette vapeur avec une lampe spectrale émettant les raies de transition des atomes recherchés (lampe à cathode creuse). En raison de la quantification des états énergétiques, seuls les atomes concernés absorbent la radiation excitatrice émise par la lampe et l'absorption lumineuse que l'on mesure est liée à la concentration de l'élément dans la solution par la loi de Beer-Lambert : $D.O. = \epsilon \cdot l \cdot c$ ($D.O.$ = densité optique ; ϵ = coefficient d'extinction moléculaire ; l = longueur du trajet optique ; c = concentration de l'élément à doser). L'appareil de spectrophotométrie d'absorption atomique utilisé est un GBC 904 AA. L'absorption non spécifique est corrigée par l'emploi d'une lampe au deutérium.

L'appareil est étalonné pour les différents métaux étudiés. Les solutions étalons sont réalisées à partir de solution-mère de chlorures métalliques par dilution avec de l'acide nitrique 0,1N, afin d'avoir la même normalité en acide que les échantillons. Les concentrations des solutions étalons sont comprises entre :

- **pour le cadmium : 0,750 et 3 µg/L (four) et 0,125 et 1 mg/L (flamme) ;**
- **pour le cuivre : 5 et 20 µg/L (four) et 0,125 et 1 mg/L (flamme) ;**
- **pour le zinc : 0,750 et 4 mg/L (flamme).**

On effectue d'abord l'étalonnage, puis l'appareil calcule la droite de régression correspondante et le coefficient de corrélation. Chaque étalon et chaque échantillon sont dosés 3 fois. Suivant la concentration en métal présente dans l'échantillon, on utilise l'atomisation soit par la flamme soit par le four (qui permet des mesures des concentrations beaucoup plus faibles). La courbe étalon sert à calculer les concentrations de chaque échantillon après lecture de la densité optique. A partir du volume de minéralisation, on calcule la quantité absolue de métal (µg de Cd, Cu ou Zn) que l'on rapporte au poids de l'échantillon.

Pour assurer la qualité des dosages des métaux, du matériel standard de référence (Tort2 : hépatopancréas de homard fourni par le Centre National de la Recherche du Canada) est analysé en parallèle. Nos résultats sont en accord avec les valeurs certifiées qui sont représentées sur le (Tableau. V). L'absorption non spécifique est corrigée par l'emploi d'une lampe au deutérium. L'analyse du matériel standard de référence (TORT-2, 1994) valide les déterminations.

Tableau V : Analyse du matériel standard de référence Tort 2 (Hépatopancréas de homardfourni par le Conseil National de Recherches du Canada)

Métal	Valeurs certifiées μg /g p.s	n	Nos valeurs
Cd	$26,7 \pm 0,6$	5	$26,4 \pm 1,4$
Cu	106 ± 10	5	101 ± 1
Zn	180 ± 6	5	174 ± 8

4. Analyse des biomarqueurs

Toutes les manipulations concernant le dosage des biomarqueurs lors du broyage des tissus (branchies et glandes digestives) sont réalisées à 4 °C dans de la glace en figure ci-dessous.



4.1Protéines

Les protéines sont mesurées par la méthode de Bradford (1976) avant le dosage du GSH et de l'activité GST car les résultats de ces dosages seront exprimés de manière spécifique par mg de protéines. La méthode de dosage des protéines combine plusieurs avantages :

- elle est rapide car sans incubation ;
- sa gamme de sensibilité est inférieure d'un ordre de grandeur à la concentration des protéines que nous testons, et donc les mesures sont précises car il est inutile de diluer fortement les échantillons avant de les mesurer ;

Le principe de cette méthode colorimétrique repose sur l'utilisation d'un colorant, le bleu de Coomassie qui, initialement rouge, vire au bleu quand il se lie aux protéines. La couleur bleue résulte de l'interaction des groupements anioniques du colorant avec les groupements aminés des protéines. Le complexe formé est stable pendant environ 1 heure.

Les protéines ont été quantifiées en, utilisant le Bleu Brillant de Coomassie (G 250, Merck) comme réactif et l'albumine sérum de bœuf (BSA, fraction V de Merck®) comme protéine standard. Les absorbances sont lues au spectrophotomètre d'absorption moléculaire (ou colorimètre) à une longueur d'onde de 595 nm qui est proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon biologique.

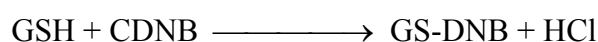
4.2 Glutathion

Les échantillons de branchies et de glandes digestive (environ 1g) sont homogénéisés dans 3 ml de tampon phosphate pH 7,5, puis déprotéinisés par l'acide sulfo- salicylique à 0,25% afin de protéger les groupements thiol (-SH) du glutathion. Après centrifugation à 1000 x g pendant 10 min le surnageant est utilisé pour le dosage par spectrophotométrie avec le réactif DTNB (acide 5,5 dithiobis-2- dinitrobenzène) à 0,01M, la lecture se fait à 412nm suivant la méthode simple de Weckbercker et Cory (1988).

4.3 Glutathion transférase

La réaction se mesure au spectrophotomètre en suivant la formation du conjugué entre le glutathion réduit (GSH) et un substrat modèle, peu spécifique des différentes isozymes de GST, le chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB). Ce produit de conjugaison est le 1-glutathion-2,4-dinitrobenzène (GS-DNB). La méthode est de Habig *et al.* (1974).

GST



Le milieu réactionnel contient, dans une cuve en quartz d'un volume final de 1 mL :

- 50 μL de fraction cytosolique de protéines, soit de 50 à 250 μg ;
- 1 mM de CDNB, à partir d'une solution à 20 mM en éthanol ;
- 10 mM de GSH, à partir d'une solution à 100 mM en H_2O ;
- 160 mM d'un tampon Phosphate de Potassium à partir d'une solution mère à 200 mM ajustée à pH 6,5 par mélange de K_2HPO_4 et KH_2PO_4 , les deux étant respectivement à 200 mM.

La cinétique de la réaction est suivie durant 30 secondes à 340 nm et à 37°C. La vitesse initiale est proportionnelle à la quantité d'enzyme introduite dans la cuve. Un blanc sans protéine est mesuré avant les échantillons, il permet d'évaluer la vitesse de la réaction spontanée, qui n'est pas négligeable. Le coefficient d'extinction moléculaire $\varepsilon = 9,6 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ est appliqué, il permet l'expression de l'activité enzymatique en nmoles/min/mg de protéines. Les méthodes de références utilisées pour le dosage biochimique sont données dans le tableau VI.

Tableau VI : Méthodes de références et unités utilisées pour l'analyse des biomarqueurs

Biomarqueurs	Unité	Références publications
Protéines	mg.ml^{-1}	Bradford (1976)
GST	$\text{nmoles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéine	Habig <i>et al.</i> (1974)
GSH	nmoles.mg^{-1} de protéine	Weckberker et Cory (1988)

4.4. *Survie à l'air* : Stress on stress

La méthode (Viarengo *et al.* 1995) consiste à superposer deux types de stress (« stress on stress » en anglais) sur des mollusques prélevés en mer, en différentes stations du littoral : au stress que subissaient déjà les animaux dans leur milieu naturel si celui-ci était pollué, on ajoute un deuxième facteur perturbant en les plaçant à l'air libre en laboratoire (Figure. 12). Si les mollusques sont d'ordinaire capables de supporter des émergences prolongées (quelques jours pour la moule), leur résistance à la mise à l'air libre est amoindrie s'ils avaient auparavant été l'objet de contaminations chimiques en mer ; ce sont donc ces individus, doublement perturbés, qui mourront les premiers tandis que leurs congénères sains seront en mesure d'endurer le traitement pendant un laps de temps plus long. La comparaison des taux de mortalité, aux mêmes

temps, pour les différents sites de provenance des animaux, donne en fin de compte une indication relative sur l'état de « santé » des stations étudiées.

On calcule ensuite le pourcentage de survivants pour chaque jour et enfin le Temps Létal Moyen où 50% des animaux sont morts (TLM 50), par la formule suivante :

$$A = [50\text{-}\% \text{ à } T (<50 \text{ \% de morts})] / [\% \text{ à } T (>50 \text{ \% de morts}) - \% \text{ à } T (<50 \text{ \% de morts})]$$

$$B = T (<50 \text{ \% de morts}) / T (>50 \text{ \% de morts})$$

$$C = A * \text{LOG} (B)$$

$$D = \text{LOG} [T (<50 \text{ \% de morts})] - C$$

$\text{TLM } 50 = 10^D$



Figure 12 : Moules exposées à l'anoxie lors de l'expérience du SOS

5. Expériences de Laboratoire

Les bivalves, de longueur 60mm environ, ont été collectés sur le site témoin. Au laboratoire E.M.M.A.L (dispositif expérimental en figure. 13), ces bivalves sont transférés dans des bacs propres remplis d'eau de mer naturelle, à raison de 3 animaux par litre d'eau, ces derniers seront

acclimatés d'un jour aux conditions du laboratoire à une température de $16 \pm 2^\circ \text{C}$. Un bullage permanent permet de saturer le milieu en oxygène. Les moules sont soumises à une photopériode de 12h jour/12h et une salinité de l'eau de 37 psu. Le renouvellement tous les deux jours de l'eau de mer des témoins et des exposés constitue leur unique source de nourriture.

Durant l'expérience, les moules ont été traitées simultanément durant 7 jours à différentes concentrations d'une part, d'une solution de CdCl_2 à 50, 100 et 200 $\mu\text{g Cd/l}$, et d'autre part à différentes concentration de cuivre à 10, 15 et 25 $\mu\text{g Cu/l}$ pour l'expérience de l'été. Pour des raisons techniques, l'expérience de contamination par le cuivre en hiver n'a pu être effectuée.

A l'issue de l'expérience, deux groupes de bivalves ont été constitués : un premier groupe ($n=5$ par condition) destiné aux analyses biochimiques et un deuxième groupe ($n=5$ par condition) pour l'analyse chimique.

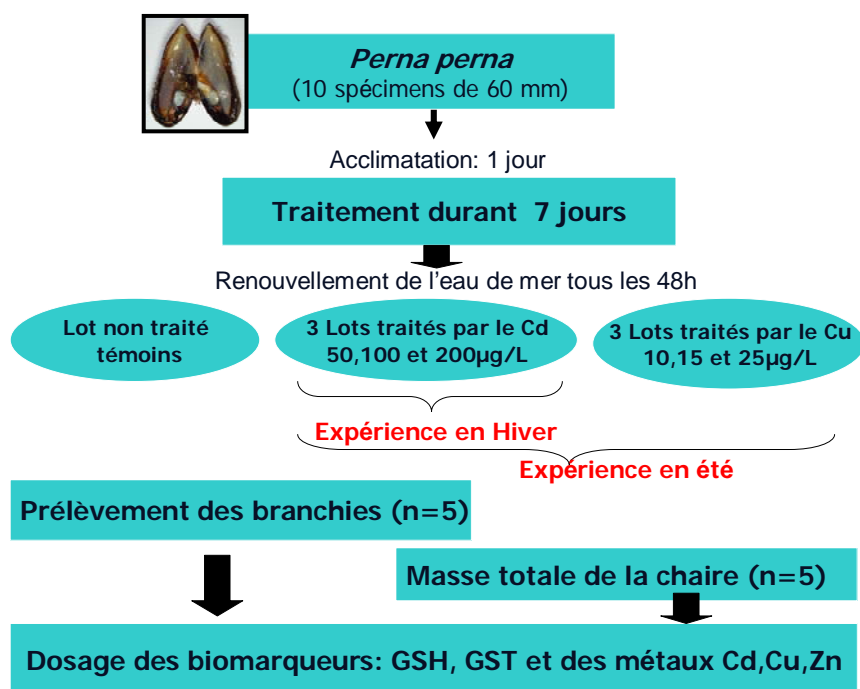


Figure 13: Dispositif expérimental des deux expériences réalisées au laboratoire

Les branchies sont immédiatement prélevées et congelées à -20°C . Au moment de l'analyse, les échantillons sont décongelés et homogénéisés. L'homogénéisation se fait dans du tampon Tris ($\text{pH}=7$) contenant des anti-protéases, les échantillons peuvent être aliquotés avant d'être analysés. L'analyse des deux biomarqueurs (GSH et GST) a été décrite ci-dessus.

Analyse statistique

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique grâce au logiciel Minitab 13.31 pour Windows (X, 2000). On vérifie en premier lieu la normalité des données. Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins l'écart-type ($m \pm s$). Les moyennes ont été comparées deux à deux par le test t de Student. Une analyse de la variance ANOVA à deux critères de classification (site, saison) a été effectuée. Le seuil de signification est précisé dans chaque cas, au minimum, il est de $p < 0,05$.

RESULTATS

CHAPITRE III : RESULTATS DE TERRAIN

Durant l'année 2006, nous avons effectué à différentes saisons des mesures de température et de salinité de l'eau de mer des différents sites du golfe d'Annaba. Ensuite, nous avons exploité les résultats des mesures morpho-métriques des bivalves pour enfin mesurer indirectement le degré de pollution en dosant dans leur chair la concentration de glutathion, les activités transférase et enfin, les concentrations de trois métaux important sur le plan de l'environnement (Cd, Cu et Zn). Nous présentons les résultats ci-dessous.

1. Données physico-chimiques

1.1 La température

La température intervient directement sur la cinétique des processus biologiques, les moules étant poïkilothermes (Incze *et al.* 1980). Les variations saisonnières de ce paramètre doivent être prises en compte (Cossa *et al.* 1980 ; Amiard *et al.* 1986; Cain et Luoma, 1986; Langston et Spence, 1995).

Les variations saisonnières de la température de l'eau de mer sont représentées dans la figure 14. On note la présence d'une évolution saisonnière avec un minimum de 10,8°C au niveau du site SB en janvier 2007 et des températures élevées variant entre un minimum de 26°C respectivement sur les sites BD et EH et un maximum de 28°C en été au niveau du PO (voir Tableau. VII en annexe 1).

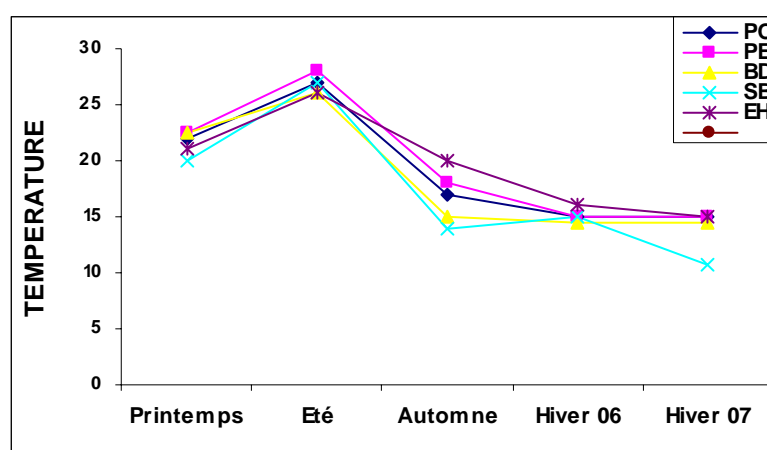


Figure 14 : Evolution saisonnière de la température des eaux du golfe d'Annaba

1.2 La salinité

En ce qui concerne la salinité, nous notons les valeurs les plus basses au niveau de l'oued Seybouse (SB, Figure.15) allant de 25,88 à 10,8 homogénéiser psu respectivement au printemps et en hiver, cette dessalure correspond à l'entrée d'eau douce (pluies drainées par l'oued) importante durant la saison hivernale. Un maximum de 37,9 psu est enregistré en été au niveau de SB. Le détail est en annexe 1.

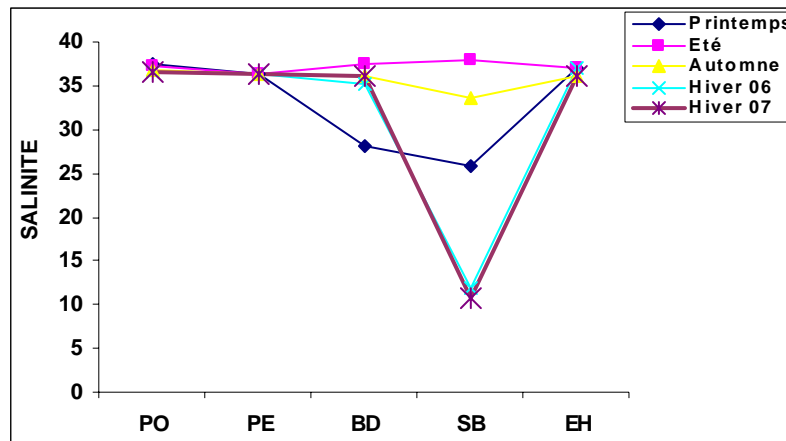


Figure 15: Variation saisonnière de la salinité des eaux du golfe d'Annaba

2. Analyse des paramètres biométriques

L'étude présentée ici a porté sur 150 bivalves par saison ; les caractéristiques biométriques sont notées dans le Tableau. IX, en page 47.

Dans le golfe d'Annaba, la moule africaine a une taille comprise entre 30mm et 120mm, la taille minimale étant enregistrée au niveau des oueds Bedjima (BD) et Seybouse (SB) et maximale au niveau de la plage El Hnaya (EH), avec un poids saisonnier variant de 2 g (SB) à 105g (EH). En comparant avec les données de la littérature, il semblerait que la moule *Perna perna* du golfe d'Annaba atteigne une taille assez grande, puisque par exemple au Congo, la taille de *P. perna* varie entre 65 et 76mm. Le poids maximal théorique de *P. perna* au niveau de la baie d'Alger (Bordj el Kiffan) est de 35,13g pour une taille de 67,1mm (Abada-Boudjema, 1984) ; Asso (1982) observe que les moules *Perna perna* prélevées sur la jetée Nord du port d'Alger ont une taille importante (120 mm).

Tableau IX : Paramètres biométriques qui ont fait l'objet de l'étude, date et site de collecte. N = nombres d'individus, moyenne géométrique [valeur minimale - valeur maximale], IC = indice de condition.

Date	Site	N	Poids (gr)	Taille (mm)	N	IC
Avril 2006	PO	30	34,49 [04,75 -61,33]	67,93 [52 - 94]	6	20,42 ± 1,39
Avril 2006	PE	30	30,42 [17,68 - 68]	62,4 [51 - 83]	6	20,05 ± 1,95
Avril 2006	BD	30	8,95 [04,75 -17,16]	40,61 [31 - 53]	6	19,66 ± 1,38
Avril 2006	SB	30	12,02 [02,67 - 32,44]	39,13 [18 - 74]	6	18,21 ± 2,93
Avril 2006	EH	30	33,13 [15,31 - 69,29]	73,82 [53 - 99]	6	21,89 ± 2,96
Aout 2006	PO	30	28,42 [6,75 - 58,86]	57,58 [31 - 82]	6	26,63 ± 3,83
Aout 2006	PE	30	23,00 [06,68 - 41,25]	59,1 [40 - 73]	6	23,68 ± 2,61
Aout 2006	BD	30	9,30 [05,67 - 19,61]	40,73 [32 - 52]	6	24,29 ± 1,65
Aout 2006	SB	30	12,99 [07,52 - 18,41]	42,95 [35 - 53]	6	19,72 ± 9,82
Aout 2006	EH	30	35,42 [10,11 - 79,98]	69,23 [52 - 89]	6	26,45 ± 4,57
Octobre 2006	PO	30	13,97 [07,04 - 17,77]	47,93 [33 - 56]	6	19,63 ± 6,18
Octobre 2006	PE	30	19,14 [09,44 - 28,07]	55,56 [43 - 68]	6	21,73 ± 4,56
Octobre 2006	BD	30	17,09 [12,67 - 25,87]	55,66 [42 - 55]	6	17,11 ± 3,18
Octobre 2006	SB	30	13,99 [07,73 - 29,15]	48,03 [40 - 58]	6	18,40 ± 1,74
Octobre 2006	EH	30	28,33 [11,37-104,72]	62,23 [44 - 120]	6	20,75 ± 1,14
Décembre2006 Janvier 2007	PO	30	19,13 [11,33 - 48,09]	55,65 [40 - 75]	6	30,09 ± 3,11
Décembre2006 Janvier 2007	PE	30	14,98 [08,98 - 22,24]	50,66 [41 - 59]	6	26,18 ± 2,32
Décembre2006 Janvier 2007	BD	30	12,44 [04,28 - 19,07]	44,12 [30 - 54]	6	22,13 ± 5,93
Décembre2006 Janvier 2007	SB	30	11,63 [04,54 - 36,06]	44,65 [32 - 57]	6	22,50 ± 6,15
Décembre2006 Janvier 2007	EH	30	27,19 [18,83 - 42,04]	62,54 [53 - 75]	6	28,14 ± 6,38

2.1 Caractères métriques : croissance relative

Les équations d'allométrie exprimant la relation entre les différents caractères métriques (largeur et hauteur de la coquille) en fonction de la longueur totale des bivalves, mesurés durant les quatre saisons, ainsi que leurs coefficients de corrélation, sont représentés dans le Tableau. X.

L'examen du tableau montre une corrélation significative ($P=0,05$) entre les différents caractères métriques mesurés. Ainsi, une forte corrélation entre la longueur et la hauteur est observée en été ($r = 0,92$) et en automne ($r = 0,94$) au niveau du site témoin, cette dernière est moins significative durant les autres saisons. La corrélation la plus faible est notée à l'automne au niveau de BD ($r=0,164$) et en hiver au niveau de PE ($r=0,364$). Les fonctions reliant la longueur à la largeur et/ou à la hauteur sont significatives au cours des saisons.

Toutefois, on remarque que la croissance en fonction de la largeur et la hauteur est de type allométrie minorante où la longueur croît plus vite que la largeur ; des cas d'isométrie (la croissance d'un paramètre étant alors proportionnellement inférieure ou supérieure à la croissance du paramètre de référence) ont été enregistrés en été et à l'automne au niveau des sites PE, SB et PO respectivement et en hiver au niveau du site PE et BD.

L'étude statistique (en annexe 2) et les corrélations reliant le poids total des bivalves à la longueur totale de la coquille (Tableau. XI, en page 50) font apparaître des valeurs élevées du coefficient de corrélation ($r= 0,81$), témoignant d'une corrélation significatives ($p= 0,0001$) entre ces variables. La croissance dans ce cas est de type allométrie minorante, ce qui laisse supposer que le poids des bivalves croît moins vite que la taille.

Tableau X : Equation de régression reliant la longueur (L), à la largeur (l) et à la hauteur (h) de la coquille chez *P. perna* au cours des quatre saisons.

	Fonctions	r	Axe majeur réduit	Equation d'allométrie	Valeurs limites	t obs.
Print	l = f (L)	0,765	f (l)= 0,614L+0,404	f (l)= 2,535L ^{0,614}	26 < l < 42	4,20 Minorante
PO	h= f (L)	0,830	f (h)= 0,791L- 0,018	f (h)= 1,042L ^{0,791}	20 < h< 36	Minorante
PE	l = f (L)	0,781	f (l)= 0,585L+0,454	f (l)= 2,844L ^{0,585}	27 < l < 42	4,84 Minorante
	h= f (L)	0,767	f (h)= 0,769L- 0,058	f (h)= 1,142L ^{0,769}	22 < h< 27	Minorante
BD	l = f (L)	0,781	f (l)= 0,724L+0,192	f (l)= 1,555L ^{0,724}	19 < l < 29	2,56 Minorante
	h= f (L)	0,767	f (h)= 0,639L -0,163	f (h)= 1,455L ^{0,639}	11 < h< 25	Minorante
SB	l = f (L)	0,712	f (l)= 0,573L+0,413	f (l)= 2,588L ^{0,573}	10 < l < 34	4,42 Minorante
	h= f (L)	0,818	f (h)= 0,730L- 0,073	f (h)= 1,183L ^{0,730}	09 < h< 21	Minorante
EH	l = f (L)	0,769	f (l)= 0,631L+0,355	f (l)= 2,588L ^{0,573}	10 < l < 34	3,76 Minorante
	h= f (L)	0,694	f (h)= 0,631L+0,355	f (h)= 1,183L ^{0,730}	09 < h< 21	Minorante
Eté	l = f (L)	0,903	f (l)= 0,691L+0,257	f (l)= 1,807L ^{0,691}	19 < l < 38	4,66 Minorante
PO	h= f (L)	0,830	f (h)= 1,028L-0,444	f (h)= 2,779L ^{1,028}	13 < h< 33	Minorante
PE	l = f (L)	0,849	f (l)= 0,924L-0,150	f (l)= 1,412L ^{0,924}	22 < l < 43	0,81
	h= f (L)	0,850	f (h)= 0,982L-0,406	f (h)= 2,546L ^{0,982}	11 < h< 26	Isométrie
BD	l = f (L)	0,659	f (l)= 0,639L-0,325	f (l)= 2,113L ^{0,639}	18 < l < 27	4,62 Minorante
	h= f (L)	0,791	f (h)= 1,023L-0,448	f (h)= 2,805L ^{1,023}	12 < h< 22	Minorante
SB	l = f (L)	0,797	f (l)= 1,025L-0,284	f (l)= 1,923L ^{1,025}	18 < l < 31	0,21
	h= f (L)	0,694	f (h)= 0,625L+0,528	f (h)= 3,372L ^{0,625}	13 < h< 23	Isométrie
EH	l = f (L)	0,854	f (l)= 0,685L-0,233	f (l)= 1,710L ^{0,685}	22 < l < 37	4,00 Minorante
	h= f (L)	0,922	f (h)= 1,125L-0,626	f (h)= 4,226L ^{1,125}	18 < h< 35	Minorante
Aut	l = f (L)	0,873	f (l)= 1,089L-0,396	f (l)= -0,402L ^{1,089}	17 < l < 33	0,80
PO	h= f (L)	0,442	f (h)= 0,555L-0,283	f (h)= 1,918L ^{0,555}	11 < h< 24	Isométrie
PE	l = f (L)	0,545	f (l)= 0,593L+0,436	f (l)= 2,728L ^{0,593}	22 < l < 34	3,47 Minorante
	h= f (L)	0,799	f (h)= 0,945L-0,332	f (h)= 2,147L ^{0,945}	16 < h< 27	Minorante
BD	l = f (L)	0,640	f (l)= 0,971L-0,249	f (l)= 1,774L ^{0,971}	20 < l < 34	0,20 Minorante
	h= f (L)	0,164	f (h)= 0,265L-0,207	f (h)= 1,610L ^{0,265}	15 < h< 30	Minorante
SB	l = f (L)	0,891	f (l)= 0,834L+0,040	f (l)= 1,096L ^{0,834}	23 < l < 36	2,11
	h= f (L)	0,809	f (h)= 1,182L-0,549	f (h)= 3,539L ^{1,182}	13 < h< 26	Isométrie
EH	l = f (L)	0,819	f (l)= 0,588L+0,423	f (l)= 2,648L ^{0,588}	19 < l < 42	3,80 Minorante

	h= f (L)	0,948	f (h)= 0,538L+0,440	f (h)= 2,754L ^{0,538}	16 < h < 41	Minorante
Hiv	l= f (L)	0,823	f (l)= 0,979L+0,345	f (l)= 2,213L ^{0,979}	21 < l < 35	0,27 Minorante
PO	h= f (L)	0,721	f (h)= 0,551L+0,047	f (h)= 1,114L ^{0,551}	13 < h < 30	Minorante
PE	l= f (L)	0,745	f (l)= 0,899L-0,179	f (l)= 1,510L ^{0,899}	21 < l < 33	0,90
	h= f (L)	0,364	f (h)= 0,279L+0,080	f (h)= 1,202L ^{0,279}	11 < h < 21	Isométrie
BD	l= f (L)	0,711	f (l)= 0,938L-0,358	f (l)= 2,280L ^{0,938}	19 < l < 29	0,54
	h= f (L)	0,514	f (h)= 0,463L+0,086	f (h)= 1,218L ^{0,463}	11 < h < 20	Isométrie
SB	l= f (L)	0,500	f (l)= 0,367L-0,369	f (l)= 2,338L ^{0,367}	20 < l < 35	7,19 Minorante
	h= f (L)	0,850	f(h)= 0,235L+0,095	f (h)= 1,244 L ^{0,235}	10 < h < 29	Minorante
EH	l= f (L)	0,749	f (l)= 0,728L-0,156	f (l)= 1,432L ^{0,728}	25 < l < 35	2,67 Minorante
	h= f (L)	0,726	f (h)= 0,543L-0,429	f (h)= 2,685L ^{0,543}	18 < h < 30	Minorante

Tableau XI : Expressions mathématiques de la relation taille (en mm) – poids (en gr) chez *P. perna* aux cours des saisons.

	r	Relation Taille-poids	Valeurs limites	t obs.
Print	0 , 9 2 6		52 < Lt < 94	3,51
PO		P = 2,535L ^{2,614}	04,75 < Pt < 61,33	Minorante
PE	0 , 8 5 7		51 < Lt < 83	1,84
		P= 2,535L ^{2,239}	17,68 < Pt < 68	Minorante
BJ	0 , 7 4 4		31 < Lt < 53	2,11
		P = 2,535L ^{2,999}	04,75 < Pt < 17,16	Minorante
SB	0 , 8 9 3		18 < Lt < 74	3,00
		P = 2,535L ^{2,08}	02,67<Pt < 32,44	Minorante
EH	0 , 8 8 0		53 < Lt < 99	3,76
		P = 2,535L ^{2,834}	15,31< Pt < 69,29	Minorante
Eté	0 , 9 6 2		31 < Lt < 82	5,03
PO		P = 2,535L ^{2,201}	6,75 < Pt < 58,86	Minorante
PE	0 , 9 0 2		40 < Lt < 73	4,81
		P = 2,535L ^{2,607}	06,68 < Pt < 41,25	Minorante
BJ	0 , 8 6 0		32 < Lt < 52	4,12
		P = 2,535L ^{2,595}	05,67 < Pt < 19,61	Minorante

SB	0,660	$P = 2,535L^{2,125}$	34 < Lt < 41 07,52 < Pt < 18,41	2,21 Minorante
EH	0,876	$P = 2,535L^{2,670}$	52 < Lt < 99 10,11 < Pt < 79,98	4,00 Minorante
Aut	0,844	$P = 2,535L^{2,414}$	33 < Lt < 56 07,04 < Pt < 17,77	3,80 Minorante
PO				
PE	0,872	$P = 2,535L^{2,604}$	43 < Lt < 68 09,44 < Pt < 28,07	3,47 Minorante
BJ	0,792	$P = 2,535L^{2,514}$	42 < Lt < 55 12,67 < Pt < 25,87	2,59 Minorante
SB	0,884	$P = 2,535L^{2,317}$	40 < Lt < 58 07,73 < Pt < 29,15	2,73 Minorante
EH	0,979	$P = 2,535L^{2,414}$	44 < Lt < 120 11,37 < Pt < 104,72	4,47 Minorante
Hiv	0,816	$P = 2,535L^{2,325}$	40 < Lt < 75 11,33 < Pt < 48,09	0,27 Minorante
PO				
PE	0,709	$P = 2,535L^{2,303}$	41 < Lt < 59 08,98 < Pt < 22,24	0,90 Minorante
BJ	0,910	$P = 2,535L^{2,614}$	30 < Lt < 54 04,28 < Pt < 19,07	0,54 Minorante
SB	0,612	$P = 2,535L^{2,614}$	32 < Lt < 70 04,54 < Pt < 36,06	7,19 Minorante
EH	0,889	$P = 2,535L^{2,614}$	53 < Lt < 75 18,83 < Pt < 42,04	2,67 Minorante

2.2 Indice de condition

L'indice de condition (IC) reflète la condition physiologique des organismes vivants. Son évolution chez *Perna perna* montre que les valeurs les plus élevées sont enregistrées en hiver, d'une manière générale, des indices élevés correspondent aux périodes de maturation de la gonade précédant l'émission des gamètes et à la période d'accumulation de réserves.

L'indice de condition reste encore légèrement fort en été pour atteindre des valeurs basses au printemps et en automne (Tableau. IX et Figure.16). La diminution de l'indice de condition entre avril et octobre coïncide avec les périodes d'émission de gamètes (Lasiak, 1986 ; Lasiak et Barnard, 1995; Mc Quaid et Lawrie, 2005) ; ces même auteurs indiquent que les périodes de ponte chez *P. perna* sont très variables d'un mois à un autre et d'une année à une autre.

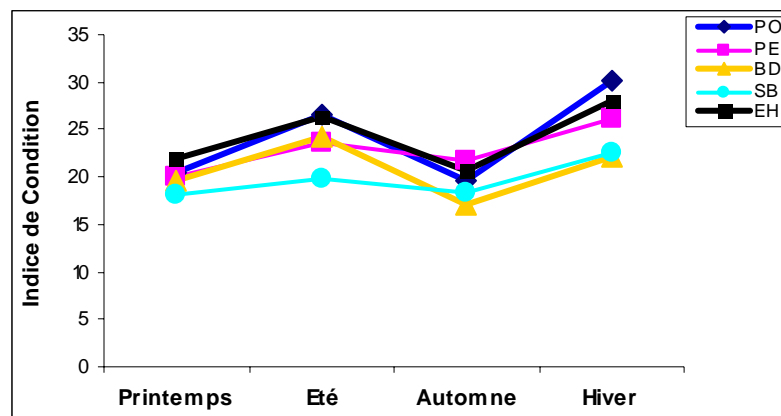


Figure 16: Evolution saisonnière des indices de condition au niveau des sites de l'étude

3. Accumulation des métaux chez *Perna perna*

Sur les sites, les moules sont séparées en prenant soin de ne pas endommager le pied lors du sectionnement du byssus. Elles sont rincées extérieurement à l'eau de mer sur les lieux de prélèvement puis stockées en glacière réfrigérée. Le maximum de précautions a été pris pour éviter la contamination des échantillons sur le lieu de prélèvement, pendant le transport et lors de l'analyse.

Le décoquillage des moules a été réalisé en prenant soin de nous munir de gants en polyéthylène jetables, le jour même de la collecte, avec un scalpel en acier inoxydable propre, en évitant d'endommager le mollusque avec la lame pour limiter la perte de liquide intra valvaire et en éliminant le byssus. La chaire totale de chaque animal pris individuellement est séchée à l'étuve à 60°C pendant 48h jusqu'à poids constant, puis pesée au 1/100^{ème} de gramme.

Les métaux traces, cadmium, cuivre et zinc ont été mesurés au laboratoire R.O.S.E, Université de Nice-Sophia Antipolis. 183 échantillons ont pu être analysés, le détail de l'échantillonnage en fonction des saisons est présenté dans le tableau. X, suivant :

Tableau X : Nombre d'échantillons mesurés pour l'analyse des métaux

Hiver	60
Printemps	50
Eté	25
Automne	48

3.1 Accumulation du cadmium

Les variations des concentrations en cadmium dans les moules *Perna perna* en fonction de la station de prélèvement étudiées statistiquement par ANOVA à un facteur contrôlé le site de prélèvement sont significatives avec un test F de Fisher = 3,15, la probabilité associée étant de 0,036 (n =61). Ceci signifie que les stations sont différentes entre elles. L'évolution de la concentration moyenne en cadmium ($0,66 \pm 0,26$ µg/g poids sec) se fait en fonction de la station de prélèvement selon l'ordre décroissant suivant :

$$\mathbf{BD (1,09) > SB (0,68) > PE (0,66) > PO (0,41) > EH (0,49)}$$

Une plus forte accumulation est observée en général dans les moules provenant de Bedjima (BD) suivi de Seybouse (SB), toutes saisons confondues.

Nous constatons également des différences d'accumulation par saison en fonction de la station de prélèvement étudiées statistiquement par ANOVA à un facteur contrôlé la saison, de plus dans le cas de l'hiver, on a pu séparer les mâles des femelles, la différence de concentration en métal en fonction du sexe n'est pas significative. Nous notons cependant, que les moules de la

station Bedjima (BD) présentent les plus fortes concentrations en cadmium en été ($1,12 \pm 0,22 \mu\text{g/g}$), en hiver ($1,30 \pm 0,55 \mu\text{g/g}$) et à l'automne ($0,80 \pm 0,21 \mu\text{g/g}$) (Figure.17 et Tableau. XI et XIV, en annexe 3). Un minimum de concentration est enregistré au niveau des ports Ouest et Est, respectivement en hiver ($0,36 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$), au printemps ($0,26 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$) et en été ($0,35 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$). Une faible augmentation de cadmium est notée au niveau de la station de référence El Hnaya (EH) au printemps (Tableau. XIII en annexe 3), ($0,60 \pm 0,20 \mu\text{g/g}$) et en hiver ($0,50 \pm 0,24 \mu\text{g/g}$).

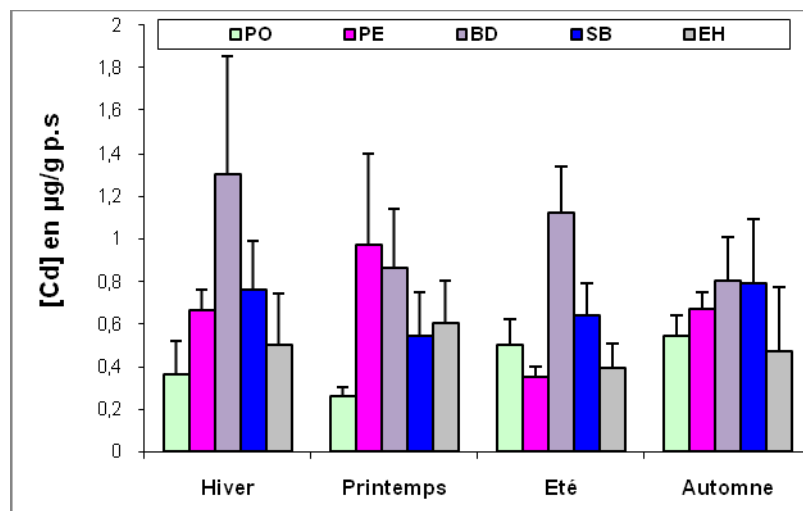


Figure 17 : Variation saisonnière de la concentration en cadmium dans les moules provenant des différents sites de l'étude.

3.2 Accumulation du cuivre

Une nette contamination en cuivre des ports Est (PE) et Ouest (PO) est constatée au printemps, les concentrations en cuivre mesurées sont respectivement de $5,90 \pm 1,18$ et $6,18 \pm 1,55 \mu\text{g/g}$ (Figure. 18 et Tableau. XIII, en annexe 3), de fortes concentrations en cuivre sont également notée en été au niveau de tous les sites de l'étude, avec des valeurs qui varient de $6,69 \pm 0,56$ à $8,15 \pm 1,50 \mu\text{g/g}$ et au printemps au niveau de BD avec des concentrations de $8,60 \pm 0,83 \mu\text{g/g}$ (Tableau. XII et XIII en annexe 3). Des minimums sont enregistrés en hiver et à l'automne à EH et PO.

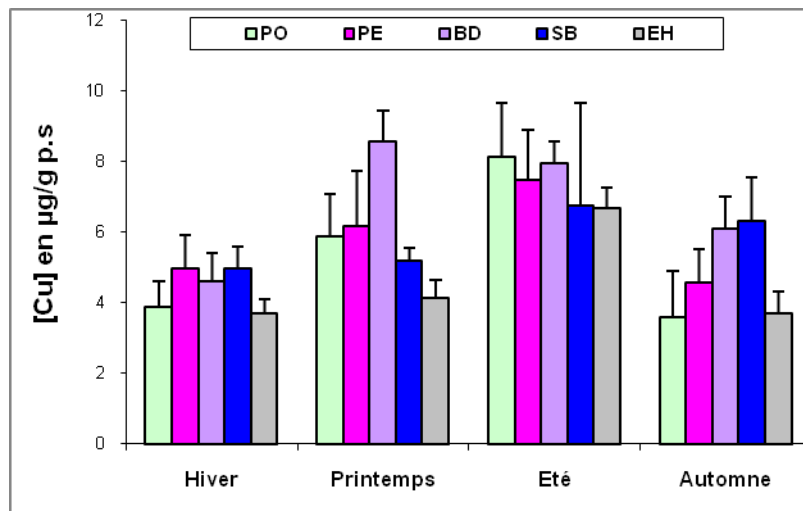


Figure 18 : Variation saisonnière de la concentration en cuivre dans les moules provenant des différents sites de l'étude.

L'évolution de la concentration moyenne en cuivre ($5,67 \pm 0,82 \mu\text{g/g p.s}$) se fait selon l'ordre décroissant suivant:

$$\mathbf{BD (6,82) > SB (5,82) > PE (5,81) > PO (5,38) > EH (4,55)}$$

3.3. Accumulation du zinc

Pour le zinc, l'ANOVA est significative avec un test F de Fisher = 3,08, la probabilité associée étant de 0,040. L'évolution de la concentration moyenne en zinc ($140 \pm 18 \mu\text{g/g}$) se fait en fonction du site de prélèvement selon l'ordre décroissant suivant:

$$\mathbf{EH (167) > BD (147) > PO (133) > PE (127) > SB (124)}$$

Les mesures du zinc présentent des valeurs élevées en hiver au niveau de tous les sites de l'étude qui varient entre un minimum de $155 \pm 53 \mu\text{g/g de p.s}$ au niveau de PO et un maximum de $185 \pm 57 \mu\text{g/g}$ au niveau de EH (Figure. 19), des minimums de concentration de ce métal sont notés en été et au printemps au niveau de SB ($89,66 \pm 24,53 \mu\text{g/g}$; $90,46 \pm 20, \mu\text{g/g}$) (Tableau. XII et XIII, en annexe 3).

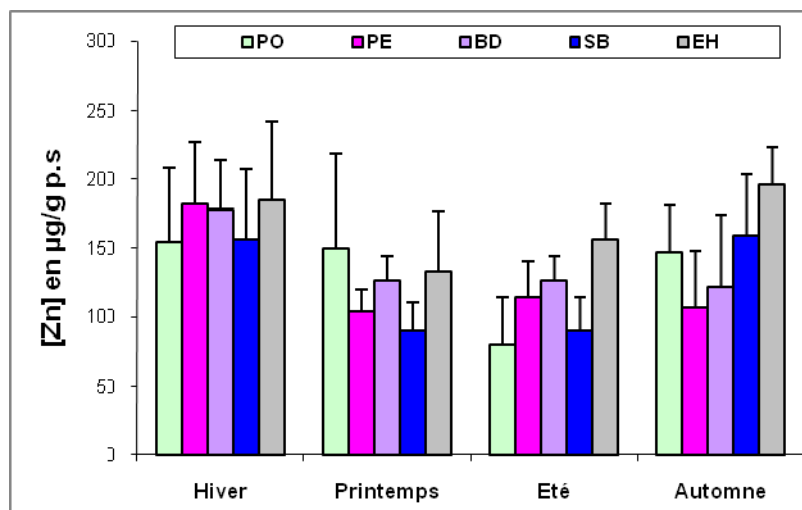


Figure 19 : Variation saisonnière de la concentration en zinc dans les moules provenant des différents sites de l'étude.

L'évolution de la concentration moyenne en zinc ($139,71 \pm 17,9221 \mu\text{g/g}$) se fait selon l'ordre décroissant suivant:

$$\text{EH} (167,66) > \text{BD} (146,8) > \text{PO} (133,23) > \text{PE} (126,85) > \text{SB} (124,03)$$

En règle générale, la situation concernant les concentrations métalliques moyennes au niveau du golfe d'Annaba n'est pas alarmante, même si l'on considère que les teneurs en cadmium et en cuivre sont élevées, ces deux métaux restent à des teneurs modérées par rapport à celles enregistrées dans la région d'Alger par exemple (Tableau. XVII). Dans notre étude, il apparaît que les deux sites Bedjima (BD) et Seybouse (SB) se distinguent des autres sites. Ceci peut être dû à leur situation géographique à proximité de terres agricoles et de zones industrielles, il faut aussi ajouter l'influence d'un faible hydrodynamisme des eaux du golfe (Beldi, 2006). Le site de référence (EH), présente des valeurs assez élevées en zinc par rapport aux autres sites. Des travaux précédents de Belabed (2006) sur la contamination métallique du sédiment du golfe d'Annaba ont révélé que ce dernier, présentait une pollution par le Zn, le Cu et le Pb, avec des indices de contamination supérieur à 3, cet auteur exprimant la contamination métallique par un indice, qui exprimerait un début de contamination pour un indice supérieur à 2.

L'analyse statistique ANOVA révèle un effet **saison** hautement significatif $P < 0,0001$, pour les trois métaux que sont le Cd, le Cu et le Zn, (voir le détail de l'analyse en annexe 8).

Tableau XVII : Comparaison des concentrations métalliques (moyenne ou domaine de variation) de *Perna perna* provenant de différentes régions du globe.

Espèce <i>Perna perna</i>	Cdµg/g p.s	Cuµg/g p.s	Znµg/gp.s	Références bibliographiques
Golfe d'Annaba	0,64	5,34	171	Présente étude
Golfe d'Annaba	0,51	3,67	130	Belabed, 2006
Amirouche(baie d'Alger) Chenoua (baie d'Alger) Sondja (baie d'Alger)	0,54 0,88 1,26	10,9 13,1 10,9	243 133 174	Asso, 1985 MED III
Littoral marocain	0,36 – 1,52	3,59 -6,59	130	Najimi, 1997
Littoral mauritanien	0,15 -11,14	1,50 - 8,8	62	Sidoumou, 1999

4. Biomarqueurs chez *Perna perna*

Nous avons mesuré les teneurs en glutathion (réduit : GSH) et les activités glutathion transférases (GST). Le choix de ces paramètres antioxydants découlait de notre hypothèse de recherche qui était que tant que ces systèmes de défense sont opérationnels, aucune toxicité n'apparaît ; par contre s'ils sont débordés par une charge polluante importante ou qu'ils deviennent inefficaces, des effets toxiques pourront se manifester au niveau individuel (Pellerin-Massicotte, 1994).

Les biomarqueurs ont été mesurés d'une part au niveau de la branchie, structure comparable à un tamis, qui constitue la plus grande partie de la surface de contact des bivalves avec le milieu extérieur, c'est ainsi, le lieu principal d'échange d'eau et d'ions entre l'hémolymphe et l'environnement (Randall *et al.* 2000), et d'autre part au niveau de la glande digestive, organe accumulateur de métaux, c'est aussi un organe majeur dans la détoxification de ces derniers (Marigomez *et al.* 2002; Moore et Allen, 2002). Les variations en fonction de la saison et du site de prélèvement des biomarqueurs retenus dans cette étude sont différentes d'un biomarqueur à

l'autre. Les résultats montrent en général, une induction des activités glutathion transférase et une diminution des teneurs en glutathion qui diffèrent d'un organe à un autre.

Ainsi, les teneurs les plus élevées sont enregistrées pendant l'hiver (décembre) et l'été (août) respectivement dans la station SB et BD (lieux de toutes sortes de rejet) et au niveau du port coté Est (PE) à l'automne, par rapport à la station de référence EH. Nous avons remarqué que le jour du prélèvement estival, il y avait une importante marre d'hydrocarbure au niveau de (SB).

4.1 Glutathion Transférase

Les résultats permettent de mettre en évidence des variations saisonnières marquées dans le sens d'une augmentation des activités GST-CDNB (ANOVA significative à un seuil de risque inférieur à $p < 0,0001$) d'avril à décembre 2006, plus fortes dans les branchies de *Perna perna* que dans la glande digestive. Les valeurs des activités GST sont comprises sur l'ensemble des sites durant toutes les saisons entre un minimum de $104,82 \pm 4,9$ nmole/min/mg (site BD à l'automne) et un maximum de $207,5 \pm 18,4$ nmole/min/mg (site SB en hiver) au niveau branchial ; alors que nous avons relevé des activités dans les glandes digestives comprises entre un minimum de $100,72 \pm 14,9$ nmole/min/mg (site PO à l'automne) et un maximum de $181,0 \pm 19,2$ nmole/min/mg au niveau du site SB en hiver. (Figure. 20 et Tableau. XV, en annexe 4).

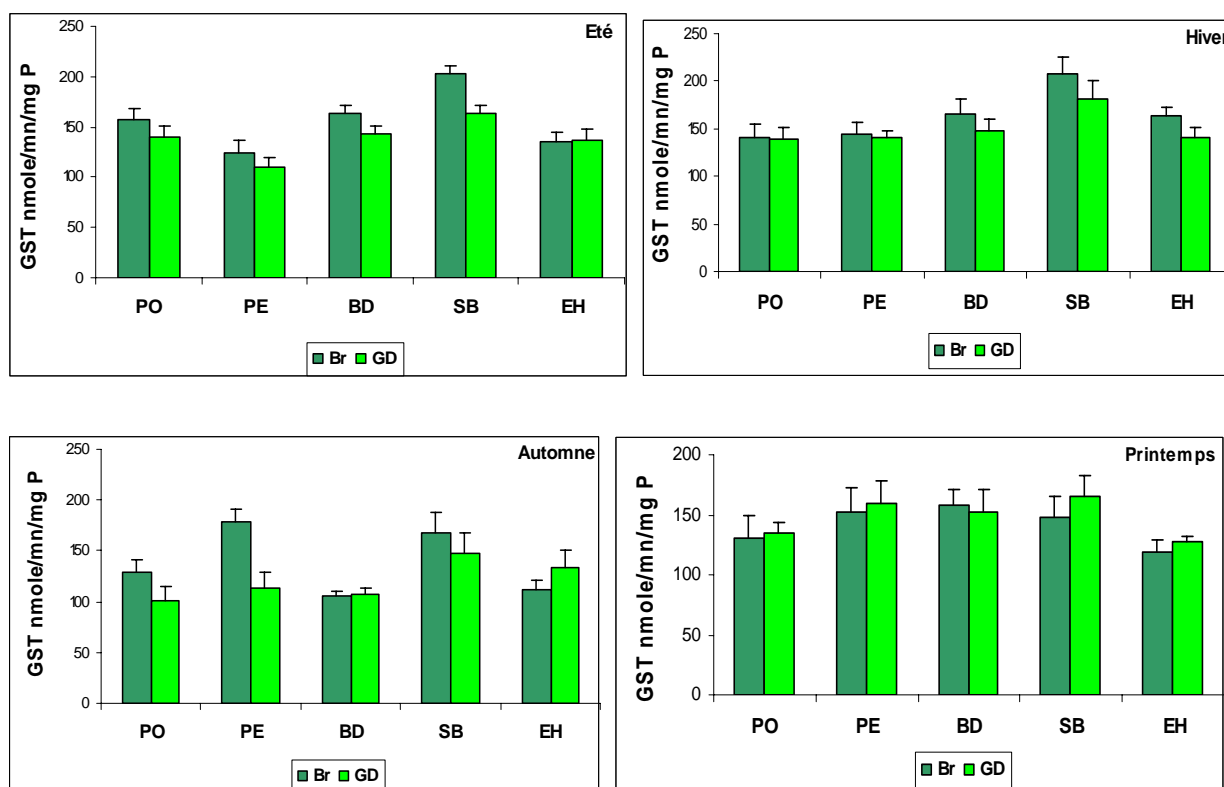


Figure 20 : Activités de la GST en nmole/min/mg de protéines dans les branchies (Br) et les glandes digestives (GD) de *Perna perna* prélevée aux différentes saisons des cinq sites de l'étude. ***différence significative ($p < 0,0001$) entre sites et saisons; **différences très significatives ($p < 0,001$) entre organes ($n=8$).

4.2 Glutathion Réduit

L'effet des saisons est également mis en évidence dans les variations des concentrations en glutathion (GSH), et ce pour les deux tissus étudiés. En effet, si au printemps, les taux de GSH sont les plus élevés dans la branchie, ce sont les glandes digestives qui présentent les niveaux les plus forts à l'automne (voir figure 21 et Tableau XVI en annexe 4). Cependant, les défenses de *P. perna* suivent une diminution significative ($p < 0,0001$) du glutathion réduit en hiver dans les deux organes. Des variations plus modestes des concentrations en GSH ont été observées, au printemps au niveau de tous les sites ces dernières n'étant pas significatives. Aucune variabilité saisonnière des taux de GSH réduit n'a été remarquée chez les organismes prélevés en automne. D'autre part, les variations des teneurs du GSH en été sont significative aussi bien dans la branchie ($P < 0,002$), que dans la glande digestive ($P < 0,021$), (détail en annexe 5).

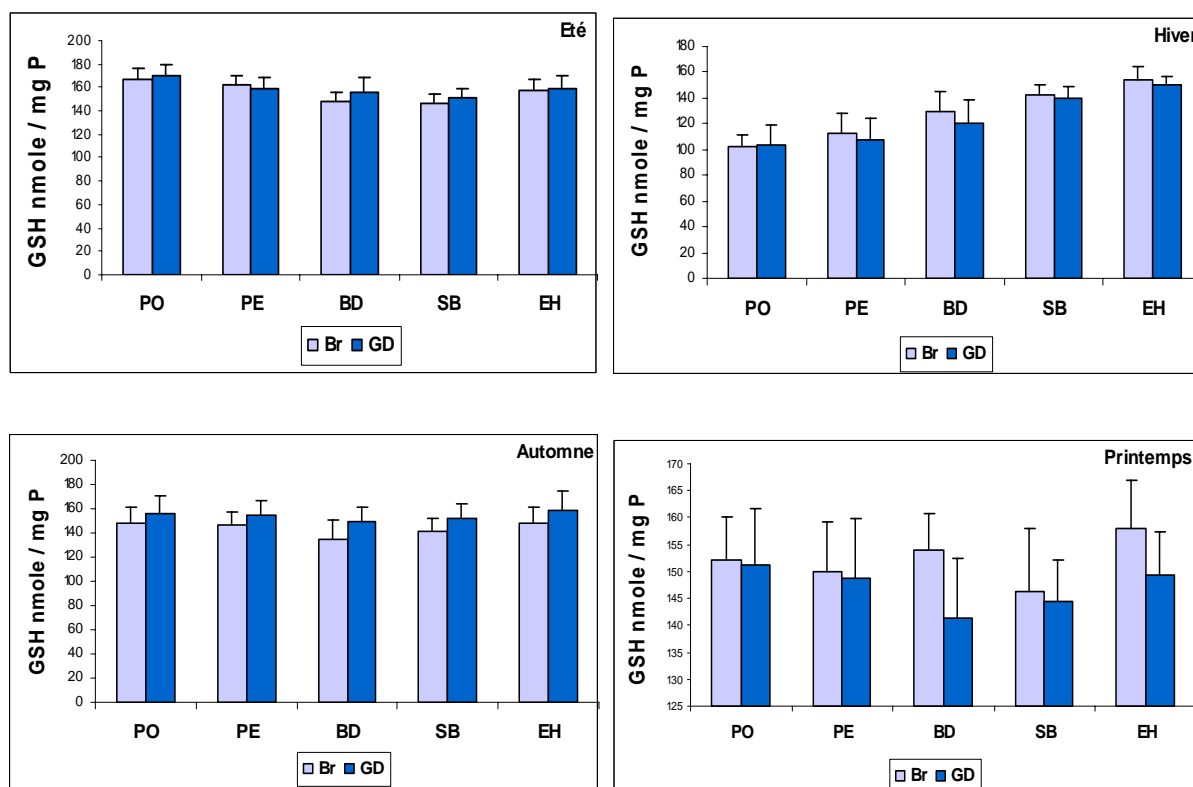


Figure 21 : Taux de glutathion en nmole/mg de protéines dans les branchies (Br) et les glandes digestives (GD) de *Perna perna* prélevée aux différentes saisons de cinq sites de l'étude. ***différence significative ($p < 0,0001$) entre sites et saisons ($n=8$).

En résumé, l'analyse de la variance à un facteur contrôlé (site) et à deux facteurs contrôlés (organe et saison) du système de défense de *Perna perna* pour l'ensemble des sites révèle un effet site et saison hautement significatif ($p < 0,0001$) et un effet organe très significatif ($p < 0,006$), le détail est donné en annexe 5.

4.3 Mesure du biomarqueur du stress général : survie à l'air

Pour chacun des sites nous avons pris 20 animaux que nous avons soumis à l'anoxie par exposition à l'air à température constante ($16 \pm 1^\circ \text{C}$). La survie est contrôlée quotidiennement. Les symptômes de mort sont l'ouverture des valves et l'absence d'activité musculaire.

Le « stress on stress » s'exprime par le pourcentage moyen d'animaux morts ou le temps moyen pour lequel 50% des animaux sont morts (TL50 : temps léthal 50). L'expérience a duré 10 jours. La Figure 22 illustre les variations des TL50 des moules collectées au niveau des stations (PO, PE, BD, SB et EH) en automnale 2006.

Les résultats obtenus indiquent que la réduction du temps de survie chez les mollusques testés est fonction du degré de pollution et de la physiologie de ces derniers. En effet, le TL50 est réduit chez les moules prélevées des sites qui reçoivent les rejets urbains et industriels (TL50 de PO= 2,95 jours, PE = 3,46 jours, BD = 4 jours et SB = 3,38 jours) alors que le site dit de référence enregistre un TL50= 5,75 jours. Cependant, il est à remarquer que c'est PO qui enregistre un TL50 le plus faible, étant donné qu'en cette période de l'année, l'automne, les rejets sont à leur maximum. Cette différences de sensibilité plus ou moins rapprochée entre sites pourrait être due soit aux conditions environnementales relativement similaires entre sites, soit à une faible sensibilité des moules à la variation des paramètres abiotiques de chaque milieu. Il est clair que l'état général de l'animal, étudié par la résistance à l'anoxie varie avec la contamination du site.

La réponse au stress on stress s'avère être une méthode originale qui peut être utilisée comme outil d'évaluation globale des contaminations côtières.

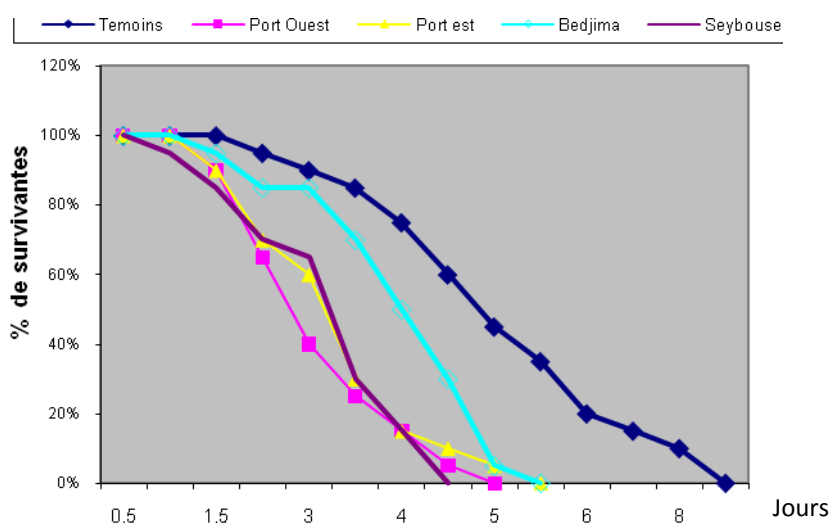


Figure 22 : Comparaison des TL 50 des moules collectées au niveau de tous les sites de l'étude

CHAPITRE IV : EXPERIENCES DE LABORATOIRE

Les expériences *in vivo* permettent d'obtenir des effets précis en conditions contrôlées. Nous avons donc contaminé en laboratoire les moules *Perna perna* par le cadmium ou le cuivre. Dans ce travail, les concentrations en polluants choisies et ajoutées au milieu sont bien supérieures à celle du milieu naturel, ce qui nous permet d'avoir des effets plus marquants (Chappie et Burton, 1997; Sasson-Brickson et Burton, 1991 ; Pereira *et al.* 2000).

Deux expériences *in vivo* ont été réalisées à deux saisons différentes, l'une en hiver, janvier 2006 et l'autre en été, août 2006. D'après Vaal *et al.* (1997a), la variabilité de réponse biologique est liée aux conditions expérimentales, nous avons donc choisi d'utiliser des conditions expérimentales similaires pour les deux saisons.

1. Influence des métaux sur la réponse biomarqueur

L'analyse des biomarqueurs a permis de montrer que les réponses étaient différentes en fonction des conditions. La majeure partie des expériences menées en condition de laboratoire sont effectuées le plus généralement en utilisant un seul polluant (Fournier *et al.* 2001; Boutet *et al.* 2002). Or, dans l'environnement, les animaux sont confrontés à des mélanges complexes de polluants (Moore, 2002). Les expériences réalisées dans le cadre de ce travail ne se rapprochent pas des conditions rencontrées par les moules dans le milieu, mais peuvent donner des indications sur la contamination par les métaux et leur accumulation dans les tissus. Des perspectives dans cet axe de travail peuvent être envisagées.

1.1. Effet du cadmium sur les taux du GSH et l'activité de GST (expérience été)

Les teneurs en glutathion réduit (Figure.23) décroissent significativement ($p < 0,0001$) en fonction de la concentration en cadmium, avec des valeurs de $93,66 \pm 16,5$ nmoles /mg protéines à $200 \mu\text{g Cd/L}$ par rapport à $250,74 \pm 7,8$ nmoles/mg protéines chez les témoins.

Les résultats de l'activité de la GST, mesurée au niveau des branchies de *P. perna* (Figure. 24), montrent une augmentation très significative (détails en annexe 6) suivant la concentration en

cadmium du milieu, les niveaux sont de $190,97 \pm 12,12$ (à $50 \mu\text{g Cd/l}$), $217,67 \pm 45,7$ (à $100 \mu\text{g Cd/l}$) et $232,19 \pm 21,19$ (à $200 \mu\text{g Cd/l}$) nmoles/min/mg protéines par rapport aux témoins qui présentent des valeurs de $182,22 \pm 27,39$ nmoles/min/mg protéines.

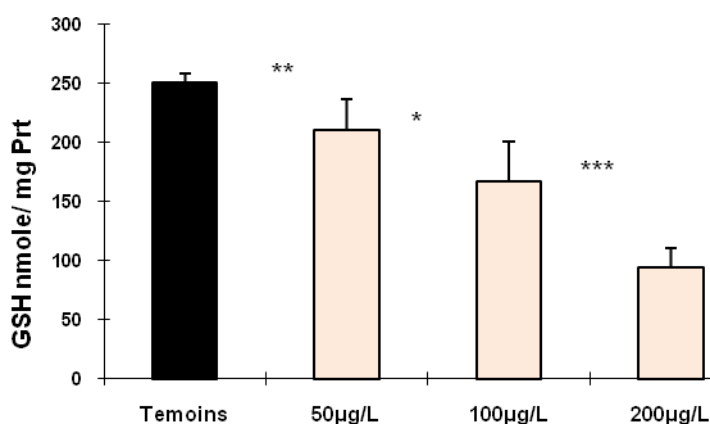


Figure 23 : Effet de l'exposition au cadmium sur la variation du taux de GSH (nmoles/mg protéines) dans les branchies des moules exposées 7jours. * $P = 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$. $n = 5$

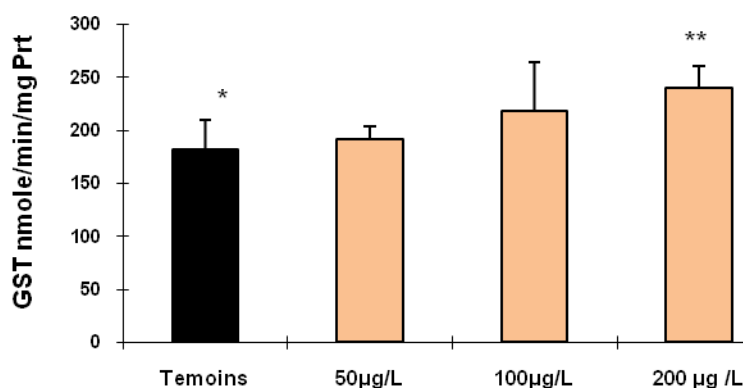


Figure 24 : Effet de l'exposition au cadmium sur l'activité de la GST (nmoles/min/mg protéines) dans les branchies des moules exposées 7jours. * $P = 0.05$; ** $P < 0.01$. $n = 5$.

1.2. Effet du cuivre sur les taux du GSH et l'activité de GST (expérience été).

Chez les animaux exposés aux différentes concentrations de cuivre les réponses des biomarqueurs révèlent un profil de décroissance semblable mais plus marqué que celui observé après l'exposition au cadmium. En effet, les teneurs en GSH indiquent une décroissance significative ($P < 0,0001$) aux différentes concentrations de cuivre, particulièrement à la plus forte teneur en cuivre (25 $\mu\text{g Cu/l}$) marquant une baisse très significative chez les animaux exposés ($71,92 \pm 4,11$ nmoles/mg protéines) en comparaison des témoins ($200,14 \pm 32,5$ nmoles/mg protéines, en Figure. 25).

Aucune variation significative des activités GST n'est observée avec les deux premières concentrations de cuivre (10 $\mu\text{g/l}$ et 15 $\mu\text{g/l}$) par rapport aux témoins (détail en annexe 6), cependant, on note une diminution très significative de la GST à la plus forte concentration du metal administrée dans le milieu (Figure. 26).

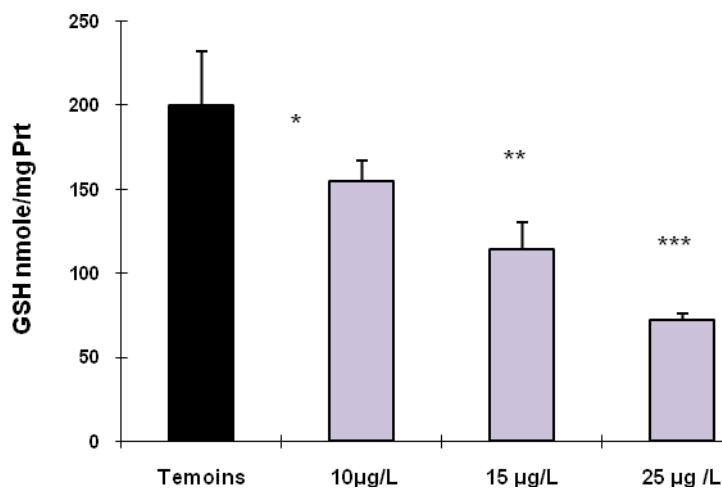


Figure 25 : Effet de l'exposition au cuivre sur la variation du taux de GSH (nmole/mg protéines) dans les branchies des moules exposées pendant 7 jours. * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$. $n = 5$ dans chaque cas.

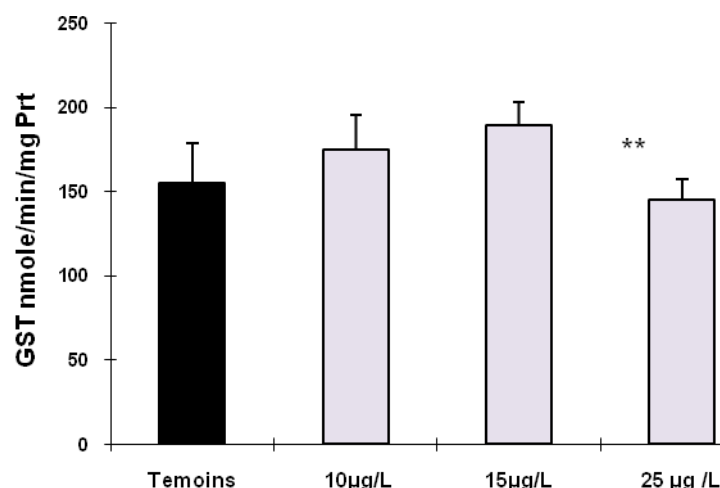


Figure 26 : Effet de l'exposition au cuivre sur l'activité de la GST (nmoles/min/mg protéines) dans les branchies des moules exposées pendant 7jours. ****P <0.001.** n = 5 dans chaque cas.

1.3. Effet du cadmium sur les taux du GSH et l'activité GST (expérience hiver)

L'exposition des moules à des doses croissantes de cadmium, lors de l'expérience réalisée en hiver, induit des modifications de la teneur en GSH, mesurées dans les branchies. Nous notons, en effet que les teneurs en GSH sont diminuées quand la concentration en cadmium du milieu augmente ($34,46 \pm 2,8$ nmoles /mg protéines. à $200 \mu\text{g Cd/l}$ par rapport au témoin $81,62 \pm 6,4$ nmoles/mg protéines, en Figure.27 et cet effet dose-réponse est caractérisé par une relation linéaire négative avec une excellente corrélation ($r^2 = 0,9659$; Figure. 28).

Par ailleurs, l'activité de la GST (en Figure. 28, statistique en annexe 7) augmente avec l'augmentation de la dose de cadmium dans le milieu (149.01 ± 4.6 nmoles/min/mg protéines) à $200\mu\text{g Cd/l}$ par rapport au témoin qui présente une activité GST de (91.87 ± 6.66 nmoles/min/mg protéines); L'analyse statistique fait apparaître l'existence de différences significatives à très significatives de l'activité GST mesurée dans les branchies de moules exposées à 50, 100 et 200 $\mu\text{g Cd/l}$ respectivement avec une excellente corrélation ($r^2 = 0,9974$, Figure 29).

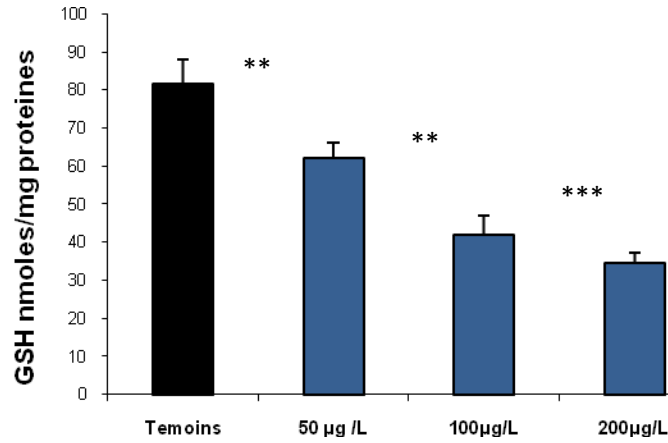


Figure 27 : Effet de l'exposition au cadmium sur la variation du taux de GSH (nmoles/mg protéines) dans les branchies des moules exposées pendant 7jours. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. n = 5.

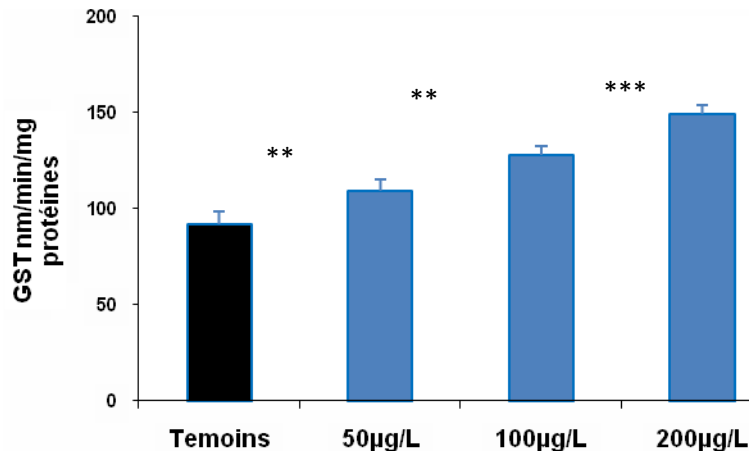


Figure 28 : Effet de l'exposition au cadmium sur l'activité de la GST (nmoles/min/mg protéines) dans les branchies des moules exposées pendant 7jours. ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

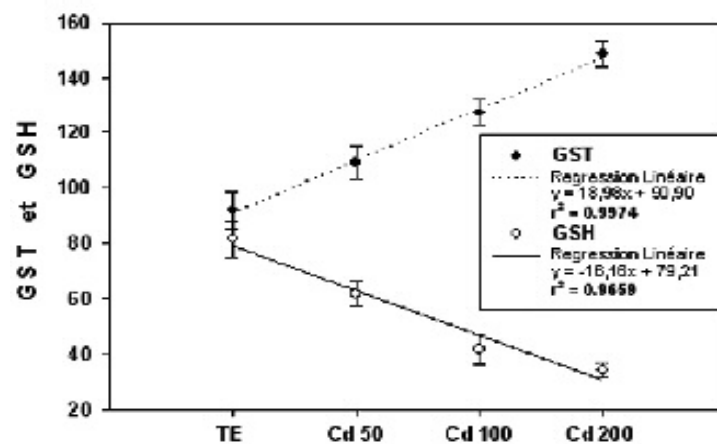


Figure 29 : Différentes droites de régression reliant les biomarqueurs et les concentrations de cadmium testées dans l'expérience

2. Bioaccumulation des métaux

2.1 Accumulation du cadmium (expérience d'été)

Les concentrations dans la chaire molle totale de *Perna perna*, après une semaine d'exposition, sont représentées dans le Tableau XVIII. Les résultats montrent une accumulation significative en fonction des concentrations ajoutées au milieu, et ce jusqu'à 100 µg Cd/l ($25,51 \pm 13,24$ µg/g) par rapport au témoin ($0,72 \pm 0,28$ µg/g). Ces résultats coïncident avec la diminution significative du GSH et l'induction de la GST (Figure. 30, statistique en annexe 8). Les animaux intoxiqués par le cadmium en été, présentent une accumulation très faible du cuivre, contrairement au zinc dont la concentration augmente à la première dose de Cd testée (50 µg Cd/l) pour diminuer ensuite.

Tableau XVIII : Concentration en métaux *in toto* (exprimées en poids sec) chez *Perna perna* après 7 jours d'exposition en été au Cd.

Condition	n	Cd (µg/g p.s)	Cu (µg/g p.s)	Zn (µg/g p.s)
Témoin	5	$0,72 \pm 0,28$	$4,07 \pm 0,42$	$140,08 \pm 57,0$
(+) 50µg Cd/L	5	$8,89 \pm 3,26$	$4,63 \pm 1,53$	$228,39 \pm 56,3$
(+) 100µg Cd/L	5	$25,5 \pm 13,24$	$3,96 \pm 0,28$	$192,58 \pm 107$
(+) 2000µg Cd/L	5	$5,87 \pm 1,00$	$4,53 \pm 2,48$	$65,59 \pm 13,87$

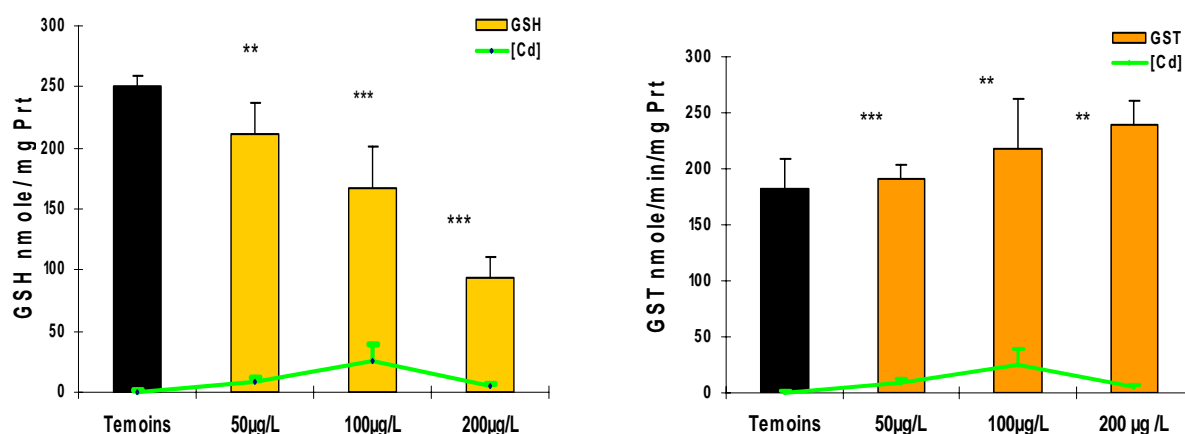


Figure 30 : Bioaccumulation du cadmium en été et sa relation avec les teneurs en GSH et les activités GST

2.2. Accumulation du cuivre en été

L'expérience de contamination par le cuivre par contre, révèle une très faible accumulation qui tend à augmenter à partir de 15µg Cu /l ($3,79 \pm 2,09$ µg/g), pour atteindre des concentrations de $4,44 \pm 1,20$ µg/g à la plus forte concentration de 25µg Cu/l, et qui correspond au même pourcentage (37%) de GSH à 200µg Cd /l en figure 34. Les résultats sont donnés dans le Tableau. XIX et dans la figure 31.

Tableau XIX : Résultats de l'accumulation du cuivre *in toto* (exprimées en poids sec) chez *Perna perna* après 7 jours d'exposition en été au Cu.

Condition	n	Cu (µg/g p.s)
Témoin	5	$2,08 \pm 0,67$
(+) 10µg Cu/L	5	$2,03 \pm 0,75$
(+) 15µg Cu/L	5	$3,79 \pm 2,09$
(+) 25µg Cu/L	5	$4,44 \pm 1,20$

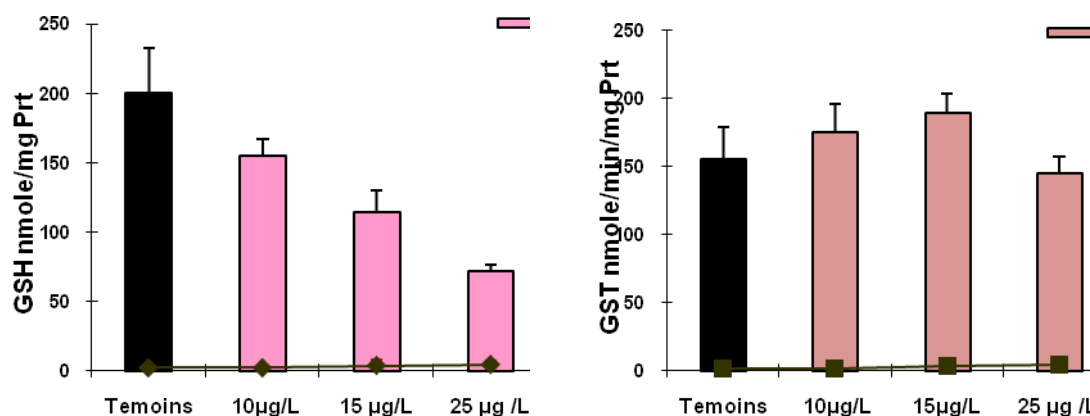


Figure 31 : Bioaccumulation du cuivre en été et sa relation avec les teneurs en GSH et les activités GST

2.3 Accumulation du cadmium en hiver

Ainsi, le cadmium, mesuré dans la chair totale des bivalves (Tableau. XX), est significativement accumulé (ANOVA significative $p < 0.0001$) par rapport aux témoins ($0.62 \mu\text{g Cd/g}$ de poids sec) en fonction de la concentration ajoutée au milieu jusqu'à $200 \mu\text{g Cd/l}$ ($81.3 \mu\text{g Cd/g}$).

Tableau XX: Concentration en métaux *in toto* (exprimées en poids sec) chez *Perna perna* après 7 jours d'exposition au Cd pendant l'hiver

Condition	Cadmium $\mu\text{g/g}$	Cuivre $\mu\text{g/g}$	Zinc $\mu\text{g/g}$
Témoins	$0,62 \pm 0,06$ a	$5,06 \pm 0,95$ a	228 ± 54 a
50 $\mu\text{g/L}$	$13,6 \pm 3,96$ b	$4,13 \pm 0,35$ b	277 ± 69 ab
100 $\mu\text{g/L}$	$36,1 \pm 6,29$ c	$3,73 \pm 0,55$ b	330 ± 24 b
200 $\mu\text{g/L}$	$81,3 \pm 10,71$ d	$3,26 \pm 0,38$ b	324 ± 46 b

(Les lettres différentes montrent les différences significatives à $p < 0.05$ entre les différentes conditions pour un même métal).

L'accumulation de ce métal croît linéairement pendant les 7 jours d'expérience (Figure.33) suivant une relation : $[\text{Cd dans } Perna perna] = 0.4116 [\text{Cd milieu}] - 2.882$ ($r^2 = 0.9564$; $n = 20$).

Les concentrations de cuivre analysées chez les animaux contaminés par le cadmium varient significativement (ANOVA significative à $p < 0.0025$), les animaux contaminés par le cadmium ont des concentrations en cuivre significativement inférieures à celles des témoins. En revanche, les concentrations en zinc augmentent significativement (ANOVA à $p < 0.0191$) à partir de 100 $\mu\text{g Cd/L}$. Ces observations indiquent bien qu'il y a eu accumulation du cadmium par les moules avec des différences hautement significatives en fonction de la quantité administrée.

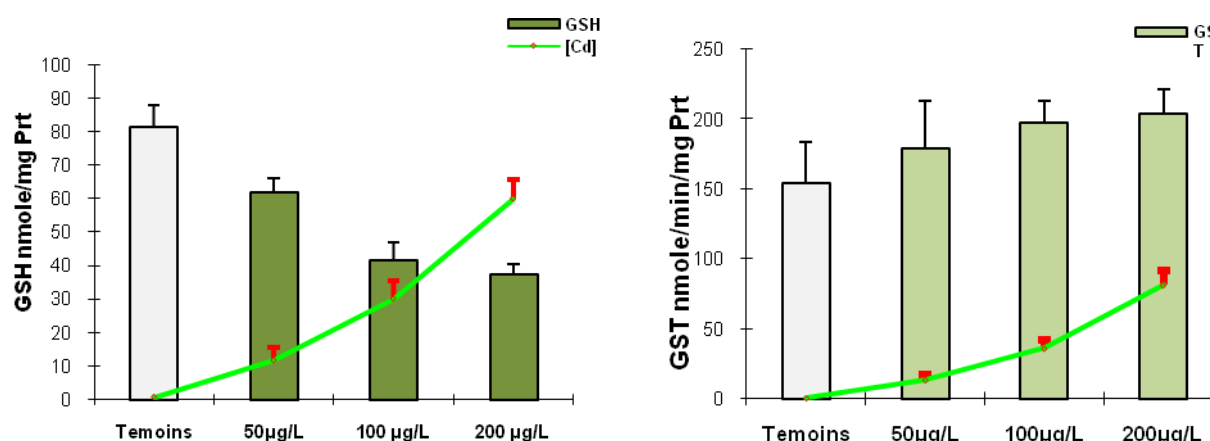


Figure 32 : Bioaccumulation du cadmium en hiver et sa relation avec les teneurs en GSH et les activités GST

Dans le cas précis de l'accumulation du cadmium lors de l'expérience de l'hiver, les résultats révèlent une accumulation du métal qui coïncide parfaitement avec l'augmentation des activités GST et la diminution des teneurs en GSH, selon une relation dose réponse qui influence les systèmes de défense de l'animal (Figure. 32).

En comparant l'expérience de l'été avec celle réalisée en hiver, les résultats indiquent que l'accumulation des métaux est plus forte en hiver qu'en été.

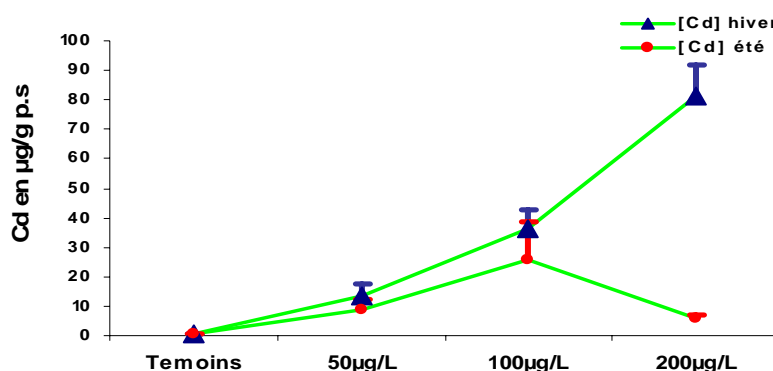


Figure 33 : Accumulation du Cadmium en été et en hiver

DISCUSSION

DISCUSSION

La démarche, mise en œuvre dans le cadre du programme national de biosurveillance de la qualité des eaux du golfe d'Annaba, a été de coupler l'analyse des biomarqueurs à celle du suivi de la contamination côtière par les métaux, au moyen du bivalve du genre *Perna perna* consommé par la population locale, afin d'évaluer la qualité des milieux naturels de notre golfe, soumis à des activités anthropiques. Dans ce dernier chapitre nous nous proposons de procéder à une discussion générale des principaux résultats obtenus dans notre travail, dont une partie a trait aux travaux *in situ* et une deuxième partie à des expériences de laboratoire.

Paramètres biométriques

L'analyse des variations des relations entre les paramètres de croissance et les paramètres environnementaux permet l'estimation des variations liées à la situation géographique. Nous constatons par exemple que le poids humide moyen des bivalves récoltés sur le site El Hnaya est beaucoup plus important par rapport à celui des autres sites. Cependant cette différence est moins marquée au niveau des oueds Seybouse et Bedjima, surtout en hiver et en été. La combinaison de plusieurs facteurs tels que la température et la disponibilité en nourriture causeraient des différences spatio-temporelles importantes selon les sites. En effet, les changements saisonniers du poids de chair résultent du stockage et de l'utilisation des réserves liées à la disponibilité nutritive, qui est remarquable par exemple au printemps avec des valeurs élevées, pratiquement au niveau de tous les sites de l'étude (Casas et Bacher, 2006).

En général, la croissance est caractérisée par une augmentation de la taille et du poids en fonction du temps et des variables environnementales. Cependant, chez les mollusques bivalves, et en particulier chez les moules, les processus liés à la reproduction perturbent ce schéma par une accumulation temporaire de réserves importantes qui sont ensuite converties en gamètes puis expulsées lors de la ponte, occasionnant une perte brutale de poids (Lubet *et al.* 1981).

Ces différentes étapes du cycle biologique de la moule sont observables sur les deux sites : Bedjima (BD) et le Port Ouest (PO). Cette période est suivie d'un fort ralentissement du poids en automne sur le site PO alors qu'au niveau de l'oued BD une forte reprise est observée. Ainsi, à certaines périodes, les cycles reproductifs dominent les saisonnalités. Dans la littérature, le cycle de reproduction des moules est interprété différemment par les auteurs. Pour Lubet *et al.* (1986)

le facteur essentiel serait la nutrition qui permet un bon équilibre entre les réserves qui conditionnent les variations du poids et les besoins énergétiques du cycle sexuel.

Dans notre étude, on assiste à des fluctuations du poids moyen des moules au printemps et à l'automne. Certains auteurs, Idhalla *et al.* (1997) ; Dridi *et al.* (2006) traduisent ces changements par des périodes de restructuration de la gonade suivies de ponte, ces résultats coïncident avec la diminution de l'indice de condition qui devrait être élevé en cette saison (printemps), ces différences peuvent être expliquées par un détournement du métabolisme au profit des événements sexuels (Bouhaima, 2000).

Certains auteurs (Abda-Boudjema *et al.* 1984 ; Lasiak, 1986; Lasiak et Barnard, 1995; Mc Quaid et M. Lawrie, 2005) indiquent que les périodes de pontes chez *P. perna* sont très variables d'un mois à un autre, d'une année à une autre et en fonction de la situation géographique de l'espèce, et qu'il est difficile dans certains des cas de définir avec exactitude ces périodes.

Il peut arriver que *Perna perna* présente trois périodes de ponte, dont l'une en automne, qui coïnciderait avec la chute de la température des eaux, une seconde printanière en rapport avec l'augmentation de la température de l'eau de mer et enfin une ponte facultative en été (Lubet et Bourcart, 1963 ; Shafee, 1978 ; Benbrahim, 1982 ; Djediat et Boukroufa, 1990), respectivement pour *M. galloprovincialis*, *P. viridis* (= *P. perna*), *P. picta* (= *P. perna*) et *P. perna*. Ceci pourrait avoir des répercussions sur la vitesse des différentes prises de poids.

Croissance relative et pondérale

Les données, obtenues à partir des mesures de la taille de la coquille, ont été employées pour déterminer des rapports morphométriques des axes de croissance en longueur, en largeur et en épaisseur. Ces mesures ont subi une transformation logarithmique. Pour les rapports allométriques, nous avons utilisé les tests de régression linéaire pour l'obtention d'équations descriptives de type $Y = a L^b$ et la qualité de l'ajustement a été évaluée par le coefficient de corrélation (r).

Des relations allométriques significatives ont été mises en évidence pour tous les paramètres linéaires mesurés sur l'ensemble des sites de l'étude, témoignant d'une corrélation significative entre la longueur et la largeur, ainsi que la longueur et l'épaisseur de la coquille.

Les valeurs de b , calculées pour *P. perna* du golfe d'Annaba, montrent qu'il s'agit d'une croissance plus rapide en longueur qu'en largeur et/ou en épaisseur. Le même type de croissance a été remarqué par de nombreux auteurs comme Burgeot et Galgani, (1998), Grangnery, (2001) qui ont étudié la croissance de moules et d'huîtres en élevage. Ils montrent que la croissance en longueur serait en relation avec les variations des facteurs abiotiques tels que la température, l'habitat pélagique et benthique et des facteurs biotiques tels que l'âge, le sexe ou encore le stade de maturité des gonades. Ce qui explique la forme allongée de la coquille selon l'axe antéropostérieur. Les différents caractères métriques, mesurés chez la moule *Perna perna*, présentent des variations saisonnières.

Quelle que soit la période de l'année considérée, les relations allométriques reliant la masse pondérale du bivalve à la longueur de la coquille se sont révélées significatives.

Les relations qui relient la variable pondérale du bivalve à la longueur de la coquille (considérée comme taille de référence) indiquent, qu'au cours de la phase d'activité sexuelle, les variations interindividuelles sont importantes. Elles sont probablement générées par des changements d'ordre physiologique en rapport avec la gamétogenèse et l'émission des gamètes (Dridi et *al.* 2008). Roméo et *al.* (1993) explique chez le mollusque les valeurs de b par les fluctuations mensuelles de l'état physiologique de l'animal. Cette situation fait apparaître une corrélation significative ($r = 0,81$) entre les deux variables étudiées. Par ailleurs, le coefficient d'allométrie b montre une valeur inférieure à 3 pour tous les modèles liant la longueur au poids. Il s'agit donc d'une allométrie minorante dans sa tendance générale. Nous supposons que la vitesse de croissance en longueur est plus rapide que la vitesse de la croissance pondérale.

Plusieurs facteurs influencent la vitesse de croissance linéaire et pondérale chez les bivalves tel que l'état physique et nutritionnel du milieu (Askew, 1972; Utting, 1986) en plus des paramètres physiologiques (Bayne et *al.* 1999) et génétiques des bivalves (Newkirk, 1980; Hedgecock et *al.* 1996). Urrutia et *al.* (1999) ont montré qu'en présence d'un milieu trophique riche, le surplus d'énergie peut être partagé à la fois entre la croissance somatique des tissus et le développement gonadique du bivalve. Lubet (1991) a précisé que la croissance pondérale est influencée, entre autres facteurs, par la température qui a une action directe sur la cinétique de la gamétogenèse dont la résultante est la compétition entre les compartiments somatiques et germinaux induisant ainsi une croissance pondérale importante. Cet auteur a aussi montré que la température agit sur

la croissance indirectement en agissant sur la productivité primaire du milieu et la disponibilité de la nourriture et, par conséquent, sur la nutrition du bivalve. Selon Tocher et Harvie (1988); Whyte et *al.* (1990), la croissance pondérale résulte de l'accumulation des lipides en quantité absolue dans les tissus des bivalves, engendrée par le processus de gamétogenèse, essentiellement chez les femelles.

Indice de condition

Chez les bivalves côtiers, l'indice de condition est essentiellement lié à la maturation sexuelle. Les variations saisonnières moyennes de l'indice de condition chez *Perna perna* apparaissent élevées en hiver, et moyennement élevées au printemps. Selon Roméo et *al.* (2001) les variations de cet indice seraient associées à la température de l'eau. Une autre hypothèse d'après Ansell et Lagardère (1980), serait que l'indice de condition peut présenter des variations liées à la présence d'eau plus ou moins importante dans la coquille, pouvant modifier le poids humide de la chair et par conséquent celui de l'indice. La diminution de l'indice entre avril et octobre coïncide avec les périodes d'émission de gamètes (Lasiak, 1986 ; Lasiak et Barnard, 1995; Mc Quaid et M. Lawrie, 2005). Ces mêmes auteurs indiquent que les périodes de pontes chez *P. perna* sont très variables. D'autres auteurs comme Dorange et *al.* (1989), Paulet et *al.* (1992), Barillé, (1996) expliquent la baisse de cet indice soit par les conditions trophiques soit par un amaigrissement suite à une ponte.

Etude du Stress on stress

En pratique, il a été démontré qu'un organisme, évoluant dans des eaux polluées, est sujet à un syndrome de stress qu'il est possible d'identifier par une méthode permettant une évaluation globale de la santé des organismes, sans indiquer le type de contaminant présent dans le milieu marin. Cet indicateur biologique non spécifique est nommé : Stress on Stress ou survie à l'air.

Dans cette partie, nous discutons les résultats du stress on stress qui a consisté à superposer deux types de stress sur des mollusques bivalves prélevés en mer, en différents sites du golfe au stress que subissaient déjà les animaux dans leur milieu naturel si celui-ci était pollué, on ajoute un deuxième facteur perturbant en les plaçant en situation d'anoxie, par mise à l'air libre en laboratoire, en température contrôlée.

La comparaison des taux de mortalité et la réduction du temps de survie chez les mollusques testés, est fonction du degré de pollution des différents sites de provenance des animaux, puisqu'en fin d'expérience, il apparaît clairement que les animaux témoins ont mieux résisté à la

mise à l'air libre que leurs congénères contaminés, où 100% de mortalité ne sont atteints qu'après 10 jours d'anoxie. Le TL50 sont réduits chez les moules prélevées dans les sites perturbés.

La réponse au stress est donc un processus adaptatif permettant de maintenir l'homéostasie de l'organisme face à une situation défavorable (Chrousos et Gold, 1992), mais elle peut laisser l'organisme entièrement vulnérable à d'éventuels parasites et pathogènes (Lacoste et *al.* 2001b). Cette réponse dépendra des fonctions physiologiques de l'animal à générer une contre-réaction qui le protège d'une situation disproportionnée, qui peut conduire à la mort, si l'organisme n'arrive pas à rétablir son équilibre, De Almeida (2004), décrit dans ses travaux que l'exposition de *Perna perna* 24 h à l'air libre, a perturbé les systèmes de défenses de l'animal.

Dans notre étude, le temps de survie du TL50 chez *P. perna* varie entre 2,95 et 5,75 jours ; nos résultats sembleraient en accord avec les données de la littérature,

Ainsi, par exemple Smaal *et al.* (1991) trouvent un temps de survie à l'air de la moule bleue variant entre 5,5 et 8 jours pour les sites les plus et les moins contaminés. Veldhuizen-Tsoerkan *et al.* (1991) comparant le temps de survie à l'air, après avoir exposé des moules à 3 et 6 mois au cadmium et au PCBs, trouvent un TL50 entre 9 et 12,5j. Les études de Viarengo *et al.* (1995), indiquent un TL50 compris entre 3,7 et 7j chez *M. galloprovincialis* exposées 6 jours à 0 et 1,2 µM de cuivre. Des résultats obtenus sur des sites de la Baie d'Agadir (Banaoui et *al.* 2004) indiquent des TL50 plus réduits chez *Perna perna* prélevée dans le site qui reçoit des rejets industriels (TL50 = 4,7j) que ceux loin de toutes activités anthropiques (TL50 = 9j).

Les résultats permettent de classer nos sites en fonction du leur degré de pollution, du moins vers le plus pollué : EH < BD < PE < PO < SB.

En conclusion, les faibles temps de survie observés chez les animaux provenant de sites pollués, ne sont qu'une conséquence de l'effet de la contamination par les différents polluants présents dans le milieu. Nous pouvons déduire que la réponse au test stress ou stress peut être utilisée comme outil pour l'évaluation de l'état général de santé des écosystèmes côtiers. De plus, en raison de la simplicité de sa mise en œuvre, ce test s'avère être une méthode originale, d'une extrême facilité de mise en place dans la mesure où elle ne nécessite pas de moyens sophistiqués. Il pourrait être intégré en routine dans les programmes de surveillance. Par ailleurs, la moule africaine *Perna perna* s'avère un bon modèle pour son utilisation.

Accumulation des métaux chez *Perna perna*

Dans cette partie, sont analysés les résultats obtenus lors des expérimentations terrain où nous avons recherché : La présence de polluants (métaux) dans les tissus, que l'on appelle aussi la dose interne, qui renseigne sur la qualité du milieu et la biodisponibilité des molécules polluantes pour les animaux. Ce paramètre, a été le premier et souvent le seul dans les études d'analyse de la pollution.

En règle générale, tous les métaux analysés ont montré des fluctuations saisonnières. Les concentrations de Cd affichent des valeurs élevées au niveau du site BD et SB. En effet, ces deux oueds traversent des terres agricoles, et drainent des quantités importantes de polluants, d'origine domestique, agricole et industrielle, en particulier l'usine FERTIAL (pesticides et ammoniac) et El Hadjar qui est le siège de l'usine sidérurgique qui se jettent ensuite dans la mer, sans aucun traitement au préalable. Nous constatons également, que ces teneurs sont élevées surtout en hiver et au printemps. Le cuivre et le zinc sont des éléments essentiels indispensables à certaines fonctions physiologiques et à certains mécanismes biochimiques cellulaires, mais sont toxiques à forte dose. Nous avons noté, une nette contamination de tous les sites d'étude par le cuivre avec des valeurs plus ou moins élevées enregistrées en été et au printemps. Les mesures de zinc ont permis de constater une pollution par ce métal exceptionnellement en hiver, dans quatre sites : Les deux ports (PO et PE), Bedjima (BD) et El Hnaya (EH).

Les valeurs moyennes enregistrées révèlent un ordre décroissant $Zn < Cu < Cd$, ce même résultat est signalé dans les travaux de Beldi, (2006) dans les tissus d'un organisme mollusque bivalve, *Donax trunculus* au niveau du site Sidi Salem, non loin de notre site Seybouse. Moukrim, *et al.* (2000) observent également une forte concentration en zinc au niveau du manteau de *Perna perna*. Les teneurs en métaux analysées chez la moule *Perna perna* révèlent un effet saison significatif pour les trois métaux. Des travaux antérieurs ont mis en évidence l'importance du complexe industriel FERTIAL dans l'émission de divers rejets dans l'atmosphère et dans l'eau du golfe d'Annaba (Semadi et Deruelle, 1993). De plus, divers métaux lourds (zinc, fer, et cuivre) ont été détectés dans les sédiments du golfe (Abdenour *et al.* 2000). Deradji *et al.* (2005) rapportent que de fortes concentrations en métaux lourds dissous surtout le Cu, Zn et Cd dans l'oued Seybouse à proximité de la zone industrielle. De plus, le cuivre et le zinc sont utilisés comme fertilisants dans les terres agricoles.

Une telle contamination par les métaux lourds peut causer des accumulations le long de la chaîne alimentaire. L'importance de la voie trophique dans la contamination des moules marines a été mise en évidence (Casas, 2005).

Des variations saisonnières similaires des teneurs en métaux traces ont été observées chez diverses espèces de mollusques filtreurs: *Pecten maximus*, *Chlamys opercularis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. californianus*, *C. gigas*, *C. virginica* (Bryan, 1973 ; Phillips, 1976 ; Majori et al. 1978; Boyden et Phillips, 1981 ; Ritz et al. 1982 ; Farrington et al. 1983 ; Metayer et al. 1985 ; Usero, 2005). Diverses causes peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène tel que la biodisponibilité des métaux avec en parallèle le rôle que peuvent jouer à ce niveau les variations des paramètres physico-chimiques du milieu (pH, salinité, température, teneur en M.E.S.) associés aux processus physiologiques propres à l'espèce. La disponibilité de la nourriture ou variations du métabolisme au cours du cycle de reproduction sont parmi les principales causes de ce phénomène (Bryan, 1973 ; Cossa et al. 1980 ; Goldberg et al. 1983 ; Amiard, 1988).

La plupart des auteurs reconnaissent l'existence d'un maximum hivernal et d'un minimum estival des concentrations métalliques chez la moule, en particulier pour le zinc (Majori et al. 1978 ; N.A.S. 1980 ; Goldberg et al. 1983 ; Popham et D'Auria, 1983 ; Metayer et al. 1985). Nos résultats semblent avoir le même profil évolutif.

La majorité des éléments analysés chez la moule *Perna perna* présentent des fluctuations saisonnières marquées dans le sens d'un maximum printanier/hivernal et un minimum automnal/estival, dont les résultats seraient probablement dus aux rejets industriels et urbains très chargés en matière organique, support privilégié des métaux engendrant la formation de complexes organométalliques plus ou moins stables, à ceci s'ajoutent les apports de métaux particuliers occasionnées dans l'eau de mer par le ruissellement accru survenant pendant l'hiver Fowler et Oregioni (1976). Dans l'environnement marin, les zones littorales proches d'estuaires ou de rivières sont soumises à une contamination anthropique périodique par les métaux lourds.

Les travaux de Tahiri et al. (2005) chez *M. galloprovincialis* récoltées au niveau de l'estuaire de Bouregreg au Maroc, révèlent une contamination polymétallique plus importante en hiver qu'en été, principalement pour le Cd, Cr, le Pb et le Zn. Plusieurs travaux (Fowler et Oregioni 1976; Popham et D'Auria, 1982) ont montré chez *Mytilus edulis* des concentrations métalliques plus élevées en hiver qu'en été. D'autres auteurs ont observé les teneurs les plus fortes plutôt au printemps et les plus faibles en automne (Radenac et al. 1997) chez le même mollusque. Les

variations des résultats entre les différents auteurs pourraient être liées à la biologie des bivalves. La bioaccumulation des métaux chez les bivalves a fait preuve de variations interspécifiques et intra spécifiques (Amiard-Triquet et Caurant, 1994) dues probablement aux : **Facteurs biologiques** tels que l'intensité du stockage des matières de réserves qui fluctue saisonnièrement pour des raisons principalement physiologiques et l'âge ou/et **Facteurs environnementaux** tels que la température, la salinité et les éléments nutritifs. La période hivernale est souvent accompagnée d'un apport en éléments nutritifs qui pourraient conduire à une richesse en phytoplancton éventuellement contaminé par les métaux relargués par les sédiments et ceux issus des rejets industriels. Cette matière disponible pendant la période de stockage pourrait être à l'origine de l'augmentation des teneurs en hiver chez la moule (Le Mao, 1994).

Dans notre étude, les deux sites portuaires présentent des concentrations relativement élevées en cuivre pendant l'été, par rapport aux médianes nationales françaises données par le Réseau National d'Observation Ifremer, du fait de l'utilisation massive de peinture "anti-salissures" à base de cuivre pour l'entretien des bateaux de pêche.

Le cadmium, est classé parmi les métaux non essentiels, cependant Price et Morel (1990) ont montré que dans les milieux pauvres en zinc, le cadmium est susceptible de remplacer ce métal essentiel dans les macromolécules biologiques et, de ce fait, laisserait supposer que ce métal interviendrait dans certains rôles physiologiques en se substituant au zinc au niveau des structures cellulaires et/ou des enzymes (Viarengo et *al.* 1993). Des études sur l'accumulation du cadmium chez les bivalves marins ont montré la relation qui existe entre l'accumulation de cadmium dans l'organisme et sa concentration dans le milieu (Erk et *al.* 2005). La bioaccumulation dépend aussi, donc de la biodisponibilité chimique des contaminants. Différentes études au Cemagref ont permis d'avancer sur ce sujet et ont montré que les conditions biogéochimiques du milieu influencent la biodisponibilité des contaminants dissous (Gourlay et *al.* 2003, Tusseau-Vuillemin et *al.* 2004).

En conclusion, les divers biotopes aquatiques du golfe d'Annaba sont exposés à une forte contamination par des xénobiotiques apportés par voie atmosphérique et via les eaux usées riches en déchets d'origine domestique, industrielle et agricole. En conséquence, la contamination de la faune aquatique est inévitable et la capacité de bioaccumulation des micropolluants par ces organismes rend compte de la qualité des eaux et du niveau de pollution de plus en plus élevé.

D'après d'antécédents travaux effectués sur le golfe d'Annaba, Sifi *et al.* (2005) suggèrent que le niveau de pollution a augmenté au cours de ces deux dernières années.

Biomarqueurs

Seront discutés dans cette partie, les expérimentations de terrain, où les réponses des biomarqueurs, qui ont fait l'objet d'un suivi saisonnier, ont été mesurées dans la branchie et dans la glande digestive de *Perna perna*. Sur l'ensemble des résultats, l'effet des saisons et du site de prélèvement est significativement mis en évidence.

Les résultats obtenus, montrent des variations saisonnières, et ce pour les deux tissus étudiés. De nombreux travaux décrivent des modifications d'activités en liaison avec la saison pour d'autres enzymes antioxydantes chez les bivalves marins *M. galloprovincialis* (Viarengo *et al.* 1991), *M. edulis* (Power et Sheehan, 1996) et le bivalve d'eau douce *C. fluminea* (Vidal *et al.* 2002b).

D'autre part, Livingstone *et al.* (1993) ont observé que les enzymes de détoxification de la phase I de *Mytilus edulis*, sont induites par des paramètres saisonniers indépendants de la présence de contaminants dans leur milieu de vie.

Les résultats de terrain révèlent des taux de glutathion réduit qui décroissent surtout en hiver et en été. Cette variation étant plus marquée dans la glande digestive que dans les branchies. Cette différence de réponse inter organes a déjà été observée par Cossu *et al.* (2000), en faveur de la glande digestive à la même saison, cette dernière, est connue pour être l'organe majeur dans la détoxification des métaux (Marigomez *et al.* 2002; Moore et Allen, 2002). En ce qui concerne la spécificité du tissu dans le phénomène d'accumulation, Irato *et al.* (2003) remarquent que les concentrations en Cd sont plus fortes dans les glandes digestives que dans les branchies de *Mytilus galloprovincialis* récoltées dans la lagune de Venise.

Dans nos travaux, l'effet des saisons est bien mis en évidence. En effet, si au printemps les taux de GSH sont les plus élevés dans la branchie, ce sont les glandes digestives qui présentent les niveaux les plus forts à l'automne, ces variations ne sont malheureusement pas significatives, les seuls résultats vraiment significatifs sont ceux obtenus en hiver, au niveau d'une part du port coté Est et d'autre part au niveau des deux oueds Seybouse et Bedjima, qui sont soumis à de nombreux rejets permanents d'origine urbaine et industrielle et portuaires. Au cours de cette saison, les crues et les averses entraînent une augmentation du débit et par conséquent celle de la

turbulence du milieu suite à une remise en suspension des matériaux fins, pouvant être à l'origine d'une contamination métallique.

Des concentrations en métaux lourds relativement élevées ont été obtenues dans les tissus de *D. trunculus* (Beldi et al. 2006) au niveau de Sidi Salem, site non loin de l'Oued Seybouse. Ces résultats seraient à rapprocher de ceux rapportés par Abbes et al. (2003) qui trouvent une inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) chez la même espèce, ce qui prouverait l'effet de polluants de type pesticides ou métalliques. En effet récemment, plusieurs études ont suggéré que l'inhibition de l'AChE pourrait être un indicateur d'une contamination par les métaux lourds chez les organismes marins (Sokolova et al. 2005). D'autre part, Cossu-Leguille et al. (1999) rapportent que chez le mollusque d'eau douce *Unio tumidus*, exposé à des polluants (hydrocarbures aromatiques polycycliques et métaux), la diminution du glutathion est associée à celle des activités enzymatiques de la glutathion peroxydase dépendant du sélénium et de la glutathion réductase, témoignant d'une déficience de la défense anti-oxydante. Ces auteurs suggèrent que ces paramètres (dont la diminution du glutathion) soient considérés comme des biomarqueurs de dommage.

Contrairement aux variations des teneurs en GSH, les activités GST sont plus marquées dans les branchies. Un maximum d'activité est noté au printemps contre un minimum en été. Nos résultats semblent en accord avec les travaux de Deviller et al. (2005), qui montrent dans une étude de biosurveillance des différences d'activité de la GST en fonction de la saison, où les activités maximales étant en mars avril, alors que les plus faibles sont en juillet août. Les altérations du taux et/ou de l'activité des enzymes de biotransformation sont les plus sensibles biomarqueurs d'effet (Van der Oost et al. 2003). Ces enzymes peuvent être inhibés ou activés lors d'une exposition à un xénobiotique qui s'avère très fiables chez les mollusques (Cajaraville et al. 2000).

En comparaison avec le site de référence, l'augmentation saisonnière de la GST, obtenues au cours de notre étude, se traduit par une forte activité de détoxification des bivalves qui serait en rapport avec leur niveau d'exposition à la pollution, ainsi que probablement à la dynamique des marées qui pourrait avoir une influence prépondérante sur la qualité et la gestion de la charge polluante qui transite par les estuaires avant d'être évacuée dans la mer. Des résultats similaires ont été obtenus au niveau de Sidi Salem, chez *D. trunculus* (Abbes et al. 2003). Une augmentation saisonnière de la GST a été également signalée chez *Ruditapes decussatus* (Hoarau et al. 2001) et *Pecten maximus* (Le Pennec et Le Pennec, 2003) en fonction de la saison. Ou

encore, les travaux de Funes et *al.* (2006) qui montrent une augmentation de l'activité GST suivant un gradient de pollution métallique en fonction de la saison.

Variation du GSH et du GST en fonction des apports anthropiques

Les réponses antioxydantes observées chez *P. perna* du golfe d'Annaba, peuvent être influencées par d'autres facteurs tels que les apports anthropiques. En effet, les résultats obtenus montrent des variations saisonnières des deux biomarqueurs (GSH et GST), principalement au niveau de l'oued Seybouse où un maximum d'activité GST est enregistré en hiver, et ce aussi bien dans la glande que dans les branchies et en été au niveau des branchies.

Une importante marée d'hydrocarbure a été notée à la sortie de l'oued Seybouse à cette période là. De plus cet oued se trouve soumis à de nombreux rejets permanents d'origine urbaine et surtout industrielle, auxquels s'ajoutent ceux du complexe d'engrais chimique, ainsi que ceux dus à l'activité agricole pratiquée sur ses rives (résidus d'engrais et de produits phytosanitaires) qui en font de véritables égouts à ciel ouvert (Mebarki, 1996), le tout transitant par l'estuaire avant être évacué dans la mer. Toute cette charge polluante perturbe l'état physiologique des animaux et peut avoir une influence sur leur système antioxydant. L'analyse des métaux dans la chair des moules, prélevées dans les deux ports, a révélé une contamination importante en cuivre et également en zinc. Le port d'Annaba est un port de commerce et de transit situé à l'intérieur de la ville, de ce fait les eaux usées domestiques et industrielles, ainsi que les eaux pluviales se déversent dans les bassins portuaires sans aucun traitement, entraînant une pollution croissante au rythme du développement urbain.

Les expériences au laboratoire

Dans cette dernière partie nous discuterons simultanément les résultats des expériences effectuées avec des moules prélevées d'abord en été ensuite en hiver, et où *Perna perna* a été exposée à différentes concentrations de cadmium et de cuivre.

Effet de l'exposition au Cd et au Cu sur la variation des biomarqueurs

Les traits communs à l'exposition de *Perna perna* au cadmium et au cuivre sont la diminution significative des niveaux de glutathion dans les branchies conduisant à une inhibition probable de la synthèse du glutathion, ainsi qu'une stimulation de l'activité de la GST. Les glutathion transférase participent dans les mécanismes antioxydants, et certains de ces isoformes ont un rôle assez significatif dans la détoxification des radicaux oxygénés et la diminution de la peroxydation lipidique (Cossu et *al.* 1997 ; Jensson et *al.* 1986).

Dans le cas de notre travail, l'exposition de *P. perna* réalisée avec des moules prélevées en été et exposées au cadmium et au cuivre a provoqué une diminution des taux de GSH.

Une telle diminution du glutathion en présence de métaux a été constatée chez la moule *Mytilus galloprovincialis* exposée au cuivre et au mercure par Canesi et *al.* (1999).

Discussion sur l'exposition au cadmium et la teneur en GSH et l'activité GST

Les travaux de Silvestre (2005) sur le crabe chinois soutiennent l'hypothèse selon laquelle la toxicité du Cd envers les branchies antérieures serait liée à l'induction du stress oxydant ainsi qu'à la liaison (oxydation) du Cd avec les ponts disulfures de protéines affectant leur conformation tridimensionnelle.

Dans notre étude, l'accumulation significative du cadmium chez les animaux exposés est associée à la diminution des teneurs en GSH et à l'augmentation des GST. Des travaux (Prakash et Rao, 1995 ; Brouwer et Brouwer, 1998 ; Geret et *al.* 2002) ont montré, chez *Perna viridis* exposée durant sept jours au cadmium, une augmentation des niveaux de la peroxydation lipidique associée à une diminution des taux de GSH qui ne peut plus jouer alors son rôle de piègeur de radicaux oxygénés ou qui le joue à un moindre degré ce qui permet à ces radicaux d'attaquer les membranes lipidiques.

Serra et *al.* (1999) montrent que ce sont les branchies qui accumulent préférentiellement le cadmium chez *Mytilus galloprovincialis*, par contre Amiard et *al.* (1986) ne notent pas de différence significative d'accumulation de cadmium entre les différents organes chez cette même moule. Dans notre étude, le cadmium est significativement accumulé au niveau des branchies de *Perna perna* du golfe d'Annaba, une analyse du Cd au niveau de la glande, aurait pu montrer dans quel organe l'accumulation serait la plus forte.

Dans notre cas de figure, le Cd a induit significativement la GST. De plus en plus d'études montrent que le Cd exerce sa toxicité au niveau cellulaire en partie en induisant la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) et favoriser le stress oxydant, la peroxydation lipidique, des dommages à l'ADN ou encore une oxydation des protéines (Stohs, 2000; Risso-de Faverney *et al.* 2001; Moustaid *et al.* 2005).

Discussion sur l'exposition au cuivre GSH, GST

L'exposition au cuivre des moules, pendant une semaine, a causé une déplétion significative des niveaux de GSH, des résultats similaires ont été constatés sur des moules exposées 24 et 72 h ($P < 0,05$) à $40\mu\text{g/l}$ de cuivre (De Almeida *et al.* 2004). Ces derniers auteurs suggèrent que cette diminution du GSH serait due à l'augmentation des activités de l'enzyme phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) au cours de laquelle le GSH jouerait le rôle de donneur d'électrons ou encore son rôle intracellulaire important dans la séquestration du cuivre (Freed-man *et al.* 1989). Des résultats similaires ont été avancés par Doyotte *et al.* (1997); Cossu *et al.* (2000) en exposant le bivalve d'eau douce *Unio tumidus* à $30\mu\text{g Cu/l}$ pendant 72 h. De plus, Canesi *et al.* (1997) constatent des diminutions des taux de GSH chez *M. galloprovincialis* exposée à $40\mu\text{g/l}$ de cuivre pendant 72 h.

Au cours de notre étude, le cuivre à faible dose ($10\mu\text{g/l}$) semble augmenter l'activité GST qui utilise le glutathion comme substrat, tandis qu'à la plus forte dose testée ($25\mu\text{g/l}$), la GST ne semble plus être sollicitée et d'autres enzymes ou des métallothionéines auraient probablement pris en charge la défense anti-oxydante. La plus forte concentration de cuivre a inhibé de manière significative la GST, cette absence de réponse peut refléter une moindre utilisation du GSH dans les réactions de conjugaison. Certains polluants peuvent agir sur les niveaux du GSH et diminuer les activités des GST qui ne peuvent plus jouer leur rôle de détoxification (Roméo *et al.* 2005). Nos résultats semblent être en accord avec les travaux de De Almeida *et al.* (2004), qui ne trouvent aucun changement dans les activités des GST sur la moule *Perna perna* exposée à $40\mu\text{g/l}$ de cuivre durant sept jours d'expérimentation.

Ces réponses des différents auteurs rendent difficile l'interprétation des résultats, toutefois d'après Viarengo *et al.* (1990) et Torre *et al.* (2002), il ressort que les variations des systèmes de défenses antioxydants en présence de métaux sont liées à l'augmentation des ROS, provoquant une défense antioxydante qui, si elle est suffisante, peut conduire à la diminution des taux de MDA (Rodriguez *et al.* 1993).

Les réponses biologiques : baisse du taux de glutathion et une hausse de l'activité de la GST analysées sur des moules prélevées **en hiver**, indiquent bien un effet toxique du cadmium.

Dans notre étude la baisse hautement significative du GSH relevée à la plus forte concentration de Cd (200µg/l) par rapport aux témoins, indique bien que l'accumulation du métal par les moules est fonction de la quantité administrée. Gnassia-Barelli et *al.* (1995) rapportent une bioaccumulation croissante du Cd dans les branchies de palourdes (*Ruditapes decussatus*) exposées à 200µg Cd/l ; ceci peut être expliqué par le fait que le cadmium induit la synthèse des métallothioneines (**protéines fortement soufrées, avec de nombreux groupements cystéines, de faible poids moléculaire**) qui jouent un rôle dans la protection des cations divalents toxiques (Cd⁺⁺ et Hg⁺⁺) et dans la séquestration du métal, (Amiard et *al.* 2006 ; Tanguy et *al.* 2003), jusqu'à ce que les capacités des animaux à synthétiser cette protéine soient atteintes.

Bioaccumulation des métaux

Les analyses des concentrations en métaux (Cd, Cu) dans la chair de *Perna perna* ont révélé une faible bioaccumulation de ces derniers à toutes les concentrations testées par rapport aux témoins.

Dans notre étude, la concentration du Cd décroît brutalement à 200µg Cd/l ($5,87 \pm 1,00\mu\text{g/g}$) et qui correspond à un taux d'environ 37% de GSH consommé. Nous avons analysé les moules intoxiquées au cadmium en zinc et en cuivre car on sait qu'il y a une interaction cadmium/zinc (Amiard-Triquet et Amiard, 1998). Ce même résultat, est observé dans les travaux de Damiens et *al.* (2006), où une accumulation relativement faible de cadmium avait été observée lors de la contamination Cd + BaP (réalisée en juillet) sur des huitres. En effet l'accumulation des métaux est un phénomène physiologique qui a des limites, et dans notre cas l'animal ferme ses valves pour survivre et empêcher l'entrée du cadmium.

Des facteurs du milieu sont donc susceptibles d'influencer l'activité valvaire (mouvement d'ouverture et de fermeture des valves) et ventilatoire des bivalves, ce qui peut entraîner des variations tout à fait importantes dans les taux d'accumulation d'un polluant (Tran et *al.* 2001; Tran et *al.* 2002; Tran et *al.* 2004b). L'oxygène, la variation de concentration de plancton, la température, le stress ainsi que la nature du contaminant, sont parmi les facteurs qui peuvent entraîner des variations de débit ventilé.

De précédentes études sur l'accumulation du cadmium chez les bivalves marins ont montré la relation qui existe entre l'accumulation de cadmium dans l'organisme et sa concentration dans le

milieu (Erk *et al.* 2005). Selon Langston *et al.* (1998), cela est dû à la prise de métal qui, chez la plupart des mollusques, est plus rapide que leur élimination d'où une accumulation qui s'effectue souvent proportionnellement à la concentration extérieure.

Par ailleurs, l'accumulation du cadmium, mesurée dans la chair totale des bivalves exposés en **hiver**, croît linéairement pendant toute la durée de l'expérience, par rapport à celle des témoins. Lorsque les individus sont soumis à un stress chimique, au laboratoire ou *in situ*, leur système de défense semble sensible et répond rapidement à la présence de polluants. Néanmoins, il est à remarquer que l'accumulation des métaux reste plus forte en hiver qu'en été. Nous constatons donc que les saisonnalités dominent dans ces cas là. Ce changement de la concentration en métaux essentiels (Cu et Zn) pourrait être interprété comme une manifestation non létale de la toxicité du cadmium (Amiard-Triquet et Amiard, 1998).

Les études de Serra *et al.* (1999), dans des expériences de contaminations en laboratoire, ont constaté des différences d'accumulation de cadmium en fonction des saisons dans les organes de *M. galloprovincialis*, avec un taux d'accumulation élevé au printemps, et un faible taux en période estivale, aussi bien, dans les branchies que dans les glandes digestives.

En résumé, de nombreuses études s'accordent pour constater l'existence d'un maximum hivernal printanier et d'un minimum estival ou automnal (Borković *et al.* 2005 ; Bocchetti et Regoli, 2006) qui résulterait d'après Cossa, (1987) aux changements de poids des tissus mous liés au cycle gamétogénétique.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ces dernières années, le biomonitoring environnemental s'est enrichi des approches écotoxicologiques appliquées à la préservation des milieux naturels. La connaissance des mécanismes d'action des polluants au niveau biologique a ouvert la voie au développement des biomarqueurs, qui figurent parmi les outils prometteurs du diagnostic environnemental. L'utilisation exponentielle de substances polluantes par l'homme, leur présence dans l'environnement et leurs effets sur les écosystèmes et les ressources, constituent l'un des problèmes les plus préoccupants du XXIème siècle.

Certains écosystèmes peuvent donc être naturellement très riches en éléments métalliques et abriter des communautés d'espèces qui y sont adaptées. Sous l'effet de la pression des activités anthropiques (activités industrielles, agricoles), la contamination métallique des milieux aquatiques peut augmenter significativement. Au-delà d'une certaine concentration (parfois très faible) dans le milieu, les métaux ont des effets néfastes. L'évaluation de ces effets doit tenir compte des particularités associées aux métaux. En effet, les concentrations naturelles varient en fonction de la nature géologique du milieu. Il est ainsi difficile, pour les écosystèmes affectés par la présence de métaux, d'estimer la part de métal d'origine naturelle. Ensuite, certains métaux présentent la particularité d'être à la fois essentiels pour les organismes vivants mais aussi toxiques au-dessus d'une certaine concentration. Les seuils d'essentialité et de toxicité peuvent être très variables entre les espèces. Par ailleurs, les organismes vivants sont adaptés aux concentrations naturelles en métaux présentes dans leur environnement.

C'est dans ce contexte que ce travail de thèse a été réalisé, dont les objectifs principaux étaient :

- Etudier l'état de santé du golfe d'Annaba (Sud Ouest de la méditerranée) à travers un modèle biologique, la moule *Perna perna*.
- D'étudier la réponse des systèmes antioxydants en condition de stress, lors d'étude en conditions contrôlées au laboratoire, ainsi que lors d'étude de terrain sur des sites présentant des profils de contamination différents.
- Enfin, de montrer que les mécanismes fondamentaux de détoxification tel que le tripeptide ubiquiste GSH et l'activité de la glutathion S-transférase (GST), responsables de la métabolisation de nombreux xénobiotiques, ont été pressentis comme **de bons biomarqueur de défense**.

- Parallèlement à ces mesures, les concentrations en métaux « lourds » : cadmium, cuivre et zinc ont été déterminées au niveau de la chair total de *P. perna*. Il nous semblait en effet important de connaître ces concentrations étant donné que les métaux lourds sont connus pour agir sur le glutathion et inhiber certaines activités enzymatiques.

Dans les premiers chapitres, nous avons voulu exploiter les données de tous les paramètres morphométriques des bivalves récoltées au cours de différentes saisons. Les données physico-chimiques nous ont permis de cerner les caractéristiques environnementales des cinq sites de l'étude. Les résultats ont permis de constater que les paramètres biométriques étaient très différents d'un site à un autre, ceci nous a également permis de comparer nos données à celles de la littérature. Il s'avère que *Perna perna* du golfe d'Annaba atteint une taille assez grande de l'ordre de 12cm, les plus grandes étant enregistrées au niveau de la plage El Hnaya.

A travers ces données, nous avons évalué les variations de l'indice de condition qui reflète l'état de santé général des animaux. Ce dernier indique, malgré les fluctuations saisonnières constatées que *Perna perna* présente un bon état physiologique ; excepté au niveau des moules collectées dans les oueds Bedjima et Seybouse où l'indice est relativement bas par rapport aux restes des sites. Par ailleurs, ces données permettent de distinguer deux périodes de ponte, se situant l'une au printemps et l'autre entre la fin de l'automne et début de l'hiver.

Des relations allométriques significatives ont été mises en évidence pour tous les paramètres linéaires et pondéraux mesurés sur l'ensemble des mollusques des sites de l'étude, témoignant d'une corrélation significative entre la longueur et la largeur, la longueur et l'épaisseur ainsi que, la longueur avec le poids. La croissance étant de type allométrie minorante.

D'autre part, l'évaluation du « stress on stress » ou survie à l'air, a permis d'avoir une idée sur le classement de nos sites du moins pollué vers le plus pollué selon l'ordre suivant EH < BD < PE < PO < SB. L'oued Seybouse est le plus pollué. Il apparaît évident que la station de la plage El Hanaya en tant que site de référence a été bien choisie. Bien que les résultats de la contamination métallique des moules de ce dernier site révèlent une forte concentration en zinc qui peut être attribué à la géochimie de l'endroit.

La seconde partie concerne les expérimentations de terrain qui ont révélé des différences de sensibilité des systèmes antioxydants entre les glandes digestives et les branchies. De plus, l'effet

des saisons, conforté par l'étude statistique, est bien évident. Nous avons pu mettre en évidence que l'activité GST était bien supérieures en période printanière, plus marquée dans les branchies. Cette réponse pourrait être en rapport avec les évolutions temporelles et l'état nutritionnel, qui s'avèrent être des facteurs prépondérants dans la modulation des réponses enzymatiques. D'autre part nous avons enregistré des diminutions significatives du glutathion réduit en hiver dans les deux organes. L'analyse de la variance à un facteur contrôlé (site) et à deux facteurs contrôlés (organe et saison) du système de défense de *Perna perna* révèle un effet hautement significatif pour l'ensemble des sites. Malgré ces variations sensibles, les résultats obtenus ont permis, grâce à une exploitation en Analyse en Composantes Principales (ACP), de distinguer des sites d'études en fonction de la qualité de leurs eaux. Ce type d'analyse présente l'avantage d'intégrer un nombre important de données et de faciliter l'exploitation des résultats.

Au vu de l'ensemble des résultats exposés ci-dessus, l'activité GST et les taux de GSH semblent être des biomarqueurs intéressants chez les mollusques bivalves pour la surveillance de l'environnement.

L'approche de la contamination des systèmes naturels se heurte en permanence à la complexité des mécanismes mis en jeu, du fait de la diversité des modalités et des caractéristiques de la contamination et des facteurs écologiques, abiotiques et biotiques, de leurs interactions et de leurs variations quasi permanentes, dans l'espace et dans le temps.

In toto, nous avons évalué les concentrations en métaux lourds (Cu, Zn et Cd). Les concentrations mesurées varient suivant la saison de prélèvement avec une accumulation plus forte en hiver et au printemps. Ceci pourrait être relativement influencé par les changements de poids probablement liés à la physiologie de reproduction de l'espèce, sans toutefois négliger l'effet de certains facteurs environnementaux. Les valeurs moyennes enregistrées révèlent un ordre décroissant $Zn < Cu < Cd$. La variation des concentrations des métaux, analysés dans cette étude, semble dépendre de deux facteurs : la saison et le site de prélèvement. Cependant, il est à remarquer que les deux sites portuaires présentent des concentrations relativement élevées en cuivre, par rapport aux médianes nationales données par le Réseau National Français d'Observation de l'Ifremer.

En pratique, les normes de qualité environnementale sont déterminées à partir d'essais d'écotoxicité réalisés en laboratoire. Nous avons constaté, que lorsque les individus sont soumis à un stress chimique, au laboratoire, leur système de défense semble sensible et répond rapidement à la présence de polluants.

La dernière partie concerne les expérimentations au laboratoire. Le cuivre a été choisi comme modèle de métal car ses propriétés chimiques sont particulièrement intéressantes du fait qu'il participe à des cycles d'oxydoréduction dans la cellule, le cadmium quant à lui, possède la capacité de traverser les barrières biologiques, sa toxicité est attribuée principalement à la perturbation qu'il engendre en se substituant aux métaux essentiels tels que le zinc, le cuivre et le calcium. Aux doses étudiées, nous avons mis en évidence une toxicité du cadmium. Au cours de l'intoxication au Cd et au Cu, les systèmes antioxydants ont répondu significativement surtout à la plus forte dose testée. Cependant, la plus forte concentration de cuivre a inhibé de manière significative la GST, ces différences peuvent s'expliquer par des variations de sensibilité individuelle. Lors de l'exposition à un polluant, l'animal peut stopper toute activité et fermer ses valves afin de limiter les échanges avec l'extérieur.

Néanmoins, au cours de nos travaux, les résultats confirment une accumulation des métaux plus forte en hiver qu'en été. Ces différentes réponses rendent difficile l'interprétation des résultats.

Les perspectives qui se dégagent de l'ensemble de ce travail seraient :

1. Une approche multimarqueur sera développée dans nos études de terrain notamment, la peroxydation lipidique au niveau branchial, le dosage des métallothionéines ou de l'acétylcholinestérase qui peut être inhibée par des polluants (pesticides et métaux)
2. Un suivi de contamination/décontamination serait un atout supplémentaire.
3. il serait intéressant de compléter l'étude expérimentale de toxicité par la voie trophique chez le bivalve filtreur, afin de mieux appréhender les conséquences pour l'écosystème. De même, les durées d'exposition devraient être plus longues afin de percevoir la réversibilité ou non des effets dans les organismes exposés.
4. Etudier l'effet de la toxicité de certains métaux essentiels sur la reproduction des bivalves.
5. Utiliser un mélange de polluants lors d'expérimentation au laboratoire pour se rapprocher du milieu naturel.

REFERENCES

References

- Abada-Boudjema, Y., Altes, J., Moueza, M., 1984.** Croissance comparée de deux espèces de moules *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna* dans une moulière naturelle de la baie d'Alger. *Haliotis* 14 : 33-38.
- Abdenmour, C., Smith, BD., Boulakoud, MS., Samraoui, B., Rainbow, PS., 2000.** Trace metals in shrimps and sediments from Algerian water. *J. Catalog. Mat. Env.*, 3: 9-12.
- AFNOR., 1985.** NF V 45056, September 1985.
- Almar, M., Otero, L., Santos, C., et Ganzalez Gallego, J., 1998.** Liver glutathione content and glutathione dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. *Journal. Environ. Sci. Health.* 33: 769-783.
- Al-Mohanna, S.Y et Subrahmanyam, M.N.V., 2001.** Flux of heavy metal accumulation in various organs of the intertidal marine blue crab *Portunus pelagicus* from the Kuwait coast after the Gulf War, *Environ. Inter.*, 27: 321-326.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B., Métayer, C., 1986.** Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper, and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 90: 425-431.
- Amiard, J.C., 1988.** Réflexions sur l'estimation des flux des éléments traces dans les organismes aquatiques. *J. Rec. Océan.*, 13, 1-2 : 36-41.
- Amiard-Triquet, C et Caurant, F., 1994.** Les formes physicochimiques de stockage des métaux chez les organismes marins. *Analysis Magazine* 22, 1: 24-26.
- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., 1998.** Influence of ecological factors on accumulation of metal mixtures. In: Langston, J.W., Bebianno, M.J. (eds.). *Metal Metabolism in Aquatic Environments. Chapman and Hall*, London, UK, 351-386.
- Amiard, J-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow P.S., 2006.** Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicol* 76 : 160-202.
- Amiard, J-C et Amiard-Triquet, C., 2008.** Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier Tec & Doc, Paris, 375p.
- Andral, B et Stanisiere, J. Y., 1999.** Réseaux Intégrateurs Biologiques. RINBIO. Evaluation de la qualité des eaux basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules en Méditerranée: résultats de la campagne 1998. *Ifremer. DEL/TL/ 99-038*.
- Andral, B., Stanisiere, J. Y et Mercie, S., 2001.** Réseau Intégrateurs Biologiques. RINBIO. Evaluation de la contamination chimique des eaux basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules en Méditerranée: résultats de la campagne, *Ifremer. R.INT. DEL/TL / 01-03*.
- Anonyme., 1976.** Les micropolluants minéraux dans les eaux superficielles continentales. Association française pour l'étude des eaux, Rapport n°6: 3p.
- Ansell, A.D et Lagardère, F., 1980.** Observations on the biology of *Donax trunculus* and *Donax vittatus* at Ile d'Oleron (French Atlantic Coast). *Mar. Boil.* 57 (4): 287-300.

Askew, CG., 1972. The growth of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* in Ensworth Harbour. *Aquaculture*, 1:237-25.

Aso, A., 1982. Contribution à l'étude de polluants métalliques chez la moule *Perna perna* (L.) dans la région d'Alger. Thèse de 3ème cycle, Université. Sciences. Technologie. Languedoc- Montpellier. 316 pp.

Aso, A., 1985. Etude des teneurs globales en métaux lourds chez la moule *Perna perna* (L.) dans la région d'Alger. Variations de ces teneurs en fonction de quelques paramètres biologiques. *J. Etude. Poll. CIESM*, 7(1984): 411-415.

Banaoui, A., Moukrim, A; Kaaya, A., 2004. Use of a marker of global stress, stress on stress, in bivalves *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* for the evaluation of pollution in Agadir bay (Southern Morocco). *Haliotis*, vol. 33 : 23-32.

Barillé, A.N., 1996. Contribution à l'étude des potentialités conchyliques du Pertuis Breton. Thèse de doctorat en biologie .Université d'Aix –Marseille 2.

Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J. C., Burgeot, T et Bellocq, J., 1998a. Concentrations of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Mar. Poll. Bull.*, 36: 951-960.

Baumard, P., Budzinski, H et Garrigues, P., 1998 b, PAHs in Arcachon Bay, France: origin and biomonitoring with caged organisms. *Mar. Poll. Bull.* 36: 577-586.

Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Dizer, H et Hansen, P.D., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Mar. Environ. Res.* 47: 17-47.

Bayne, BL., Svensson, S et Nellja., 1999. The physiological basis for faster growth in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*. *Biol. Bull.* 197(3): 377-387.

Bebianno, M.J et Langston, W.J., 1992. Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem and Physiol. C* 103 (1): 79-85.

Bebianno, M.J., Serafim, M.A., 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *Sci. of the Total Environ.* 214: 123-131.

Belabed., 2006. Evaluation de la contamination par les métaux lourds dans le littoral d'Annaba et la lagune El Mellah. Thèse de Magister. Université Badji Mokhtar, Annaba.

Beldi, H., Gimbert, F., Maas, S., Scheifler, R et Soltani, N., 2006. Seasonal variations of Cd, Cu, Pb and Zn in the edible mollusk *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba, Algeria. *Afric. J. Agric. Res.*, Vol 1(4): 85-90.

Benbrahim, M., 1982. La reproduction chez la moule africaine *Perna picta* (Born, 1780). Mémoire de fin d'étude, I.A.V. Hassan II. 32p.

Beninger, P.A et Lucas, A., 1984. Seasonal variation in condition reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams et Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (79): 19-37.

Benzohra, M. 1993. Les structures hydrodynamiques le long des côtes Algériennes. Workshop sur la circulation des eaux et pollution des côtes méditerranéennes du Maghreb, *INOC* : 33-44.

- Berthelin, C., Kellner, K et Mathieu, M., 2000.** Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp. Biochem. Physiol.* 125B: 359-369.
- Béthoux et al. 1995 In : Roméo, M., 1991.** Toxicologie des métaux traces dans l'environnement marin Oceanis, Vol 17, Fasc.4. 383-402.
- Betteridge, D.J., 2000.** What is oxidative stress? *Metabolism* 49 suppl. 1: 3-8.
- Bocchetti, R., Regoli, F., 2006.** Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* ;65(6):913-21.
- Bodoy, A et Massé, H., 1979.** Quelques paramètres permettant de suivre la production organique d'un mollusque bivalve au cours d'un cycle saisonnier. *Publ. Sci. tech. CNEXO, Actes colloque. 7:* 753-766.
- Borković, SS., Saponjić, JS., Pavlović, SZ., Blagojević, DP., Milosević, SM., Kovacević, TB., Radojčić, RM., Spasić, MB., Zikić, RV., Saicić, ZS., 2005.** The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comp. Biochem. Physiol C Toxicol. Pharmacol* ; 141(4):366-74.
- Bouhaima., 2000.** Etude de la biologie des moules *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna* et validation de certains biomarqueurs (acétylcholinestérase et peroxydation lipidique) pour l'évaluation de l'état de santé de la baie d'Agadir. Thèse d'Etat. Université. Ibn Zohra, Faculté des Sciences, Agadir, 187 p.
- Bouquegneau, J.M et Martoja, M. 1982.** La teneur en cuivre et son degré de complexation chez quatre Gastéropodes marins. Données sur le cadmium et le zinc. *Oceanol. Acta*, 5(2): 219-228.
- Boutet, I., Tanguy, A., Auffret, M., Riso, R. et Moraga, D. 2002.** Immunochemical quantification of metallothioneins in marine mollusks: characterization of a metal exposure bioindicator. *Environ. Toxicol. Chem*, 21(5): 1009-1014.
- Boyden, C.R et Phillips, D.J.H., 1981.** Seasonal variation and inherent variability of trace elements in oysters and their implications for indicator studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5: 29-40.
- Bradford, M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principal of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Brouwer, M et Brouwer, T.H., 1998.** Archives of biochemistry and biophysics, 351: 257- 264.
- Brown, B.E., 1982.** The form and function of metal containing “granules” in invertebrate tissues. *Biol. Rev.* 57: 621 - 667.
- Bryan, G.W., 1973.** The occurrence and seasonal variation of trace metals in the scallops *Pecten maximus* (L) and *Chlamys opercularis* (L). *J. Mar. Biol. Ass., U.K.*, 53: 145-166.
- Buege, J.A., Aust, SD., 1978.** Microsomal lipid peroxydation. *Meth. Enzym.* 50: 302-310.
- Burgeot, T et Galgani, F., 1998.** Application de l'EROD chez les poissons marins dans un programme pluridisciplinaire : surveillance de la mer du Nord in : Lagadic., Carquet, T.,Amiard, J C et Ramade, F. (Eds)*Tec et Doc* Lavoisier, Paris. 33-56.

Butler, P. A., Andren, L., Bonde, G. J., Jernelov A et Reisch, D. J., 1971. Monitoring organisms. FAO Conference on marine pollution and its effects on living resources and fishing. Rome, FAO fisheries report 99, Suppl. 1: 101-112.

Cadenas, E., 1989. Lipid peroxidation during the oxidation of haemoproteins by hydroperoxides. Relation to electronically excited state formation. *J. Biolumin Chemilumin* ; 4(1): 208-18.

Cain, D.J et Luoma, S.N., 1986. Effect of seasonally changing tissue weight on trace metal concentration in the bivalve *Macoma bathica* in San Francisco bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser* 28: 209-217.

Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. of the Total Environ.* 247: 295-311.

Calabrese, A., Collier, R.S., Nelson, D.A et Macinnés, J.R., 1973. The toxicity of heavy metals to embryos of the American Oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.*, 18: 162-166.

Canesi, L et Viarengo, A., 1997. Age-related differences in glutathione metabolism in mussel tissues (*Mytilus edulis* L). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem and Mol. Biol.* **116**: 217-221.

Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M. et Gallo, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aqua. Toxicol.* 46: 67-76.

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, Université du Sud Toulon Var, Toulon, 363 p.

Casas, S et Bacher, C., 2006. Modelling trace metal (Hg and Pb) bioaccumulation in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, applied to environmental monitoring. *Journal of Sea Research*, Volume 56(2):168-181.

Cattaneo, C., 2000. Etude de biomarqueurs d'exposition aux polluants chimiques chez la moule *M. galloprovincialis* mise en cage dans la baie de Nice et de Canne. Laboratoire R.O.S.E « Réponse des Organismes aux Stress Environnementaux », Faculté des Sciences, Université de Nice Sophia Antipolis.

Chambost -Manciet, Y., 2002. Ampleur et effets biologiques de la contamination métallique (Cd, Cu, Fe, Pb et Zn) des sédiments en Mer du Nord. Utilisation de l'étoile de mer *Asterias rubens* (L.) comme bioindicateur et biomarqueur (mémoire). Université Libre de Bruxelles.

Chappie, DJ, Burton., 1997. Optimization of *in situ* bioassays with *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(3): 559-564.

Charissou, A.M., Cossu-Leguille, C. et Vasseur, P., 2004. Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Science of the Total Environment* 322: 109-122.

Cheung, C.C., Zheng, G.J., Lam, P.K et Richardson, B.J., 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Mar. Poll. Bull.*, 45: 181-191.

Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology* 52, 189-203.

Chiffolleau, J.F., Auger, D., Chartier, E., Michel, P., Truquet, I., Ficht, A., Gonzalez, J.L et Romana, L.A., 2001. Spatiotemporal changes in Cadmium contamination in the Seine estuary (France). *Estuaries* 24(6B): 1029-1040.

Chrousos, G., Gold, P., 1992. The concept of stress and stress system disorders. *JAMA* 267, 1244-1252.

Claissé, D., Joanny, M., Quintin, J.Y., 1992. Le réseau national d'observation de la qualité du milieu marin. *Analysis* 20 :19-22.

Cossa, D., Bourget, E et Piuze, J., 1979. Sexual maturation as a source of variation in the relationship between cadmium concentration and body weight of *Mytilus edulis*. *Mar. Pollu. Bull.* 10: 174-176.

Cossa, D., Bourget, E., Pouliot, D., Piuze, J et Chanut, J.P., 1980. Geographical and seasonal variations in the relationship between trace metal content and body weight in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 58: 7-14.

Cossa, D et Lassus, P., 1989. Le cadmium en milieu marin. *Biogéochimie et écotoxicologie*, Editions Ifremer, Plouzané, France. 16: 111.

Cossa, D., Thibaud, Y., Romeo, M et Gnassia-Barelli, M., 1990. Le mercure en milieu marin. *Biogéochimie et écotoxicologie. Rapports scientifiques et techniques*, Editions Ifremer, Plouzané, France. 19: 130.

Cosson, R.P., Amiard-Triquet, C. et Amiard, J.C., 1991. Metallothioneins and detoxification. Is the use of detoxification protein for MTs a Language abuse? *Water. Air. Soil. Poll.* 57-58: 555-567.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M. C., Babut, M., Exinger, A. et Vasseur, P., 1997a. Glutathione reductase, selenium- dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 38: 122-131.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M. C. et Vasseur, P., 1997b. 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.

Cossu Leguille, C., Doyotte, A., Jacquin, MC., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P. 1999. Glutathione reductase, selenium dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38: 122-131

Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A. et Vasseur, P., 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45: 106-121.

Damiens, G., Mouneyrac, C., Quiniou, F., His, E., Gnassia-Barelli, M et Roméo, M., 2006. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. *Environ. Poll.* 140(3): 492-499.

De Almeida, E.A., Miyamoto, S., Bainy, A.C.D., De Medeiros M.H.G., Mascio, P.D., 2004. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals, *Mar.Poll.Bull.* 49: 386-392.

DeLeve, L.D; Kaplowitz, N., 1991. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol et Therap.* 52: 287-305.

- Deneke, SM., Fanburg, BL., 1989.** Regulation of cellular glutathione. *Am J. Physiol*; 257:163-73.
- Depledge, M.H et Rainbow, P.S., 1990.** Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C* 97: 1-7.
- Derradji, F., Kherici, N., Djorfi, S., Roméo, M., Caruba, R., 2005.** Etude de l'influence de la pollution de l'oued Seybouse sur l'aquifère d'Annaba (Algérie Nord orientale) par le chrome et le cuivre. Société hydrotechnique de France, Paris (France) ,1902. 4, 73-80.
- Deviller, G., Palluel, O., Aliaume, C., Asanthi, H., Sanchez, W, Franco Nava, MA., Blancheton, JP., Casellas, C., 2005.** Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation. *Ecotoxicol. Environ. Saf* ; 61(1):89-97.
- Djabri, L., Hani1, A., Guasmi, I., 2005.** Dégradation de la qualité des eaux des oueds : Cas de l'oued Seybouse (N.E. Algérien). 3ème Journées Internationale des Géosciences de l'Environnement. El Jadida.
- Djediat, C., Boukroufa, F., 1990.** Reproduction comparée de *Perna perna* et de *Mytilus galloprovincialis* sur la cote Algéroise. *Halictis*, 10 : 115-127.
- Doull, J. Klaassen, C.D et Amdur, MD., 1980.** Casarett and Doull's toxicology, second edition, Doull, Klaassen et Amdur (Eds), *Macmilan Publishing Co*, New york,429p.
- Dorange, G., Paulet, Y.M., Le Pennec, M., et Cochard, J.C., 1989.** Critères histologiques de la qualité des ovocytes émis par *Pecten maximus*. *C.R. Acad. Sci. Paris* 309 série 3 :113-120.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, MC., Babut, M., Vasseur, P 1997.** Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.* 39: 93–110.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M., Vasseur, P., 1997.** Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic. Toxicol.* 39: 93-110.
- Drake, R., John, I., Farrell, A., Cooper, W., Schuch, W., Grierson, D., 1996.** Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant. Mol. Biol.*, 30(4):755-67.
- Dridi, S., Romdhane, MS et El Cafsi, M., 2006.** Evidence of *Crassostrea gigas* reproduction in the Bizert lagoon, Tunisia. *Journal of Biological Research*, 5: 35-45.
- Dridi, S., Romdhane, MS et El Cafsi, M., 2008.** Croissance et variations saisonnières de la composition en acides gras de l'huître *Crassostrea gigas* cultivée dans la lagune de Bizerte, Tunisie. *Belg. J. Zool.*, 138 (2) : 158-169.
- Dringen, R., 2000.** Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration. *Eur J. Biochem*; 267(16):4903.
- Ellman, GL., Courtney, KD., Andres, Jr V., Featherstone, RM., 1961.** A new and rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88-95.
- Erk, M., Ruus, A., Ingebrigtsen, K., Hylland, K., 2005.** Cadmium accumulation and Cd -binding proteins in marine invertebrates -A radiotracer study. *Chemosphere* 61: 1651–1664.

Escher, B.I et Hermens, J.L.M., 2002. Modes of action In ecotoxicology: their role in body burdens species sensitivity QSARs and mixture effects, *Environ. Sci and Tech*, 36: 4201-4217.

Farrington, J.W., Goldberg, E.D., Riseborough, R.W., Martin, J.H. et Bowen, V.T., 1983. U.S. "Mussel Watch", 1976-1978: an overview of the trace metals, DDE, PCB, Hydrocarbon and artificial radionuclide data. *Env. Sci. et Technol.*, 17: 490-496.

Fenton, H.J.H., 1894. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *Journal of Chemical Society* 65: 899-910.

Flemming, C et Trevors, T., 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: A review. *Water Air. Soil. Poll.* 44:143-158.

Frazier, J.M., 1975. The dynamics of metals in the American oyster, *Crassostrea virginica*. Seasonal effects. *Chesapeake Sci.* 16: 162-171.

Frazier, J.M., 1986. Cadmium- binding proteins in the Mussel *Mytilus edulis*. Environmental Health Perspectives 65, 39-43.

Frehi, H., 1998. Etude de la structure et du fonctionnement du système phytoplanctonique dans un système marin côtier : Eutrophisation de la baie d'Annaba. Thèse de Magister. Université Badji Mokhtar, 99 p.

Freed- man, J.H., Ciriolo, M.R., Peisach, J., 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol.Chem.* 264: 5598-5605.

Fridovich, I., 1975. Superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* 44: 147-159.

Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y. et 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.

Fowler, SW et Oregioni, B., 1976. Trace metals from the N.W. Mediterranean. *Mar. Pollut. Bull.*, 7 : 26-29.

Funes, V., Asensio, E., Ponce, M., Infante, C., Cañavate, JP., Manchado, M., 2006. Insulin-like growth factors I and II in the sole *Solea senegalensis*: cDNA cloning and quantitation of gene expression in tissues and during larval development. *Gen Comp. Endocrinol.*, 149(2):166-72.

Genevois, C., Pfohl-Leszkowicz, A., Boillot, K., Brandt, H., Castegnaro, M., 1998. Implication of cytochrome P450 1A isoforms and the Ah receptor in the genotoxicity of coal tar fume condensate and bitume fumes condensates. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 5:283-294.

George, SG., Pirie, BJS., Coombs, TL., 1976. The kinetics of accumulation and excretion of ferric hydroxide in *Mytilus edulis* (L.) and its distribution in the tissues. *Journal of Experimental Mar Biol. Ecol.* 23:71-84.

George, SG., 1990. Biochemical and cytological assessments of metal toxicity in marine animals. In: Heavy metals in the marine environment. Furness, RW and Rainbow, PS. Eds. *CRC Press, Boca Raton*, 123-142.

Géret F., Jouan A., Turpin V., Bebianno M. J. et Cosson R. P., 2002. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resources* 15: 61-66.

Gillot, P., More, P., Amiard, J.C. et Bourget, G., 1989. Purification of metallothionein-like (protein) of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg induced experimentally by cadmium. *Océanis* 15 (4): 391-399.

Gnassia-Barelli, M., Lemee, R., Pesando, D., Romeo, M., 1995. Heavy metal distribution in *Caulerpa taxifolia* from the North-Western Mediterranean. *Mar. Pollu. Bull.* 30(11): 749-755.

Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker, P.L., Risebrought, R.W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E., 1978. The mussel watch. *Environmental Conservation* 5, 101-125.

Goldberg, E.D., Koide, M., Hodge, V., Flegal, A.R et Martin, J., 1983. U.S. Mussel Watch: 1977- 1978 results on trace metals and radionuclides. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 16: 69-93.

Goldberg, E.D., Bertine, K.K., 2000. Beyond the Mussel Watch new directions for monitoring marine pollution. *The Science of the Total Environment* 247:165-174.

Gonzalez, J. L., Chiffolleau, J.F., Miramand, P et Thouvenin, B., 1999. Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire, Programme scientifique Seine Aval, Editions Ifremer, Plouzané, France: 31.

Gourlay, C., Tusseau-Vuillemin, M.H., Garric, J et Mouchel, J.M., 2003. Effect of non-humic dissolved organic matter from various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*. *Environ.Toxicol. Chem.* 22(6): 1288-1294.

Grangnery, A., 2001. Etude et modélisation de la dynamique des population des principaux bivalves en élevage (*Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*) et des principaux épibiontes des étangs de Thau. Thèse de doctorat , 1999-2000.

Grennwald, R.A., 1985. Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, FL.

Gutteridge, J.M., Rowley, D.A., Halliwell, B., 1982. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of 'catalytic' iron and anti-oxidant activity in extracellular fluids. *Biochem Journal*.15; 206(3):605-9.

Gutteridge, J.M., Wilkins, S., 1983. Doxorubicin degradation: changes in activity compared by bacterial growth inhibition and free radical-dependent damage to desoxyribose. *J Biol Stand.* ; 11(4): 359-64.

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*.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Gluthation-S-transferases: the first enzymatic step in mercurapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249: 7130-7139.

Halliwell, B., 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB Journal* 1: 358-364.

Hamilton, S.J et Mehrle, P.M., 1986. Metallothionein in fish: review of its importance in assessing stress from metal contaminant. *Transactions of the American Fisheries Society*, Vol. 115: 596-609.

Hare, L., 1992. Aquatic insects and trace metals: bioavailability, accumulation, and toxicity, *Critical Rev Toxicol*, 22: 327-369.

- Hassler, C.S., Behra, R et Wilkinson, K.J., 2005.** Impact of Zinc acclimation on bioaccumulation and homeostasis in *Chlorella Kessberit*, *Aqua toxicol*, 74, 139-149.
- Haughey, M.A., Anderson, M.A., Whitney R.D., Taylor, W.D., Losee, R.F., 2000.** Forms and fate of Cu in a source drinking water reservoir following CuSO₄ treatment. *Water Research*, Volume 34, Issue 13, 3440-3452.
- Hedgecock, D., Mc Goldrick, DJ., Manahan, DT., Vavza, J., Appelmans, N et Bayne, BL., 1996.** Quantitative and molecular genetic analyses of heterosis in bivalve molluscs. *Journal of Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 203: 49-59.
- Hoarau, P., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Girard, J.P., 2001.** Differential induction of Glutathione -S-Transferases in the clam *Ruditapes decussates* exposed to organic compounds. *Environ. Toxicol. Chem*, 20: 523-529.
- Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., Girard, JP., 2002.** Purification and partial characterization of seven glutathione S- transferase isoforms from the clam *Ruditapes decussatus*. *Eur J. Biochem*. 269:4359–4366.
- Idhalla, M., Bouhaimi, A., Zekhnini, A., Narbonne, J.F., Mathieu, M., et Moukrim, A., 1997.** Etude du cycle de reproduction de deux espèces de moules *Perna perna* (Linné, 1758) et *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) dans la baie d'Agadir (Sud du Maroc). *Haliotis* 26,51-62.
- Incze, L.S., Lutz, R.A., et Walting, L., 1980.** Relationship between effects of environmental temperature and seston on growth and mortality of *Mytilus edulis* in a temperate northern estuary. *Mar. Biol* 58: 147-156.
- Irato, P., Santovito, G., Cassini, A., Piccinni, E., Albergoni, V., 2003.** Metal accumulation and binding protein induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequivalvis*, and *Tapes philippinarum* from the lagoon of Venice. *Archives of Environ Con and Toxicol* 44, 476-484.
- Jeantet, A.Y., Ballan-Dufrançais, C et Martin, J.L., 1985.** Recherche des mécanismes de détoxication du cadmium par l'huître *Crassostrea gigas* (Mollusque Bivalve). II. Sites intracellulaires d'accumulation du métal dans les organes absorbants et excréteurs. *C. R. Acad. Sci., Paris, sér. III*, 301: 177-182.
- Jensson, H., Guthenberg, C., Alin, P, Mannervik B., 1986 .** Rat glutathione transferase 8-8, an enzyme efficiently detoxifying 4-hydroxyalk-2-enals. *FEBS Lett.* 28; 203(2):207-9.
- Journal officiel n° L 077 de la Commission du 8 mars., 2001 .** Directive Portant fixation de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en plomb, cadmium, mercure et 3-MCPD dans les denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE.) 0014-0021.
- Jumarie, C., Fortin, C., Houde, M., Campbell, PGC et Denizeau, F., 2001.** Cadmium uptake by Caco-2 cells: effects of complexation by chloride, glutathione and phytochelatins. *7R [LFRO_ \$SSO_3KDUPDFRO*, 170: 29-38.
- Karayücel, S et Karayücel, I., 2000.** The effect of environmental factors, depth and position on the growth and mortality of raft-cultured blue mussels (*Mytilus edulis* L.). *Aquaculture Research* 31: 893-899.
- Kelly, JD., Shah, D., Chen, FX., Wurdeman, R., Gold, B., 1998.** Quantitative and qualitative analysis of DNA methylation at N3-adenine by N- methyl-N-nitrosourea. *Chem Res.Toxicol*; 11(12):1481-6.

- Kraal, M.H., Kraak, M.H.S., De Groot, C.J., Davids, C., 1995.** Uptake and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotox and Environ Saf*, 31: 179-183.
- Kranzberg, G., et Stokes, P.M., 1989.** Metal regulation, tolerance and body burdens in the larvae of the Genus *Chironomus*, *Canadian journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46,389-398.
- 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.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gelebart, F., Cordevant, C., Lange, M., Poulet, S.A., 2001b.** A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis. Aquat. Org.* 46, 139-145.
- Lagadic, L., Caquet, T et Amiard, J-C., 1997.** Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In : Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. et Ramade, F. (eds) Masson, Paris.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., 1997.** Biomarqueurs en ecotoxicologie/Aspects fondamentaux. Masson Edit, Paris, p. 419.
- Lane, T.W et Morel, F.M.M., 2000.** A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(9): 4627-4631.
- Langston, W. J. et Spence S. K., 1995.** Biological factors involved in metal concentrations observed in aquatic organisms. *Environ. Sci. Tech.* 26: 407-467.
- Lasiak, T.A., 1986.** The reproductive cycles of the intertidal bivalves *Crassostrea cucullata* (Born, 1778) and *Perna perna* (Linnaeus, 1758) from the Transkei coast, southern Africa. *Veliger* 29: 226-230.
- Lasiak, TA., Barnard, TCE., 1995.** Recruitment of the brown mussel *Perna perna* on to natural substrata: a refutation of the primary/secondary settlement hypothesis. *Mar.Ecol.Prog Ser.* 120: 147-153.
- Le Mao, P., 1994.** Influence de la qualité du milieu sur la qualité marchande des coquillages. *Equinox spécial environnement littoral.* 47-48:91-96. IFREMER.
- Le Pennec, G. et Le Pennec, M., 2003.** Induction of glutathione S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L.): application of a new cellular model in biomonitoring studies. *Aquat. Toxicol.* 64: 131-142.
- Liang, Y., Cheung, R.Y.H., Wong, M.H., 1999.** Reclamation of wastewater for polyculture of fresh water fish: bioaccumulation of trace metals in fish. *Water Res*, 33: 2690-2700.
- Livingstone, D.R., Garcia Martinez, P., Michel, X., Narbonne, J.F., O'Hara, S., Ribera, D., Winston, G.W., 1990.** Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Func. Ecol.*, 4, 415-424.
- Livingstone, D.R., Lemaire, P., Matthews, Peters, L., Bucke, D., Law, R.J., 1993.** Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O- deethylase (EROD) activity responses in livers of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Mar. Poll. Bull.* 26, 602-606.
- Livingstone, DR., 1993.** Biotechnology and pollution monitoring; use of molecular biomarkers in the aquatic environment *J. Chem. Tech. Biothechnol.*, 57: 195-211.

Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Poll. Bull.* **42**: 656-666.

Lubet, P et Bourcart, C., 1963. Nouvelles observations sur la physiologie sexuelle de *Mytilus galloprovincialis*. Comptes rendus des séances de la Société de Biologie, Paris, 157 (2) : 1966- 68.

Lubet, P., Gimazane, J.P., et Prunus, G., 1981. Etude du cycle de reproduction de *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) à la limite de son aire de répartition. Comparaison avec les autres secteurs de cette aire. *Haliotis*, 11 : 157-170.

Lubet, P., Aloui, N., et Karnaukhov, A.N., 1986. Etude expérimentale de l'action de la température sur le cycle de reproduction de *Mytilus galloprovincialis*. Comparaison avec *Mytilus edulis*. Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences, 303 (12) : 507-512.

Lubet, P., 1991. Bases biologiques de la culture des mollusques. In: BARNABÉ G (ed), Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture: 99-210.

Lucas, A et Beninger, P.A .,1985 . Seasonal variation in condition reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat : *Tapes decussatus* L. And *Tapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Exp.Mar.Biol.Ecol.*, **79**: 19-37.

Majori, L., Nedoclan, G., Modonutti, G.B. et Daris, F., 1978. Study of the seasonal variations of some trace elements in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* taken in the Gulf of Trieste. *Rev. Int. Océanogr. Méd.* **39**: 37-50.

Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in the blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.* **70**, 83–93.

Marigomez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and Subcellular. Distribution of Metals in Molluscs. *Microscopy Research and Technique* **56**, 358-392.

Markich, S.J., Jeffree, A.R., 1994. Absorption of divalent trace metals as analogues of calcium by Australian freshwater bivalves: an explanation of how water hardness reduces metal toxicity. **29**: 257-290.

Martoja, M., et Elkaïm, B., 1980. Bioaccumulation du cuivre chez *Littorina littorea* (L.) (Gastéropode Prosobranchie) : signification physiologique et écotoxicologique. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **43**: 251-270.

Masala, O., Mc Innes, E.J.L., et O'Brien, P., 2002. Modeling the formation of granules : the influence of manganese ions on calcium pyrophosphate precipitates, *Inorganica Chimica Acta*, **339**, 366-372.

Masala O et O'Brien P, 2002. Influence of zinc on the formation of granules of calcium pyrophosphate, materials Research Society Symposium-Proceedings: 711, 307- 312.

Matès J.M., 2000, Effect of antioxidant enzyme in the molecular control of reactive oxygen species. *Toxicology* **153**: 83-104.

McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol.Chem.* **244**, 6049–6055.

- McGeer, J.C., Brix, K.V., Skeaff, J.M., DeForest, D.K., Brigham, S.I., Adams, W.J et Green, A., 2003.** Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**(5): 1017-1037.
- McQuaid, CD et Lawrie, SM., 2005.** Supply-side ecology of the brown mussel, *Perna perna*: an investigation of spatial and temporal variation in, and coupling between, gamete release and larval supply. *Mar Biol*, 147 (4): 955-963.
- Mebarki, A., 1996.** Les bassins exoréiques de l'Est Algérien et leurs apports d'étiage à la mer méditerranée : Ecoulement, rejets et protection des eaux du littoral. Faculté des sciences de la Terre. Université de Constantine.
- Métayer, C., Amiard, J.C. et Amiard-Triquet, C., 1982.** Accumulation de quelques éléments traces métalliques (Cd, Pb, Cu et Zn) chez la sole (*Solea solea*) et le filet (*Platichthys flesus*) : variations en fonction de l'âge et de l'organotropisme. *Rev. Int. Océan. Méd.* LXVI-LXVII: 33-45.
- Metayer, C., Gamiard, J.C., Amiard-Triquet, C., et Berthet, B., 1985.** - Facteurs biologiques et écologiques contrôlant le niveau d'éléments traces (Cd, Pb, Cu, Zn) chez les Moules et les Huîtres de la Baie de Bourgneuf. *Bull. Soc. Sc. Nat. Ouest Fr.*, nlle. sér., 7, 2, 53-69.
- Millot, C., 1987.** The circulation of the levantine intermediate water in the Algerian basin. *Journal of geophysical research*, 92(C8): 8265-8276.
- Millot, C., 1993.** La circulation générale en Méditerranée occidentale. Workshop sur la circulation des eaux et pollution des côtes Méditerranéennes du Maghreb. INOC. 29-30.
- Miquel, M., 2001.** Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Rapport Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (Dir.). Rapport Sénat n°261: 360.
- Miramand, P., Guyot, T., Pigeot, J., Bustamante, P., Caurant, F. et Ferchaud, R., 2000.** Le cadmium dans les réseaux trophiques marins : de la source aux consommateurs. *Journal Européen d'Hydrologie* 31 (2): 127-143.
- Moore, M.N., 2002.** Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 59: 1-15.
- Moore, M.N., Allen, J.I., 2002.** A computational model of the digestive gland epithelial cell of marine mussels and its simulated responses to oil-derived aromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.* 54, 579-584.
- Morel F., 1983.** Principles of Aquatic Chemistry. New York, Wiley - Interscience. 301pp.
- Moukrim, A., Kaaya, A., Najimi, S., Romeo, M., Gnassia-Barelli, M., Narbonne, JF., 2000.** Assessment of the trace metal levels in two species of mussels from the Agadir Marine Bay, South of Morocco. *Environ. Contam. Toxicol.* 65: 478-485.
- Moustaid, K., Nasser, B., Baudrimont, I., Anane, R.; Idrissi M.; Bouzidi, A., Creppy E.E. 2005.** Évaluation comparée de la toxicité des moules *Mytilus galloprovincialis* de deux sites du littoral atlantique marocain sur des souris. *C.R. Biologie.* 328: 281-289.
- Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubèze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J.F., Moukrim, A., 1997.** Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir marine bay (south of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 901-908.

- N. A. S., 1980.** The international Mussel Watch. National Academy of Sciences, Washington, D.C., 248.
- National Research Council. 1987.** Biological markers in environmental health research. *Environmental Health and Perspectives* **74**: 3-9.
- National Research Council of Canada., 1994.** Tort-2: Lobster hepatopancreas reference material for trace metals, in certified reference material for trace metals, in certified reference material. NRC (Ed), Ottawa, Canada.
- Neff, J. M., 2002.** Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of contaminants from oil well produced water, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Newkirk, GF ., 1980.** Review of the genetics and the potential for selective breeding of commercially important bivalve. *Aquaculture*, **19**: 209-228.
- Nolan, C.V et Duke, E.J., 1983.** Cadmium accumulation and toxicity in *Mytilus edulis*: Involvement of metallothioneins and heavy-molecular weight protein. *Aquat. Toxicol.* **4**: 153-163.
- 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.
- Odzak, N., Zvonaric, T., 1995.** Cadmium and lead uptake from food by the fish *Dicentrarchus labrax*. *Water Sci Technol*, **32**: 49-55.
- Olsson, P.E., Kling, P., Hogstrand, C., 1998.** Mechanisms of heavy metal accumulation and toxicity in fish. In: Langston, W.J., Bebianno M.J., (eds). *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman et Hall Ltd, London pp 321-350.
- OMS-IPCS., 1998.** Environmental Health Criteria n°200: copper, World Health Organisation, International Programme on chemical safety. <http://www.inchem.org/fullist.htm>.
- Pannunzio, T.M., Storey, K.B., 1998.** Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorae*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **221**, 277–292.
- Parkerton TF, Konkel WJ. 2000.** Application of quantitative structure--activity relationships for assessing the aquatic toxicity of phthalate esters. *Ecotoxicol Environ Saf.* Jan; **45**(1):61-78.
- Paulet, Y.M., Dorange, C., Cochard, J.C., et Le Pennec., 1992.** Reproduction et recrutement chez *Pecten maximus* L. *Ann.Inst. Océanogr.* Paris **68** (1-2) :45-64.
- Pavicic, J., Skreblin, M., Krebar, I., Tusek-Zidaric, M., Stegnar, P., 1994 a.** Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations. I. Toxic effects of Cd, Zn and Hg in relation to the metallothionein level. *Comp. Biochem. Physiol.* C **107**, 249–257.
- Pellerin, M., Vincent, Y et Pelletier, E., 1989.** Evaluation de la qualité de l'estuaire du Saint-Laurent. Rapport remis au Ministère de l'environnement du Québec, 130p.
- Pellerin-Massicotte, J., 1994.** Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *Aquat. Ecosyst. Health* **3**, 101-111.
- Penninckx, M., 2000.** A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microbiol. Technol.* **1**; **26**(9-10):737-742.

- Pereira, AMM., Soares, AMVM., Gonçalves, F., Ribeiro, R., 2000.** Water- column, sediment, and *in situ* chronic bioassays with cladocerans. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47(1):27-39.
- Phelps, H.L. et Hetzel, E.W., 1987.** Oyster size, age, and copper and zinc accumulation. *J. Shellfish Res.* 6: 67-70.
- Phillips, D.J.H., 1976.** The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. *Mar. Biol.* 38: 59-69.
- Phillips, D. J. H., 1980.** Quantitative aquatic biological indicators: their use to monitor trace metal and organochlorine pollution, Applied Science Publishers, London.
- Phillips, D.J.H., 1990.** Use of macro algae and invertebrates as monitors of metal levels in estuaries and coastal waters. In: *Heavy metals in the marine environment*. Furness, R.W. et Rainbow, P.S. Eds, CRC Press, Boca Raton, pp. 81-99.
- Phillips, D.J.H. et Rainbow, P. S., 1994.** Biomonitoring of trace aquatic contaminants, Aldenn Press Ltd, Oxford.
- Pigeot, J., 2001.** Approche écosystémique de la contamination métallique du comportement biologique benthique des littoraux charentais : exemple du bassin de Marennes-Oléron. Thèse de doctorat de l'Université de La Rochelle : 305 p.
- Pocernich, CB., La Fontaine, M., Butterfield, DA., 2000.** In-vivo glutathione elevation protects against hydroxyl free radical-induced protein oxidation in rat brain. *Neurochem Int* ; 36(3):185-91.
- Pompella, A., Maellaro, E., Casini, A.F., Comporti, M., 1987.** Histochemical detection of lipid peroxidation in the liver of bromobenzene - poisoned mice. *American Journal of Pathology* 129, 295-301.
- Popham, JD et D'Auria, JM., 1982.** Effects of season and seawater concentrations on trace metal concentration in organs of *Mytilus edulis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11:273–282.
- Popham, JD et D'Auria, JM., 1983.** Combined effect of body size, season and location on trace element levels in Mussels (*Mytilus edulis*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 12, 1-14.
- Porté, C., Solé, M., Albaiges, J. et Livingstone, D.R., 1991.** Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus sp.* to organic pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology.C, Com. Pharmacol. Toxicol.*, 100: 183-186.
- Power, A., Sheehan, D., 1996.** Seasonal variations in the antioxidant defense systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol., Part C Pharmacol. Toxicol.* 114, 99-103.
- Prakash, N.T., Jagannatha Rao, K.S., 1995.** Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure, *Mol.Cell.Biochem.* 146, 107-113.
- Price, NM et Morel, F. M. M., 1990.** Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom." *Nature* 344(6267): 658-660.
- Radenac, G., Miramand, P., Tardy, J., 1997.** Search for impact a dredged material disposal site on growth and metal contamination of *Mytilus edulis* (L.) in Charente Maritime (France). *Mar. Poll. Bull.* 34:721–729.

Rainbow, P.S., Phillips, D. J. H., Depledge, M., 1990. The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. A need for laboratory investigation of accumulation strategies. *Mar. Pollut. Bull.* 21(7): 321-324.

Rainbow, PS., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: Why and so What? *Environmental Pollution* 120, 497-507.

Ramade, F., 1992. Précis d'écotoxicologie. Paris.

Ramade, F., 2000. Dictionnaire encyclopédique des pollutions. *Edi science International*, Paris.

Ray, S., Watkins, D.N., Misso, A. et Thompson, P.J., 2002, Oxidant stress induces γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in human bronchial epithelial NCI-H292 cells. *Clinical and Experimental Allergy* 32: 571-577.

Ribeyre, F., et Boudou, A., 1989. Trophic chains and experimental ecosystems: study of bioaccumulation and transfer processes. *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies*. A. Boudou et F. Ribeyre, CRC Press, Boca Raton, FL. 1: 3-46.

Ringwood, A.H., Connors, D.E., DiNovo, AA. 1998 a. The effects of copper exposures on cellular responses in oysters. *Mar. Environ. Res.* 46: 591-595.

Ringwood, A.H., Connors, D.E., Hoguet, J., 1998 b. Effects of natural and anthropogenic stressors on lysosomal destabilization in oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 166: 163-171.

Risso-de Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.P., Bailly, B., Rahmani, R., 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquat. Toxicol.*, 53 : 65-76.

Ritz, D.A., Swain, R., et Elliott, N.G., 1982. Use of the mussel *Mytilus edulis planatus* (Lamarck) in monitoring heavy metals in sea water. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 33: 491-506.

RNO (1974-2004). Surveillance du milieu marin. Bulletins annuels édités par l'Ifremer et le Ministère de l'Aménagement du Territoire de l'Environnement.

Rodriguez-Ariza, A., Martinez-Lara, E, Pascual, P., Pedrajas, JR., Abril, N., Dorado, G., Toribio, F., Barcena, JA., Peinado, J., Pueyo, C., et al., 1993. Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Sci. Total. Environ.* (Suppl. Pt 1): 109-116.

Roesijadi, G., Kielland, S. et Klerks, P., 1989. Purification and properties of novel molluscan metallothioneins. *Arch. Biochem. Biophys.* 273 (2): 403-413.

Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals, *Aqua. Toxicol.* 22, 81-114.

Roméo, M., 1991. Toxicologie des métaux traces dans l'environnement marin *Oceanis*, Vol 17, Fasc.4. 383-402.

Romeo, M., Gracia-Barrelli, J.P., Sidoumou, Z., et Nguyen, P.H., 1993. Variation spatio- temporelles des concentrations en métaux traces chez le mollusque *Donax rugosus* de la cote mauritanienne. *Bull. Ecol.*, t. 24 (2-3-4) : 83-86.

Roméo, M., et Gnassia-Barelli, M., 1997. Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the mediterranean clam *Ruditapes decussatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacol, Toxicol and Endocrinol.*, 118: 33-37.

Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M. et Girard, J.P., 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aqua. Toxicol.* 48: 185-194.

Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J.P., 2001. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat Toxicol.* 1; 48(2-3):185-194.

Romeo, M., Horau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M. et Girard, J. P., 2003. "Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean." *Environ. Poll.*, 122(3): 369-378.

Roméo, M., Frasila, C., Gnassia-Barelli, Damiens, G., Micu, D. et Mustata., 2005, Biomonitoring of trace metals in the Black Sea (Romania) using mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Water Res* 39 (4): 596-604.

Ruiz-Pino, D. P., C. Jeandel, J. P., Berthou, et Minster, J.F., 1990. Are the trace metal cycles balanced in the Mediterranean Sea ?" *Global and Planetary Change* 2(3-4): 369-388.

Ruiz-Pino, D. P., C. E. Lambert, C. Jeandel et Buat-Menard, P., 1990. Modelling the biogenic transport of atmospheric particles in the Mediterranean Sea. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 89(1-2): 47-64.

Ruiz-Pino, D. P., E. Nicolas, J. P. Bethoux et C. E. Lambert (1991). Zinc budget in the Mediterranean Sea: A hypothesis for non steady-state behavior. *Mar. Chem.* 33(1-2): 145-169.

Saint-Denis, M., Labrot, F., Narbonne, J.F., Ribera, D., 1998. Glutathione, glutathione-related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Arch. Environ. Cont. Toxicol*; 35(4):602-14.

Sasson-Brickson, G., Burton, G.A Jr., 1991. *In situ* and laboratory sediment toxicity testing with *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10:201-207.

Schafer, F.Q et Buettner, G.R., 2001. Redox environment of the cell as reviewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free. Radic. Biol. Med*, vol, 30 (11), 1191-1212.

Semadi, A. et Deruelle, S., 1993. Lead pollution monitoring by transplanted lichens in Annaba area (Algeria). *Rev. Poll. Atmos.*, 35: 86-102.

Serafim, 2000. In : Mehdaoui, et Feraoui, M., Descoin, C., 2000. Accumulation et biomagnification des insecticides organochlorés dans les mollusques et les poissons de la lagune de Moulay Bouselham, au Maroc Département de phytopharmacie et de médiateurs chimiques, Versailles, France.

Serra, R., Isani, G., Tramontano, G., et Carpena, E., 1999. Seasonal dependence of cadmium accumulation and Cd-binding proteins in *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Com. Biochem et Physiol*, 123C, 165-174.

Shafee, M.S., 1978. Variation in biochemical composition of green mussel *Perna viridis* of Ennore estuary, Madras. *Bulletin of the National Institute of Oceanography, India.* 2: 101-104.

Sheehan, D., Crimmins, K.M., Burnell, G.M., 1991. Evidence for Glutathione S-transferase activity in *Mytilus edulis* as an index of chemical pollution marine estuaries, in : D.W. Jeffrey, B Madden, eds, *Bioindicators and Environmental Management*, Academic Press, Londres, 419-425.

Sidoumou, Z., Gnassia-Barelli, M., Siau Y, Romeo, M., 1999. Etude des métaux lourds chez deux mollusques prélevés sur la cote mauritanienne, *Crassostrea Gigas et Perna perna*. *J. Rech. Océanographique*, 1999, vol. 24,1: 1 –18.

Sies H., Dafré, AL, Ji, Y., Akerboom, TP., 1998. Protein S-thiolation and redox regulation of membrane-bound glutathione transferase. *Chem. Biol. Interact.* 24; 111-112:177-85.

Sies, H., 1991. Oxidative stress: introduction in oxidative stress, oxidants and antioxidants, Sies H. (ed.) Academic Press Publisher, London, San Diego.

Siewicki, T.C., Sydlowski, J.S et Webb, E.S., 1983. The nature of cadmium binding in commercial Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Arch. Environ. Con. Toxicol.* 12: 299-304

Sifi, K., Chouahda, S., Soltani, N., 2005. Surveillance de la qualité des eaux du golfe d'Annaba:Analyse de biomarqueurs chez un mollusque bivalve *Donax trunculus*.In : Sixième Congrès des Sciences de la Mer Monastir Tunisie.

Silverstre F., 2005. Réponses à un stress environnemental induit par le cadmium chez un crustacé euryhalin, *Eriocheir sinensis*. Approche intégrative incluant une analyse du protéome. Thèse de Doctorat. Presses universitaires de Namur et Frederik Silverstre

Simkiss, K et Taylor, M.G, 1995. Transport of metal across membranes,in metal speciation and bioavailability in aquatic systems, Teissier et Turner (Eds), Oxford,UK, 1-44.

Simpson, R. D., 1979. Uptake and loss of zinc and lead by mussels (*Mytilus edulis*) and relationship with body weight and reproductive cycle. *Mar. Pollu. Bull.* 10: 74-78.

Smaal, A.C., Wagenvoort, A., Hemelraad, J., Akkerman, I., 1991. Response to stress of mussels (*Mytilus edulis*) exposed in Dutch tidal waters. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 197–200.

Sloof, W., Van Oers, J.A.M et De Zwart, D., 1986. Margins of incertainly in ecotoxicological hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 5,841-852.

Sokolova, T., Gutterer, JM., Hirrlinger, J., Hamprecht, B., Dringen, R., 2001. Catalase in astroglia-rich primary cultures from rat brain: immunocytochemical localization and inactivation during the disposal of hydrogen peroxide. *Neurosci Lett.* 12;297(2):129-32.

Sokolova, I.M., Sokolova, E.P et Ponnappa, K. M., 2005. Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aqua. Toxicol.*, 73 : 242-255.

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

Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., 2000. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 19, 201-213.

Sunderman, F.W.J., 1987. Lipid peroxidation as a mechanism of acute nickel toxicity. *Environ Toxicol. Chem.*, 15, 59 -64.

Tahiri, L., Bennasser, L., Idrissi, L., Fekhaoui, M., El Abidi, A et Mouradi, A., 2005. Metal Contamination of *Mytilus galloprovincialis* and Sediments in the Bouregreg Estuary (Morocco). *Water Qual. Res. J. Canada*, Volume 40, No. 1, 111–119.

Tanguy, A., Boutet, I., Riso, R., Boudry, P., Auffret, M., Moraga, D., 2003. Metallothionein genes in the European flat oyster *Ostrea edulis*: a potential ecological tool for environmental monitoring? *Mar. Ecol. Prog.*, 257: 87-97.

Tawfiq, G., 2008. Annaba, Terres agricoles: La pollution menace. Journal : *El watan*.

Tessier, L., Couillard, Y., Campbell, PGC et Auclair, JC., 1993. Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve \$QDGRQWD_JUDQGLV_LPQRO_2FHDQRJU\$, 38: 1-17.

Tocher, DR et Harvie, DG., 1988. Fatty acid composition of the major phosphoglycerides from fish natural tissues; (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and cod (*Gadus morhua*) brains and retinas. *Fish Physiology and Biochemistry*, 5: 229-39.

Torres, M.A., Testa, C.P., Gaspari, C., Masutti, M.B., Panitz, C.M.N., Curi-Pedrosa, R., Almeida, E.A., Di Mascio, P., Wilhelm-Filho, D., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island. *Braz. Mar. Poll. Bull.* 44 : 923-932.

Tran, D., Boudou, A. et Massabuau, J., 2001. How water oxygenation level influences cadmium accumulation pattern in the asiatic clam corbicula fluminea: a laboratory and field study. *Environ toxicol. Chem.*, 20: 2073-2080.

Tran, D., Boudou, A et Massabuau, J., 2002. Relationship between feeding-induced ventilatory activity and bioaccumulation of dissolved and algal-bound cadmium in the asiatic clam Corbicula fluminea. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21: 327-333.

Tran, D., Fournier, E., Durrieu, G. et Massabuau, J. C., 2004b. Copper detection in the Asiatic clam Corbicula fluminea: optimum valve closure response. *Aqua. Toxicol.*, 66(3): 333-43.

Tremoloda, P., Frinizio, A., Villa, S., Gaggi, C., et Vighi, M. , 2004. Quantitative inter-specific chemical activity relationships of pesticides in the aquatic environment. *Aqua. Toxicol.*, 67 ,87-103.

Trigui el Menief, N., 1995. La palourde *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) des côtes tunisiennes. Biométrie, reproduction et impact de l'environnement sur la bioaccumulation en métaux traces. Thèse *Doct. Fac. Sci. Tunis*: 261 p.

Tusseau-Vuillemin, M.H., Gilbin, R., Bakkaus, E., et Garric, J., 2004. Performance of diffusive Gradient in Thin Films in evaluating the toxic fraction of copper to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(9), 2154 –2161.

Urrutia, MB., Ibarrola, I., Eglisias, JIP et Navarro, E., 1999. Energetics of growth and reproduction in a high-tidal population of the clam *Ruditapes decussatus* from Urdabai Estuary (Basque Country, N. Spain). *Journal of Sea Research*, 42: 35-48.

Usero, J., Morillo, J., Gracia, I., 2005. Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain. *Chemosphere* 59: 1175-1181.

Utting, SD., 1986. A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae and spat in relation to dietary protein. *Aquaculture*, 56: 123-138.

Vaal, M., Van der Wal, J.T., Hoekstra, J et Hermens, J., 1997a. Variation in the sensitivity of aquatic species in relation to the classification of environmental pollutants, chemosphere, 35: 1311-1327.

Vaissière, R et Fredj, G., 1963. Contribution à l'étude de la faune benthique du plateau continental de l'Algérie. *Bull. Inst. Oceanog.* Monaco. 60 (1272): 83.

Van der Oost, R., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): II. Biomarkers: pollution induced biochemical responses. *Aqua Toxicol*, 36: 189-222.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 13: 57-149.

Van Gestel, C.A.M., Van Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 5: 217-225.

Veith, G.D., Defoe, DL., et Bergstedt, BJ., 1979. Measuring and estimating the bioconcentration factor of chemicals in fish. *J. Fish. Res. Bd. Can*, 36: 1040-1048.

Veldhuizen-Tsoerkan, M.B., Holwerda, D.A., Zandee, D.I., 1991. Anoxic survival time and metabolic parameters as stress indices in sea mussels exposed to cadmium or polychlorinated biphenyls. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 259-265.

Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *C.R.C. Reviews in Aquatic Sciences* 1: 295-317.

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

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991. Seasonal variations in the antioxidant defense enzymes and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol. Part C. Pharmacol. Toxicol.*, 100: 187-190.

Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 104: 355-372.

Viarengo, A., Mancinelli, G., Pertica, M., Fabri, R. et Orunesu, M., 1993. Effects of heavy metals on the Ca²⁺ ATPase activity present in gill cellule plasma membrane of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Comp. Biochem. Physiol* 106C: 655-660.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Mancinelli, G., Accomando, R., Smaal, A.C., Orunesu, M., 1995. Stress on stress response: a simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Mar. Environ. Res.* 39: 245-248.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Mancinelli, G., Accamando, R., Smaal, A.C., Orunesu, M., 1999. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 39: 245-248.

Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol*, (46) 2: 407-417.

Vidal, M.L., Bassères, A., Narbonne, J.F., 2002b. Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Muller). *Comparative Biochemistry and Physiology PartC: Toxicol. Pharmacol.*, 131: 133-151.

Wang, W et Ballatori, N., 1998. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharm. Rev*, vol 50 (3): 335-355.

Weckbecker, G., Cory, J.G., 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukaemia.L1210 cells in vitro, *Cancer Let.*, 40: 257-264.

Whyte, J.N.C., Bourne, N., Hodgson, C.A., 1990. Nutritional condition of rock scallop, *Crassadoma gigantean* (Gray), Larvae fed mixed algal diets. *Aquaculture*, 86: 25-40.

Wilhelm-Filho, D.W., Tribess, T., Ga'spari, C., Claudio, F.D., Torres, M.A., Magalhaes, A.R.M., 2001. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture* 203: 149–158.

Winston, G.W., Livingston, D.R., Lips, F., 1990. Oxygen reduction metabolism by the digestive gland of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Journal of Experimental Zoology* 255,296-308.

Winston, G.W., et Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19: 137-161.

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.

Winterbourn, C.C., et Munday, R., 1990. Concerted action of reduced glutathione and superoxide dismutase in preventing redox cycling of dihydroxypyrimidines, and their role in antioxidant defense. *Free Radic Res Commun.*;8(4-6): 287-93.

X., 2000. MINITAB version 13.31 pour windows, logiciel d'analyse statistique- version 13.31.

Yan, T., Teo, L.H., et Sin, Y.M., 1997. Effects of mercury and lead on tissue glutathione of the green mussel, *Perna viridis* L. *Bull. Environ. Contam.Toxicol.*, 58: 845-850.

ANNEXES

Les paramètres physico chimique enregistrés dans le golfe d'Annaba (2006)

Tableau VII : Variation saisonnière de la Température dans les eaux du golfe d'Annaba

Température °C					
Sites	PO	PE	BD	SB	EH
Printemps	22	22,5	22,5	20	21
Eté	27	28	26	27	26
Automne	17	18	15	14	20
Hiver 06	15	15	14,5	15	16
Hiver 07	15	15	14,5	10,8	15

Tableau VIII : Variation saisonnière de la salinité dans les eaux du golfe d'Annaba

Salinité psu					
Sites	PO	PE	BD	SB	EH
Printemps	37,5	36,4	28,1	25,88	37
Eté	37,3	36,4	37,4	37,9	37
Automne	36,7	36,4	36,1	33,6	36,2
Hiver 06	36,5	36,4	35,1	11,8	37
Hiver 07	36,5	36,4	36,1	10,8	36,2

Résultats de l'étude statistique et les corrélations reliant les différents paramètres métriques de la coquille

Corrélations : longueur; largeur; hauteur

Contenu de la cellule : corrélation de Pearson

1) Corrélation entre la longueur avec la largeur et la hauteur de la coquille

Largeur	0,857	
	Valeur de p	0,000
Hauteur	0,833	0,798
	Valeur de p	0,000

Corrélations : Poids (gr) avec la longueur de la coquille (mm)

Corrélation de Pearson de Poids gr et long cm = 0,811
Valeur de p = 0,000

Concentrations en métaux au niveau des sites aux différentes saisons

Tableau. XI: Concentrations en métaux ($\mu\text{g/g}$) chez les moules des deux sexes prélevées en Hiver. Les valeurs médianes trouvées sur l'ensemble des côtes de France par l'IFREMER pour les moules *Mytilus* sp. sont : **0,62 $\mu\text{g/g}$ pour le cadmium ; 6,3 $\mu\text{g/g}$ pour le cuivre ; 114 $\mu\text{g/g}$ pour le zinc**

Site/ hiver	Poids	Cadmium	Cuivre	Zinc
Site EH n = 15	0.64 \pm 0.14	0.50 \pm 0.24	3.7 \pm 0.4	185 \pm 57
Mâles n = 8	0.71 \pm 0.19	0.43 \pm 0.27	3.6 \pm 0.4	162 \pm 54
Femelles n = 7	0.56 \pm 0.14	0.57 \pm 0.19	3.8 \pm 0.4	211 \pm 54
Site PO n = 15	0.75 \pm 0.19	0.36 \pm 0.16	3.9 \pm 0.7	155 \pm 53
Mâles n = 8	0.78 \pm 0.13	0.38 \pm 0.14	3.7 \pm 0.8	148 \pm 60
Femelles n = 7	0.73 \pm 0.06	0.36 \pm 0.23	4.2 \pm 0.4	164 \pm 50
Site PE n = 11	0.46 \pm 0.08	0.66 \pm 0.10	5.0 \pm 0.9	182 \pm 45
Mâles n = 4	0.45 \pm 0.14	0.61 \pm 0.17	4.9 \pm 0.5	177 \pm 44
Femelles n = 7	0.47 \pm 0.03	0.69 \pm 0.06	5.0 \pm 1.1	185 \pm 48
Site BD n = 10	0.49 \pm 0.10	1.30 \pm 0.55	4.6 \pm 0.8	178 \pm 36
Mâles n = 5	0.50 \pm 0.14	1.46 \pm 0.62	5.2 \pm 0.6	186 \pm 42
Femelles n = 5	0.49 \pm 0.09	1.17 \pm 0.52	4.2 \pm 0.6	172 \pm 34
Site SB n = 9	0.46 \pm 0.11	0.76 \pm 0.23	5.0 \pm 0.6	157 \pm 50
Mâles n = 4	0.45 \pm 0.14	0.76 \pm 0.10	4.8 \pm 0.5	137 \pm 30
Femelles n = 5	0.47 \pm 0.01	0.75	5.4 \pm 0.7	205 \pm 68

Tableau XII : Concentrations en métaux ($\mu\text{g/g}$) chez les moules prélevées en été

Sites / Eté	Cd $\mu\text{g/g p.s}$	Cu $\mu\text{g/g p.s}$	Zn $\mu\text{g/g p.s}$
Site EH n = 5	0,39 \pm 0,12	6,69 \pm 0,56	156,6 \pm 25,03
Site PO n = 5	0,50 \pm 0,12	8,15 \pm 1,5	80,74 \pm 33,21
Site PE n = 5	0,35 \pm 0,05	7,48 \pm 1,41	114,66 \pm 25,61
Site BD n = 5	1,12 \pm 0,22	7,98 \pm 0,60	126,24 \pm 17,66
Site SB n = 5	0,64 \pm 0,15	6,77 \pm 2,89	89,66 \pm 24,53

Tableau. XIII : Concentrations en métaux ($\mu\text{g/g}$) chez les moules prélevées au printemps

Sites /printemps	Cd $\mu\text{g/g p.s}$	Cu $\mu\text{g/g p.s}$	Zn $\mu\text{g/g p.s}$
Site EH n = 10	0,60 \pm 0,20	4,14 \pm 0,49	133,06 \pm 43,84
Site PO n = 10	0,26 \pm 0,04	5,90 \pm 1,18	150,21 \pm 68,50
Site PE n = 10	0,97 \pm 0,43	6,18 \pm 1,55	103,77 \pm 15,97
Site BD n = 10	0,86 \pm 0,28	8,60 \pm 0,83	159,38 \pm 37,01
Site SB n = 10	0,54 \pm 0,21	5,21 \pm 0,35	90,46 \pm 20,11

Tableau. XIV : Concentrations en métaux ($\mu\text{g/g}$) chez les moules prélevées à l'automne

Sites /automne	Cd $\mu\text{g/g p.s}$	Cu $\mu\text{g/g p.s}$	Zn $\mu\text{g/g p.s}$
Site EH n = 9	0,47 \pm 0,15	3,70 \pm 0,63	196 \pm 27
Site PO n = 9	0,54 \pm 0,10	3,60 \pm 1,30	147 \pm 34
Site PE n = 10	0,67 \pm 0,08	4,58 \pm 0,94	107 \pm 41
Site BD n = 10	0,80 \pm 0,21	6,10 \pm 0,90	122 \pm 52
Site SB n = 10	0,79 \pm 0,30	6,33 \pm 1,21	159 \pm 44

Tableau. XV : Activités GST en nmoles/min/mg de protéines dans les branchies (Br) et les glandes digestives (GD) de *Perna perna* aux différentes saisons

GST						MAX	MIN
Eté	PO	PE	BD	SB	EH		
Br	157,12	124,69	164,1	203,05	134,53	203,05	124,69
GD	139,59	110,1	143,29	162,79	136,33	162,79	110,1
Hiver	PO	PE	BD	SB	EH		
Br	141,55	143,69	165,75	207,5	163,88	207,5	141,55
GD	139,6	140,31	148,31	181	141,59	181	139,6
Automne	PO	PE	BD	SB	EH		
Br	129,63	178,37	104,82	167,76	111,76	178,37	104,82
GD	100,72	113,77	106,61	147,8	133,76	147,8	100,72
Printemps	PO	PE	BD	SB	EH		
Br	130,48	152,69	157,69	148,47	119,4	157,69	119,4
GD	134,14	158,72	151,54	165,79	127,6	165,79	127,6

Tableau. XVI : Teneurs en GSH en nmoles/mg de protéines dans les branchies (Br) et les glandes digestives (GD) de *Perna perna* aux différentes saisons

GSH						MAX	MIN
Hiver	PO	PE	BD	SB	EH		
Br	102	112,95	129,38	142,61	154,13	154,13	102/ 112
GD	104	107,22	120,75	139,63	149,96	149,96	104/107
Pintemps	PO	PE	BD	SB	EH		
Br	152,06	150,01	153,99	146,25	157,95	157,95	
GD	151,28	148,68	141,38	144,4	149,3	151,28	141
Automne	PO	PE	BD	SB	EH		
Br	147,91	146,58	135,12	140,92	147,97	147,97	135
GD	155,68	154,45	149,98	152,07	159,25	159,25	
Eté	PO	PE	BD	SB	EH		
Br	167,18	163,68	147,91	145,99	157,32	167,18	
GD	170	159,21	155,58	150,96	159,52	170	

Analyse statistiques des biomarqueurs *in vivo*

Expérience en Été

Cuivre

- ANOVA à un facteur contrôlé : GSH / en fonction de [Cu]

Analyse de variance pour GSH /Cu désempilées

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	3	45194	15065	41,27	0,000
Erreur	16	5840	365		
Total	19	51034			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
1	5	200,14	32,50	(---*---)
2	5	155,04	11,88	(---*---)
3	5	114,74	15,68	(---*---)
4	5	71,92	4,12	(--*---)

Ecart-type groupé = 19,11

100 150 200

Corrélations : GSH / [Cu]

Corrélation de Pearson = -0,941

Valeur de p = 0,000

- ANOVA à un facteur contrôlé : GSH/ du Témoin en fonction de [10µg/l]

Analyse de variance pour GSH /Cu

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	1	5094	5094	8,51	0,019
Erreur	8	4789	599		
Total	9	9883			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
1	5	200,18	32,50	(-----*-----)
2	5	155,04	11,88	(-----*-----)

Ecart-type groupé = 24,47

150 180 210

- ANOVA à un facteur contrôlé : GSH de [15µg Cu/l] en fonction de [25µg Cu/l]

Analyse de variance pour C4

Source	DL	SC	CM	F	P
C5	1	4584	4584	34,88	0,000
Erreur	8	1051	131		
Total	9	5635			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
3	5	114,74	15,68	(-----*-----)
4	5	71,92	4,12	(-----*-----)

Ecart-type groupé = 11,46

80 100 120

- ANOVA à un facteur contrôlé : GSH de [10µg Cu/l] en fonction de [15µg Cu/l]

Analyse de variance					
Source	DL	SC	CM	F	P
C5	1	4060	4060	20,98	0,002
Erreur	8	1548	194		
Total	9	5608			

IC individuel à 95% pour la moyenne Basé sur Ecart-type groupé			
Niveau	N	Moyenne	EcartType
2	5	155,04	11,88
3	5	114,74	15,68

Ecart-type groupé = 13,91

- ANOVA à un facteur contrôlé : GST / en fonction de [Cu]

Analyse de variance pour GST/Cu désempilées					
Source	DL	SC	CM	F	P
C2	3	5871	1957	5,85	0,007
Erreur	16	5350	334		
Total	19	11221			

IC individuel à 95% pour la moyenne Basé sur Ecart-type groupé			
Niveau	N	Moyenne	EcartType
1	5	155,18	23,34
2	5	174,59	20,99
3	5	189,36	13,99
4	5	145,08	12,49

Ecart-type groupé = 18,29

- ANOVA à un facteur contrôlé : GST/ du Témoin en fonction de [10µg/l]

Analyse de variance pour GST/Cu					
Source	DL	SC	CM	F	P
C2	1	942	942	1,91	0,204
Erreur	8	3942	493		
Total	9	4884			

IC individuel à 95% pour la moyenne Basé sur Ecart-type groupé			
Niveau	N	Moyenne	EcartType
1	5	155,18	23,34
2	5	174,59	20,99

Ecart-type groupé = 22,20

- ANOVA à un facteur contrôlé : GST de [15µg Cu/l] en fonction de [25µg Cu/l]

Analyse de variance pour C4					
Source	DL	SC	CM	F	P
C5	1	4902	4902	27,86	0,001
Erreur	8	1408	176		
Total	9	6310			

IC individuel à 95% pour la moyenne Basé sur Ecart-type groupé			
Niveau	N	Moyenne	EcartType
3	5	189,36	13,99
4	5	145,08	12,49

Ecart-type groupé = 13,27

	140	160	180	200

• ANOVA à un facteur contrôlé : GST de [10µg Cu/l] en fonction de [15µg Cu/l]

Analyse de variance pour C4

Source	DL	SC	CM	F	P
C5	1	546	546	1,71	0,227
Erreur	8	2546	318		
Total	9	3092			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
2	5	174,59	20,99	(-----*-----)
3	5	189,36	13,99	(-----*-----)

Ecart-type groupé = 17,84

	165	180	195	210

Cadmium

• ANOVA à un facteur contrôlé : GSH / en fonction de [Cd]

Analyse de variance pour GSH/Cd désempilées

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	3	67771	22590	41,59	0,000
Erreur	16	8690	543		
Total	19	76461			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
1	5	250,74	7,83	(---*---)
2	5	210,56	26,64	(---*---)
3	5	167,24	33,60	(---*---)
4	5	93,66	16,51	(---*---)

Ecart-type groupé = 23,30

	120	180	240

Corrélations : GSH/Cd;

Corrélation de Pearson de GSH/ et Cd = -0,930

Valeur de p = 0,000

• ANOVA à un facteur contrôlé : GSH/ du Témoin en fonction de [50µg/l]

Analyse de variance pour GSH/Cd

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	1	4036	4036	10,47	0,012
Erreur	8	3084	386		
Total	9	7120			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
1	5	250,74	7,83	(-----*-----)
2	5	210,56	26,64	(-----*-----)

Ecart-type groupé = 19,64

	200	225	250	275

• ANOVA à un facteur contrôlé : GSH de [100µg Cd/l] en fonction de [200µg Cd/l]

Analyse de variance					
Source	DL	SC	CM	F	P
C5	1	13535	13535	19,32	0,002
Erreur	8	5606	701		
Total	9	19141			

IC individuel à 95% pour la moyenne Basé sur Ecart-type groupé			
Niveau	N	Moyenne	EcartType
3	5	167,24	33,60
4	5	93,66	16,51

Ecart-type groupé =	26,47	70	105	140	175
---------------------	-------	----	-----	-----	-----

• ANOVA à un facteur contrôlé : GSH de [50µg Cd/l] en fonction de [100µg Cd/l]

Analyse de variance					
Source	DL	SC	CM	F	P
C5	1	4692	4692	5,10	0,054
Erreur	8	7354	919		
Total	9	12046			

IC individuel à 95% pour la moyenne Basé sur Ecart-type groupé			
Niveau	N	Moyenne	EcartType
2	5	210,56	26,64
3	5	167,24	33,60

Ecart-type groupé =	30,32	150	180	210	240
---------------------	-------	-----	-----	-----	-----

• ANOVA à un facteur contrôlé : GST / en fonction de [Cd]

Analyse de variance pour GST/Cd désampilées					
Source	DL	SC	CM	F	P
C2	3	8068	2689	3,13	0,055
Erreur	16	13747	859		
Total	19	21814			

IC individuel à 95% pour la moyenne Basé sur Ecart-type groupé			
Niveau	N	Moyenne	EcartType
1	5	182,23	27,39
2	5	190,98	12,13
3	5	217,68	45,72
4	5	232,20	21,20

Ecart-type groupé =	29,31	180	210	240
---------------------	-------	-----	-----	-----

• ANOVA à un facteur contrôlé : GST/ du Témoin en fonction de [50µg/l]

Analyse de variance pour GST/Cd					
Source	DL	SC	CM	F	P
C2	1	191	191	0,43	0,532
Erreur	8	3589	449		
Total	9	3780			

IC individuel à 95% pour la moyenne Basé sur Ecart-type groupé			
Niveau	N	Moyenne	EcartType
1	5	182,23	27,39
2	5	190,98	12,13

Ecart-type groupé =	21,18	165	180	195	210
---------------------	-------	-----	-----	-----	-----

- ANOVA à un facteur contrôlé : GST de [100µg Cd/l] en fonction de [200µg Cd/l]

Analyse de variance pour C4

Source	DL	SC	CM	F	P
C5	1	527	527	0,42	0,537
Erreur	8	10158	1270		
Total	9	10685			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
3	5	217,68	45,72	(-----+-----+-----+-----+-----)
4	5	232,20	21,20	(-----*-----)
				(-----*-----)
				(-----+-----+-----+-----+-----)

Ecart-type groupé = 35,63

200 225 250

- ANOVA à un facteur contrôlé : GST de [50µg Cd/l] en fonction de [100µg Cd/l]

Analyse de variance pour GST/Cd

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	1	1782	1782	1,59	0,242
Erreur	8	8949	1119		
Total	9	10732			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
2	5	190,98	12,13	(-----+-----+-----+-----+-----)
3	5	217,68	45,72	(-----*-----)
				(-----*-----)
				(-----+-----+-----+-----+-----)

Ecart-type groupé = 33,45

180 210 240

- ANOVA à un facteur contrôlé : GST/ du Témoin en fonction de [200µg/l]

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	1	6244	6244	10,41	0,012
Erreur	8	4798	600		
Total	9	11041			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
1	5	182,23	27,39	(-----+-----+-----+-----+-----)
4	5	232,20	21,20	(-----*-----)
				(-----*-----)
				(-----+-----+-----+-----+-----)

Ecart-type groupé = 24,49

180 210 240

Expérience en Hiver

Cadmium

- ANOVA à un facteur contrôlé : GST / en fonction de [Cd]

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	3	9032,5	3010,8	97,64	0,000
Erreur	16	493,4	30,8		
Total	19	9525,8			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
1	5	91,88	6,97	(--*--)
2	5	109,09	5,10	(--*--)
3	5	127,50	4,98	(--*--)
4	5	149,01	4,90	(--*--)
Ecart-type groupé = 5,55				100 120 140

Corrélations : GST et [Cd]

Corrélation de Pearson de C1 et C2 = 0,972

Valeur de p = 0,000

- ANOVA à un facteur contrôlé : GST du Témoin en fonction de [50µg Cd/l]

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	1	741,2	741,2	19,89	0,002
Erreur	8	298,1	37,3		
Total	9	1039,2			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
1	5	91,88	6,97	(-----*-----)
2	5	109,09	5,10	(-----*-----)
Ecart-type groupé = 6,10				90 100 110 120

- ANOVA à un facteur contrôlé : GST de [100µg Cd/l] en fonction de [200µg Cd/l]

Analyse de variance pour C4

Source	DL	SC	CM	F	P
C5	1	1156,6	1156,6	47,38	0,000
Erreur	8	195,3	24,4		
Total	9	1351,9			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
3	5	127,50	4,98	(-----*-----)
4	5	149,01	4,90	(-----*-----)
Ecart-type groupé = 4,94				130 140 150

- ANOVA à un facteur contrôlé : GST de [50µg Cd/l] en fonction de [100µg Cd/l]

Analyse de variance pour GST

Source	DL	SC	CM	F	P
[Cd]	1	847,4	847,4	33,35	0,001
Erreur	8	203,3	25,4		
Total	9	1050,7			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
2	5	109,09	5,10	(-----*-----)
3	5	127,50	4,98	(-----*-----)
Ecart-type groupé =				5,04 104,0 112,0 120,0 128,0

- ANOVA à un facteur contrôlé : GSH / en fonction de [Cd]

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	4	6465,1	1616,3	35,89	0,000
Erreur	15	675,5	45,0		
Total	19	7140,5			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
1	4	82,825	6,794	(--*---)
2	4	66,275	8,289	(--*---)
3	4	53,175	9,808	(---*--)
4	4	38,875	2,516	(--*---)
5	4	33,750	2,789	(---*--)
Ecart-type groupé =				6,711 40 60 80

Corrélations : GSH/Cd;

Corrélation de Pearson de C1 et C2 = -0,940
Valeur de p = 0,000

- ANOVA à un facteur contrôlé : GSH/ du Témoin en fonction de [50µgCd/l]

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	1	966,3	966,3	31,96	0,001
Erreur	8	241,8	30,2		
Total	9	1208,1			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
1	5	81,620	6,471	(-----*-----)
2	5	61,960	4,311	(-----*-----)
Ecart-type groupé =				5,498 60 70 80 90

- ANOVA à un facteur contrôlé : GSH de [100µg Cd/l] en fonction de [200µg Cd/l]

Analyse de variance pour C4

Source	DL	SC	CM	F	P
C5	1	137,6	137,6	7,69	0,024
Erreur	8	143,2	17,9		
Total	9	280,9			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
3	5	41,880	5,240	(-----*-----)
4	5	34,460	2,890	(-----*-----)

Ecart-type groupé = 4,231 35,0 40,0 45,0

- ANOVA à un facteur contrôlé : GSH de [50µg Cd/l] en fonction de [100µg Cd/l]

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	1	1008,0	1008,0	43,79	0,001
Erreur	8	184,2	23,0		
Total	9	1192,2			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
2	5	61,960	4,311	(-----*-----)
3	5	41,880	5,240	(-----*-----)

Ecart-type groupé = 4,798 40 50 60 70

- ANOVA à un facteur contrôlé : GSH de Témoin en fonction de [200µg Cd/l]

Analyse de variance pour C8

Source	DL	SC	CM	F	P
C9	1	5560,2	5560,2	221,39	0,000
Erreur	8	200,9	25,1		
Total	9	5761,1			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
1	5	81,620	6,471	(---*---)
4	5	34,460	2,890	(---*---)

Ecart-type groupé = 5,011 32 48 64 80

- ANOVA à un facteur contrôlé : GSH en fonction de GST / [Cd]

Analyse de variance déséquilibrées

Source	DL	SC	CM	F	P
Facteur	2	848157	424079	41,89	0,000
Erreur	57	576978	10122		
Total	59	1425135			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
GST	20	119,4	22,4	(---*---)
GSH	20	292,0	172,8	(---*---)
C3	20	2,5	1,1	(---*---)

Ecart-type groupé = 100,6 0 120 240 360

Corrélations : GST; GSH

Corrélation de Pearson de GST et GSH = -0,818
Valeur de p = 0,000

Analyse de la Variance pour les Métaux au niveau des stations/ automne

Oneway Analysis of Cadmium by Column1

Analysis of Variance

Source	DF	Sum Squares	Mean Square	F Ratio	Prob >F
Column1	4	0,4342521	0,108563	3,1525	0,0366
Error	20	0,6887490	0,034437		
C.Total	24	1,1230011			

Level	Number	Mean	Sld Error	Lower 95%	<i>t</i>	Alpha
PO	5	0,539329	0,08299	0,36621	2,08596	0,05
PE	5	0,668405	0,08299	0,49529		
BD	5	0,800369	0,08299	0,62725		
SB	5	0,792954	0,08299	0,61984		
EH	5	0,472990	0,08299	0,29987		

Oneway Analysis of Copper by Column 1

Analysis of Variance

Source	DF	Sum Squares	Mean Square	F Ratio	Prob >F
Column1	4	33,540755	8,38519	8,1412	0,0005
Error	20	20,599459	1,02997		
C.Total	24	54,140214			

Level	Number	Mean	Sld Error	Lower 95%	<i>t</i>	Alpha
PO	5	3,60205	0,45387	2,6553	2,08596	0,05
PE	5	4,58141	0,45387	3,6347		
BD	5	6,10235	0,45387	5,1556		
SB	5	6,32729	0,45387	5,3805		

EH	5	3,69736	0,45387	2,7506		
-----------	----------	----------------	----------------	---------------	--	--

Oneway Analysis of Zinc by Column1

Analysis of Variance

Source	DF	Sum Squares	Mean Square	F Ratio	Prob >F
Column1	4	20955,335	5238,83	3,0881	0,0407
Error	20	32232,401	1696,44		
C.Total	24	53187,736			

Level	Number	Mean	Sld Error	Lower 95%	t	Alpha
PO	5	146,945	18,420	108,39	2,09302	0,05
PE	5	107,341	18,420	68,79		
BD	5	122,759	18,420	84,21		
SB	5	158,800	18,420	120,25		
EH	5	196,067	20,420	152,96		

05/04/2009 20:32:10

Bienvenue dans Minitab, appuyez sur F1 pour obtenir l'aide.

ANOVA à un facteur contrôlé : La saison/ Variation de [Cd] en fonction des saisons

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	3	52,70	17,57	6,43	0,000
Erreur	138	376,97	2,73		
Total	141	429,67			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
1	35	2,054	3,274	(-----*-----)
2	25	0,655	0,216	(-----*-----)
3	55	0,681	0,422	(-----*-----)
4	27	0,560	0,269	(-----*-----)
Ecart-type groupé = 1,653				0,00 0,80 1,60 2,40

ANOVA à un facteur contrôlé : la SAISON/ Variation de [Cu] en fonction des saisons

Analyse de variance pour C1

Source	DL	SC	CM	F	P
C2	3	187,63	62,54	29,41	0,000
Erreur	145	308,36	2,13		
Total	148	495,99			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
1	36	7,139	1,896	(---*---)
2	35	5,926	1,625	(---*---)
3	25	4,862	1,502	(---*---)
4	53	4,314	0,862	(--*--)
Ecart-type groupé = 1,458				4,8 6,0 7,2

ANOVA à un facteur contrôlé : LA SAISON/ Variation de [Zn] en fonction des saisons ANOVA à un facteur contrôlé : C1 en fonction de C2

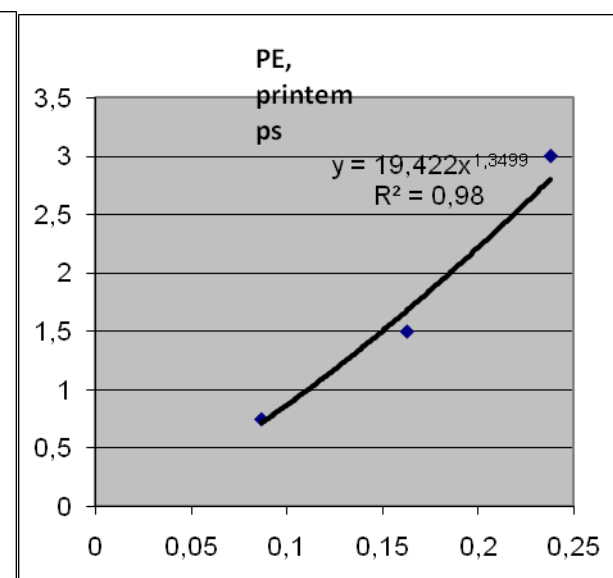
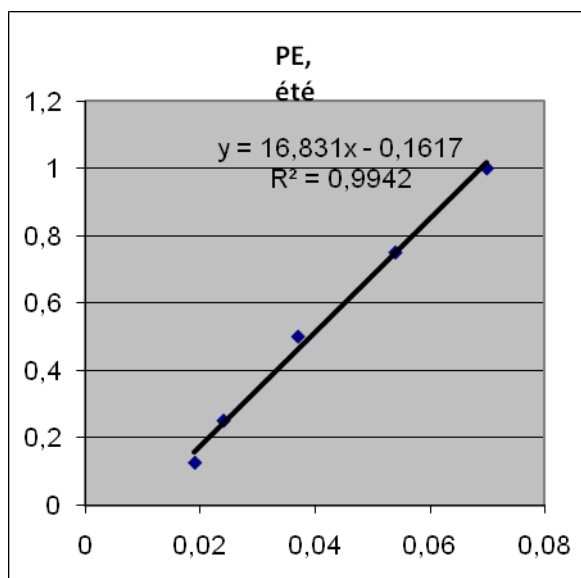
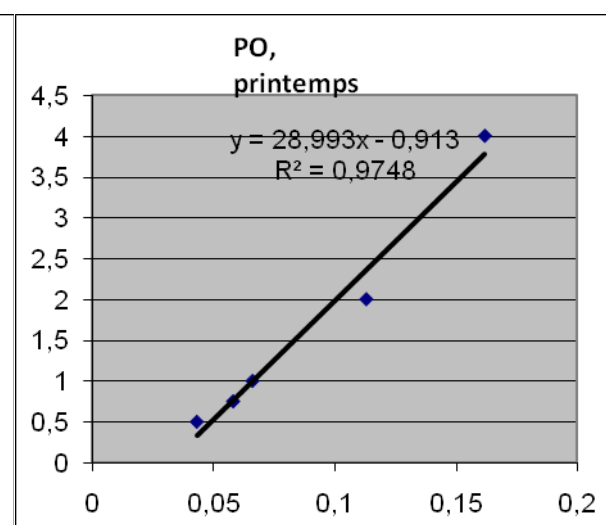
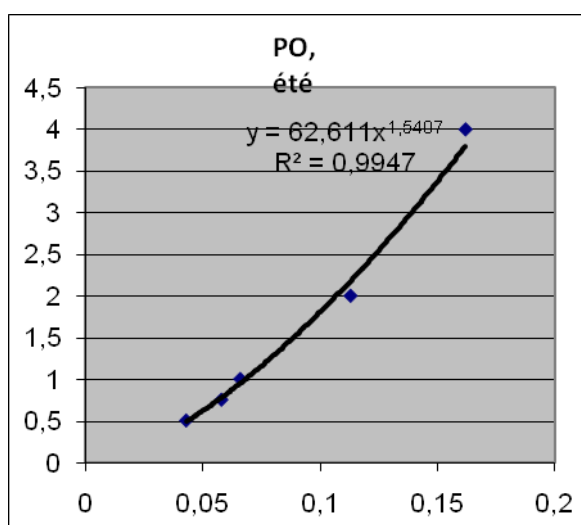
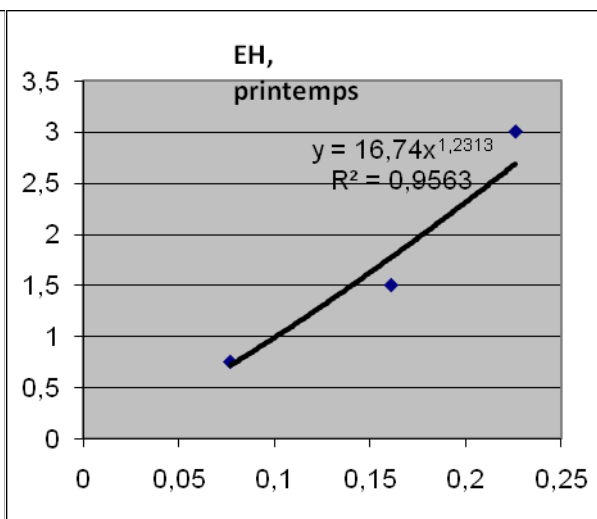
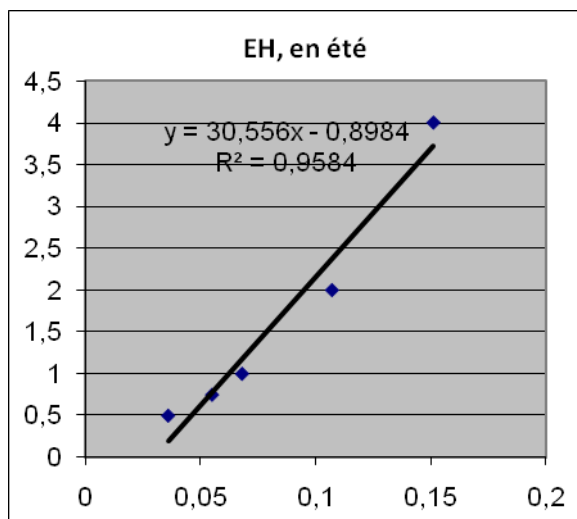
Analyse de variance pour C1

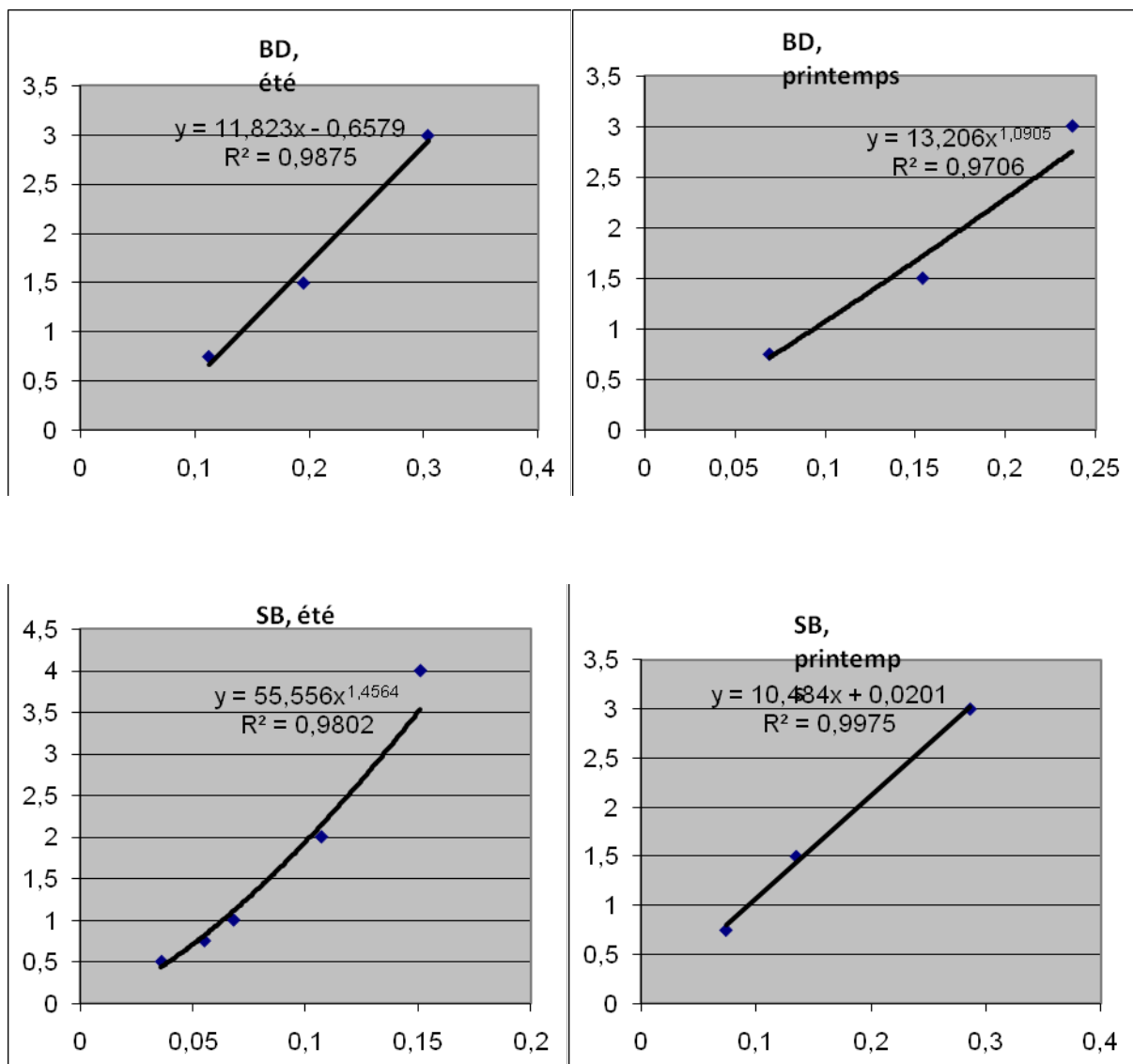
Source	DL	SC	CM	F	P
C2	3	104096	34699	16,81	0,000
Erreur	150	309669	2064		
Total	153	413765			

IC individuel à 95% pour la moyenne
Basé sur Ecart-type groupé

Niveau	N	Moyenne	EcartType	
1	52	171,69	51,37	(-----*-----)
2	24	144,31	48,09	(-----*-----)
3	44	107,92	36,80	(-----*-----)
4	34	126,45	43,92	(-----*-----)
Ecart-type groupé = 45,44				100 125 150 175

Variation des concentrations en métaux (par ordre vertical : Cu, Cd, Zn) et les différences entre stations en Hiver à droite et à l'automne à gauche





Différentes droites de régressions des métaux au cours des saisons et les coefficients de corrélation pour chaque site de l'étude

RESUME :

L'objectif principal de cette recherche était de contribuer à compléter les données sur la pollution marine des zones côtières de la baie d'Annaba. La présence de métaux lourds rend, importante l'analyse des métaux dans les tissus de la moule *Perna perna* prise en tant que modèle ayant un potentiel utilisable en biosurveillance de l'environnement.

Les données, obtenues à partir des mesures de la taille de la coquille des bivalves récoltées au cours de différentes saisons, nous ont permis de constater que les paramètres biométriques étaient très différents d'un site à un autre, Des relations allométriques significatives ont été mises en évidence pour tous les paramètres linéaires et pondéraux mesurés sur l'ensemble des mollusques des sites de l'étude. La croissance étant de type allometrie minorante.

L'évaluation de l'indice de condition, indique malgré les fluctuations saisonnières constatées que *Perna perna* présente un bon état physiologique ; excepté au niveau des moules collectées dans les oueds Bedjima et Seybouse où l'indice est relativement bas par rapport aux restes des sites. Par ailleurs, ces données permettent de distinguer deux périodes de ponte, se situant l'une au printemps et l'autre entre la fin de l'automne et début de l'hiver.

D'autre part, l'évaluation du « stress on stress » a permis d'avoir une idée sur le classement de nos sites du moins pollué vers le plus pollué. L'oued Seybouse est le plus pollué. Il apparaît évident que la station de la plage El Hanaya en tant que site de référence a été bien choisie.

Les expérimentations de terrain ont révélé des différences de sensibilité des systèmes antioxydants entre les glandes digestives et les branchies. De plus, l'effet des saisons, conforté par l'étude statistique, est bien évident. Nous avons pu mettre en évidence que l'activité GST était bien supérieures en période printanière, plus marquée dans les branchies. D'autre part nous avons enregistré des diminutions significatives du glutathion réduit en hiver dans les deux organes. L'analyse de la variance à un facteur contrôlé (site) et à deux facteurs contrôlés (organe et saison) du système de défense de *Perna perna* révèle un effet hautement significatif pour l'ensemble des sites.

In toto, l'analyse des concentrations en métaux lourds (Cu, Zn et Cd) varie suivant la saison de prélèvement avec une accumulation plus forte en hiver et au printemps. Les valeurs moyennes enregistrées révèlent un ordre décroissant $Zn < Cu < Cd$. Cependant, il est à remarquer que les deux sites portuaires présentent des concentrations relativement élevées en cuivre, par rapport aux médianes nationales données par le Réseau National Français d'Observation de l'Ifremer.

Dans les expérimentations au laboratoire, les systèmes antioxydants ont répondu significativement surtout à la plus forte dose testée. Cependant, la plus forte concentration de cuivre a inhibé de manière significative la GST. Néanmoins, au cours de nos travaux, les résultats confirment une accumulation des métaux plus forte en hiver qu'en été.

Au vu de l'ensemble des résultats exposés dans cette thèse, le glutathion (et la GST) jouent un rôle central dans la détoxification des métaux lourds (surtout du cuivre), ils semblent être des biomarqueurs intéressants et de les proposer en tant qu'outils biologiques dans l'évaluation de la qualité du milieu et dans le suivi de la pollution de notre littoral.

Mots clés : GSH, GST, métaux, bivalves, stress oxydant, pollution, golfe Annaba

ABSTRACT

The main objective of this research is to help supplement data on marine pollution in coastal areas of the Bay of Annaba. The presence of heavy metals makes important analysis of metals in the tissues of the mussel *Perna perna* taken as a model with potential use in biomonitoring of the environment.

The data obtained measurements about the shell's size of bivalves harvest in different seasons, we have found that the biometric parameters were significantly different from one site to another. The significant allometric relationships are revealed for all parameters measured linear and weight of all the molluscs of the study sites. The type of growth is allometric minorant.

The evaluation of the index condition, although the seasonal fluctuations observe that *Perna perna* has a good physiological state, except in mussels which were collected in the Bedjima and Seybouse where the index is relatively low compared to the remains of sites. Furthermore, these data can distinguish between two periods of spawning one in the spring and the other between late autumn and early winter.

On the other hand, evaluation of 'stress on stress' has to have an idea about the ranking of our sites in the less polluted to the most polluted. Seybouse is the most polluted one. It is clear that the station from the beach El Hanaya as a reference site was well chosen.

Field experiments have revealed differences in sensitivity between the antioxidant system digestive glands and gills. Moreover, the effect of the seasons confirms by the statistical study, it is obvious. We have shown that GST activity was higher in spring, more pronounced in the gills. On the other hand we have seen significant decreases glutathione reduced in winter in both organs. The analysis of variance for a controlled factor (site) and two controlled factors (organ and season) of the defense system of *Perna perna* showed a highly significant for all sites.

In toto, analysis of the concentrations of heavy metals (Cu, Zn and Cd) depending on the sampling season with an accumulation greater in winter and spring. Mean values show a decreasing order $Zn < Cu < Cd$. However, it is noticeable that the two ports have relatively high concentrations of copper compared to national medians given by the French Network National from Ifremer.

In laboratory experiments, the antioxidant systems mainly respond significantly to the highest dose tested. However, the highest concentration of copper was significantly inhibited GST. During our work, the results confirm the accumulation of metals higher in winter than in summer.

All the results were presented in this study glutathione (and GST) play a central role in the detoxification of heavy metals (especially copper), they appear to be biomarkers of interest and to propose them as biological tools in assessing environmental quality and monitoring of pollution of our coasts.

Keywords: GSH, GST, metals, mussel, stress oxidant, pollution, bay of Annaba

الملخص :

إن الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تكميل معطيات التلوث البحري لمناطق الساحلية لخليج مدينة عنابة .توجد معادن ثقيلة يوجد تحليل المعادن في أنسجة القوقعة Parna perna المأخوذة كنموذج جد هام لقدرتها في الحراسة الحيوية للبيئة . المعطيات المتحصلة عليها من قياس عرض قوقعة في خلال الفصول المختلفة سمحت لنا باستنتاج أن المقادير اليومترية كانت مختلفة تماما من موقع إلى آخر ، لقد تم تبين علاقات ألومترية معتبرة لكل المقاييس الخطية و الميزانية المسجلة لهذه الرخويات في مواقع الدراسة . تقييم المؤشر الشرطي يبين أنه رغم التغيرات الفصولية الملاحظة أن Parna perna تمثل حالة فسيولوجية جيدة باستثناء بلح البحر المجمعة في الوديان Bedjima et Seybouse أين المؤشر كان ضعيف بالمقارنة مع باقي المواقع .

إلا أن هذه المعطيات تسمح لنا بملاحظة زمانان للوضع الواحد في فصل الربيع و الآخر ما بين نهاية الخريف و بداية الشتاء ، من جهة أخرى تقييم " الضغط في الضغط " سمح بالإذلال بفكرة ترتيب مواقعنا من الأقل تلوث إلى الأكثر تلوث و تبين أنه قد أحسن إختيار موقع شاطئ الحناية كمرجع .

لقد أظهرت التجارب في الميادين الاختلافات في الحساسية للنظام الغير مؤكسد و ذلك بين الغدد الهاضمة و الغلاصم لقد سجلنا تخفيضات هامة لـ JSH الذي ينخفض في فصل الشتاء في العضوين .

تحليل مربع النموذجي مترقب بعامل واحد هو الموقع و مراقب بعاملين هو العضو و الفصل للنظام الدفاع لـ Parna perna تحليل المعادن الثقيلة (الكاديوم ، النحاس ، الزنك) يتغير حسب فصل الاقتران مع تراكم أقوى في الشتاء مقارنة بفصل الربيع ، القيم المتوسطة المسجلة تبين ترتيب تنازلي لهذه المعادن $ZN < CU < CD$.

في التجارب الخيرية الأنظمة الغير مؤكسدة استجابت بصفة معتبرة خاصة مع الأكبر نسبة المختبرة مع ذلك إن الأكبر تركيز للنحاس قد أضبط بشكل معتبر الـ GST تثبت النتائج خلال دراستنا تراكم المعادن في فصل الشتاء .

لقد ظهر أن GSH و الـ GST يلعبان دور في إبطال مفعول سم المعادن الثقيلة خاصة النحاس و لقد يظهر أنهما مسجلان حيويان مهمان تم يستعملان كأداة بيولوجية في تقييم نوعية البيئة و متابعة التلوث الساحلي .

الكلمات المفاتيح :

GSH , GST المعادن ، ضغط مؤكسد ، تلوث و خليج عنابة

