

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Badji Mokhtar - Annaba
Faculté des Sciences
Département des Sciences de la Mer
Laboratoire de Biologie Animale Appliquée



THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat d'État en Sciences de la Mer
Option : Biologie et écologie marines

ÉTUDE DE *Gambusia affinis* (POISSON, TÉLÉOSTÉEN) ET *Donax trunculus* (MOLLUSQUE, PÉLÉCYPODE) : ÉCOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET IMPACTS DE QUELQUES ALTERAGÈNES

Présentée par :

Mme Hayette BELDI

Directeur de thèse

M. N. SOLTANI (Professeur, Université Badji Mokhtar - Annaba)

Devant le jury d'examen :

PRÉSIDENT : M. M. BENSOUILAH (Professeur, Université Badji Mokhtar - Annaba)

EXAMINATEURS : M. P. SCAPS (Maître de Conférences, USTL, Lille)

M. C. RAHMOUNE (Professeur, Université Mentouri - Constantine)

M. C. ABDENNOUR (Professeur, Université Badji Mokhtar - Annaba)

2007

AVANT-PROPOS

Avant de présenter les résultats de mes recherches, je tiens à exprimer à tous ceux qui m'ont permis de mener à bien ce travail, mes sentiments de reconnaissance.

Mes remerciements vont en premier lieu aux membres de jury :

Monsieur **Mourad BENSOUILAH**

Professeur au Département des Sciences de la Mer et Directeur du Laboratoire d'Ecologie des Milieux Marins et Littoraux, Université BADJI Mokhtar - Annaba, pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury malgré les nombreuses tâches qui lui incombent.

Monsieur **Noureddine SOLTANI**

Professeur au Département de Biologie et Directeur du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Université BADJI Mokhtar - Annaba, d'avoir accepté de diriger cette thèse. Il m'a fait part de son expérience et son savoir faire dans les domaines de biologie, physiologie, et d'écotoxicologie. J'ai particulièrement apprécié son soutien, ses précieuses orientations et la confiance qu'il a bien voulu m'accorder.

Monsieur **Patrick SCAPS**

Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Technologie de Lille et chercheur au Laboratoire d'écotoxicologie et écologie numérique. Je suis très honorée de votre présence dans ce jury. Qu'il me soit permis de vous exprimer ici toute ma gratitude.

Monsieur **Chabane RAHMOUNE**

Professeur, Université Mentouri – Constantine, de me faire l'honneur de bien vouloir juger ce travail, je vous prie d'accepter le témoignage de ma respectueuse reconnaissance.

Monsieur **Chérif ABDENNOUR**

Professeur au Département de Biologie, m'a honoré en examinant cette thèse. Ses remarques et critiques seront les bienvenues. Je tiens donc, à lui exprimer mes sincères reconnaissances.

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Université BADJI Mokhtar – Annaba, je tiens à cet effet à remercier toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à sa réalisation.

Je tiens également à remercier :

Monsieur **Patrick GIRAUDOUX**, Directeur de recherche au CNRS, Laboratoire de Biologie Environnementale et Professeur à l'université Franche-Comté, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire avec beaucoup de gentillesse et simplicité.

Monsieur **Renaud SCHEIFLER**, Maître de Conférences et chercheur au Laboratoire de Biologie Environnementale, université Franche-Comté, ainsi que Monsieur **Frédéric GIMBERT**, pour la réalisation des dosages des métaux lourds, qu'ils trouvent ici mes profonds respects et gratitude. Leur disponibilité et leur patience m'ont été d'un grand réconfort pour le bon déroulement d'une partie de mon travail.

Monsieur **Jean Pierre DENIZOT**, chercheur au CNRS à Gif-sur-Yvette Paris, m'a accueilli dans son laboratoire et m'a initié aux techniques de microscopie électronique, je n'oublierai guère sa gentillesse et sa sympathie.

Mesdames **Souheila BOUDENE et Samira YEZLI**, techniciennes au Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, m'ont toujours facilité la tâche lors de mes différentes analyses biochimiques, je les remercie chaleureusement.

Enfin, je remercie tous mes collègues du Département : Mesdames Lamia CHAOUI, Mérièm KHELIFI-TOUHAMI, Messieurs Brahim DRAREDJA, Hocine FREHI, Abdallah Borhane DJEBAR, Mohamed Hichem KARA, Makhlof OUNISSI, Farid DERBAL, Abdelkhalek RETIMA, Abdelrafik MEDDOUR, Ahcen HARIDI, Yacine MESSERER, Nabil LOUCIF et Zoubir AZZOUZ.

SOMMAIRE**AVANT-PROPOS****INTRODUCTION GENERALE**

1

PREMIERE PARTIE**CROISSANCE, BIOCHIMIE ET REPRODUCTION DE *GAMBUSIA AFFINIS* : EFFETS SECONDAIRES
DU DIFLUBENZURON**

1. INTRODUCTION	6
2. MATERIEL ET METHODES	9
2.1. Présentation de l'espèce	9
2.1.1. Morphologie et anatomie	9
2.1.2. Cycle biologique	10
2.2. Technique d'élevage	10
2.2.1 Présentation du site d'échantillonnage	10
2.2.2. Élevage des poissons	11
2.3. Application insecticide	11
2.3.1. Présentation de l'insecticide	11
2.3.2. Traitement	11
2.4. Technique biométrique	12
2.4.1. Mensurations et prélèvement des organes	12
2.4.2. Rapport gonadosomatique	12
2.4.3. Rapport hépatosomatique	12
2.4.4. Coefficient de condition	13
2.5. Techniques analytiques	13
2.5.1. Extraction des métabolites	13
2.5.2. Dosage du glycogène	13
2.5.3. Dosage des lipides	14
2.5.4. Dosage des protéines	15
2.6. Activités enzymatiques	15
2.6.1. Dosage du glutathion réduit	15
2.6.2. Dosage du glutathion S-transférase	16
2.6.3. Dosage de la lactate déshydrogénase	17
2.6.4. Dosage de l'acétylcholinestérase	18
2.6.5. Extraction et dosage des protéines	18

2.7. Analyse des résidus du diflubenzuron par CLHP	19
2.7.1. Extraction des résidus	19
2.7.2. Équipement et conditions CLHP	19
2.8. Traitement des données	19
3. RESULTATS	20
3.1. Effets morpho-biochimiques du Diflubenzuron	20
3.1.1. Effet du DFB sur la morphométrie des alevins	20
3.1.2. Effet du DFB sur la morphométrie des femelles	21
3.1.3. Effet du DFB sur la composition biochimique des ovaires	23
3.1.4. Effet du DFB sur la composition biochimique des hépatopancréas	24
3.2. Effets sur les activités enzymatiques	26
3.2.1. Glutathion réduit	26
3.2.2. Glutathion S-transférase	27
3.2.3. Lactate déshydrogénase	28
3.2.4. Acétylcholinestérase	28
3.3. Analyse des résidus du dimilin par CLHP	29
3.3.1. Dans l'eau	30
3.3.2. A la surface du corps	30
3.3.3. Dans le corps entier	32
4. DISCUSSION	33
4.1. Aspects morphologiques	33
4.2. Aspects biochimiques	34
4.3. Aspects enzymatiques	35
4.4. Analyse des résidus	39
5. CONCLUSIONS	41

DEUXIEME PARTIE

Donax trunculus : ECOLOGIE, COMPOSITION BIOCHIMIQUE, POLLUTION METALLIQUE ET BIOSURVEILLANCE DU GOLFE D'ANNABA

1. INTRODUCTION	42
2. MATERIEL ET METHODES	46
2.1. Présentation de l'espèce	46
2.1.1. Morphologie et anatomie	46
2.1.2. Écologie et biologie	47
2.2. Présentation des sites d'échantillonnage	48
2.2.1. Position géographique et description	48
2.2.2. Configuration du fond	49

2.2.3. Sédimentologie	49
2.2.4. Hydrodynamisme	49
2.3. Choix des sites et stratégie d'échantillonnage	50
2.4. Facteurs écologiques	51
2.4.1. Eaux	51
2.4.2. Sédiments	52
2.5. Traitement des échantillons	53
2.5.1. Biométrie	53
2.5.2. Densité	54
2.5.3. Fréquence de tailles	54
2.6. Analyses biochimiques	54
2.6.1. Extraction des métabolites	54
2.6.2. Dosage des métabolites	54
2.7. Indice de condition	55
2.8. Activité de l'acétylcholinestérase	55
2.9. Dosages des métaux lourds	55
2.9.1. Prétraitement (minéralisation)	55
2.9.2. Dosages par spectrophotométrie d'absorption atomique (S.A.A)	55
2.10. Traitements statistiques des données	55
3. RESULTATS	57
3.1. Hydrologie	57
3.1.1. Température et salinité	57
3.1.2. Matière en suspension (M.E.S)	58
3.2. Caractéristiques sédimentaires	58
3.3. Structure de la population	58
3.3.1. Densités	58
3.3.2. Fréquences de tailles	59
3.4. Composition biochimique	62
3.4.1. Taux de protéines	62
3.4.2. Taux de glucides	63
3.4.3. Taux de lipides	64
3.5. Indice de condition	64
3.6. Activité de l'acétylcholinestérase	65
3.7. Concentrations des métaux traces dans la chair	66

4. DISCUSSION	68
4.1. Caractéristiques écologiques des stations	68
4.2. Structure de la population	68
4.3. Composition biochimique	70
4.4. Variations de l'activité de l'acétylcholinestérase	72
4.5. Bioaccumulation des métaux lourds	74
5. CONCLUSIONS	76
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	78
RESUMES	
Français	80
Anglais	81
Arabe	82
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	83
ANNEXES	107

INTRODUCTION GENERALE

Les insectes nuisibles affectent la production alimentaire soit directement par la réduction qualitative ou quantitative des récoltes ou, indirectement en servant comme vecteurs de plusieurs maladies des plantes. L'impact des insectes et autres arthropodes sur l'être humain en tant que vecteurs actifs et réservoirs vivants des maladies est très significatif (Conlong & Mugoya, 1976). Les moustiques sont des vecteurs de plusieurs agents pathogènes tels que des protozoaires, des virus et des nématodes qu'ils transmettent à l'homme et aux animaux domestiques (Nuttall, 1997). La lutte chimique, avec essentiellement des pesticides chimiques de synthèse, continue à être le moyen majeur de contrôle des vecteurs (Casida & Quistad, 1998). Leur impact dépend à la fois de leur mode d'action (certains sont plus toxiques que d'autres), de leur persistance dans les sols et les eaux (certains se dégradent plus rapidement que d'autres) et de leurs sous-produits de dégradation lesquels sont parfois plus toxiques et se dégradent moins vite que le composé initial (Conlong & Mugoya, 1976). Cependant, plusieurs arguments, tels les effets secondaires des insecticides conventionnels ou les impératifs environnementaux (Paoletti & Pimentel, 2000), ont encouragé la recherche de composés alternatifs plus sélectifs ; les régulateurs de croissance des insectes (Ishaaya & Horowitz, 1998). Les insecticides biologiques et les régulateurs de croissance des insectes offrent de bonnes perspectives de lutte contre les moustiques.

En Algérie, *Culex pipiens* L. est l'espèce de moustique qui présente le plus d'intérêt en raison de sa large répartition géographique, de son abondance et de sa nuisance réelle, surtout dans les zones urbaines (Bendali & al., 2001). Les moustiques sont généralement contrôlés par des insecticides conventionnels (organochlorés, organophosphorés et pyréthrinoides) qui ont donné de bons résultats mais, malheureusement, ont également largement contribué à perturber l'environnement par des effets toxiques indésirables sur l'homme et sur les espèces non visées (Ishaaya & Horowitz, 1998). En conséquence, une lutte intégrée et raisonnée s'est développée ces dernières années avec l'apparition de nouvelles molécules ayant une action spécifique sur le processus du développement des insectes nuisibles.

Les régulateurs de développement font partie de ces molécules et comprennent, en outre, les inhibiteurs de la synthèse de la chitine, les mimétiques de l'hormone juvénile et les agonistes de l'ecdysone (Ishaaya & Horowitz, 1998). Les inhibiteurs de la synthèse de la chitine sont représentés par deux groupes : les benzoylphenylurées (BPU) et la buprofézine. Les BPU sont des insecticides sélectifs inhibant la synthèse de la chitine (Ishaaya & Casida, 1974 ; Soltani et al., 1993 ; Oberlander & Silhacek, 1998) en interférant avec la mise en place de la nouvelle cuticule causant ainsi des mues imaginaires incomplètes chez les insectes (Mulder & Gijswijt, 1973 ; Grosscurt & Anderson, 1980). Le représentant majeur des BPU est le diflubenzuron (DFB) commercialisé sous l'appellation de dimilin. Il est pulvérisé à grande échelle en Algérie

contre les ravageurs des forêts. En outre, il est intégré dans la lutte chimique contre les moustiques dans plusieurs pays.

La lutte chimique a posé à long terme d'énormes inconvénients avec, entre autres, l'apparition de souches de plus en plus résistantes l'accumulation et la concentration des résidus chez les vertébrés, notamment chez les poissons, les oiseaux et chez l'homme (Conlong & Mugoya, 1996).

Les insecticides neurotoxiques révèlent pour la plupart des effets nuisibles qui ne sont plus acceptables à notre époque. Les organochlorés ont été règlementés depuis plus de vingt ans. Les organophosphorés sont à utiliser avec beaucoup de rigueur et dans des concepts de lutte bien particuliers qui ne mettent pas en péril la vie des hommes et de la faune. Quant aux pyréthriinoïdes de synthèse, ils ont montré à de faibles doses, une sélectivité intéressante qui étend chaque jour un peu plus leur spectre d'utilisation. Suite à cela, l'homme a pensé à utiliser des moyens biologiques contre les insectes nuisibles par l'utilisation rationnelle de leurs ennemis naturels appartenant soit au règne animal soit au règne végétal (Lacey & Orr, 1994). L'intérêt porté à la lutte biologique depuis l'année 1960, découle en fait des incidents écologiques et des résistances acquises par les insectes lors des précédents traitements de masse avec les insecticides chimiques.

La lutte biologique est une alternative à la lutte chimique. Des organismes invertébrés et vertébrés ainsi que des entomopathogènes ont été utilisés dans la lutte biologique contre les moustiques (Chapman, 1974 ; Larget & De Barjac, 1981 ; Lacey & Orr, 1994). Parmi eux, *Gambusia affinis* (Cyprinodontiformes : Poeciliidae) (Baird & Girard, 1853) est le poisson larvivore le plus connu (Gerberrich & Laird, 1985 ; Kramer *et al.*, 1988 ; Walton & Mulla, 1991). Par ailleurs, *G. affinis* a été également sélectionné comme un organisme modèle montrant une grande tolérance aux différents polluants notamment aux pesticides agricoles (Boyd & Ferguson, 1964). Malgré le nombre considérable d'études réalisées sur les dérivés de la BPU, notamment le DFB, très peu de travaux ont été consacrés à l'impact de ces régulateurs de croissance sur les organismes non visés, particulièrement les espèces bénéfiques (Soltani *et al.*, 1999). On signale seulement des travaux concernant l'effet du DFB sur les Arthropodes non visés (Martinat *et al.*, 1989 ; Sample, 1993). Des insecticides organophosphorés ont été testés sur des enzymes cibles chez *G. affinis* pour expliquer leur différence de toxicité (Bonne & Chambers, 1997). Plusieurs études ont été menées sur les plans, écologique, physiologique et biologique, pour permettre une intégration considérable de *G. affinis* dans le programme de lutte biologique dans notre pays (Abouzeitoun, 1991 ; Draredja-Beldi, 1993 ; Bouhafis, 1993 ; Tidjani, 1997 ; Ouali, 1997 ; Aissaoui, 1998). Des auteurs ont constaté que l'utilisation massive des pesticides agricoles dans l'environnement naturel peut perturber plusieurs systèmes physiologiques tels que la croissance, la reproduction et le métabolisme de quelques organismes non visés.

La pollution de l'environnement est devenue en quelques décennies un des problèmes majeurs qui conditionnent l'avenir de la civilisation technologique moderne. En effet, par la nature et l'étendue de son impact, la contamination chimique de tous les milieux continentaux et marins menace non seulement la santé publique, mais même la pérennité de la biosphère toute entière. En effet, les dégradations de plus en plus étendues qui résultent de la pollution de l'écosphère compromettent la stabilité des écosystèmes affectés et en conséquence le renouvellement de ressources naturelles biologiques, voire minérales, considérées voici peu encore comme inépuisables et gratuites, telles l'air et l'eau.

La masse et la diversité croissante des polluants rejetés dans l'environnement par la technologie moderne conduisent aujourd'hui à s'interroger sur leurs effets globaux à l'échelle de la biosphère.

La pollution marine possède différentes origines, en effet, toutes les substances produites dans un bassin versant ont tendance à rejoindre à terme le milieu marin par les fleuves et les cours d'eau. Cette pollution peut être d'origine industrielle (hydrocarbures, métaux lourds, substances chimiques, etc.), agricole (nutriments, pesticides, etc.), ou tout simplement être produite par la population vivant autour du bassin (déchets solides ou liquides, résidus d'installation de traitement des eaux usées, polluants contenus dans les eaux de ruissellement, etc.) (Sarkar *et al.*, 2006).

Aujourd'hui, deux approches complémentaires sont utilisées comme indicateurs de la pollution : les biomarqueurs et les bioindicateurs (Valavanidis *et al.*, 2006).

Un biomarqueur, selon la définition la plus récente (Lagadic *et al.*, 1997), est "un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant". Les biomarqueurs permettent un suivi à la fois spatial et temporel donnant une image dynamique des variations des quantités de polluants présents dans le milieu marin.

Les bioindicateurs sont des organismes vivants utilisés pour surveiller la santé de l'environnement, où toute perturbation physiologique dans leur organisme indique une exposition chronique à la pollution. Ces perturbations sont tributaires de plusieurs critères, incluant entre autres, la sensibilité, la reproductibilité et la pertinence écologique pour bien représenter les phénomènes en cause (Lagadic *et al.*, 1997). A cet effet, de nombreuses espèces ont été utilisées comme bioindicatrices de la pollution ; tels que les bivalves : *Mytilus galloprovincialis*, *Perna perna* et *Musculista senhousia* du fait de leur capacité de bioaccumulation (Djediati *et al.*, 1990 ; Paulet *et al.*, 1992 ; Gregory & George, 1996 ; Aït Aïssa *et al.*, 2003). Parmi ces espèces *Donax trunculus* est considérée comme un excellent bioindicateur de la pollution marine (Goujous, 1995). En effet, elle est proposée comme espèce sentinelle dans les programmes de biosurveillance de la contamination des côtes et plus particulièrement les plages sableuses, vu sa grande capacité d'accumulation de polluants dans ses divers tissus (El Hamadi *et al.*, 2005).

D. trunculus a fait l'objet de nombreux travaux concernant sa biologie et son écologie dans divers biotopes ; tels que l'Atlantique (Ansell & Lagardere, 1980 ; Guillou & Le Moal, 1980 ; Bayad & Guillou, 1985 ; Guillou & Bayed, 1991), la Méditerranée (Ansell et Bodoy, 1979 ; Ansell *et al.*, 1980 ; Neuberger-Cymik *et al.*, 1990 ; Ramon *et al.*, 1995). En Algérie, la distribution de *D. trunculus* a été décrite par Vaissière & Fredj (1963), et l'étude biologique réalisée sur la côte algéroise (Mouëza, 1971 et 1975 ; Mouëza & Frenkiel-Renault, 1973). Dans le golfe d'Annaba, les travaux rapportés portent sur son rôle écotoxicologique (Chouahda, 2006).

Le concept de biosurveillance de la qualité des eaux marines, permet d'apprécier l'état de santé du milieu et de caractériser l'effet des xénobiotiques sur les organismes aquatiques. Cette caractérisation des effets peut se faire à l'échelle biochimique par mesure de certains biomarqueurs spécifiques et non spécifiques (Bodin *et al.*, 2004 ; Magni *et al.*, 2005).

Le littoral d'Annaba connaît un important risque de dégradation qualitative à cause des rejets industriels non contrôlés. En effet, les pratiques industrielles sont à l'origine de l'introduction dans les écosystèmes terrestres et marins de quantités considérables de métaux lourds ayant un potentiel toxique important (Brousseau *et al.*, 2000). Par ailleurs, les mollusques bivalves, sédentaires et filtreurs, sont parmi les premiers organismes soumis aux pollutions récurrentes et accidentelles sans possibilité de fuite. Ces animaux, ayant une grande capacité de concentrer dans leurs tissus les métaux lourds à l'état de traces, sont considérés comme des indicateurs biologiques de la pollution métallique (Langston & Spence, 1995). Ainsi, *Donax* pour ses capacités importantes de bioaccumulation, intègre toute perturbation du milieu.

L'utilisation de pesticides en milieu urbain a des impacts négatifs qui peuvent affecter la santé humaine et l'environnement. Cette étude vise donc à évaluer les effets secondaires du régulateur de croissance, le diflubenzuron (DFB), sur la morphométrie, la biochimie, les activités enzymatiques de quatre biomarqueurs de stress environnemental (GSH, GST, LDH et AchE), et, enfin l'analyse des résidus par chromatographie liquide haute performance (CLHP) chez *G. affinis* poisson larvivoire, très utilisé dans la lutte biologique contre les moustiques et s'est révélé très efficace par rapport à d'autres espèces autochtones (Bendali *et al.*, 2001).

Des quantités importantes de polluants, d'origine domestique, industrielle et agricole, sont régulièrement rejetées dans le milieu marin. Dans le cadre d'un programme de biosurveillance de l'état de santé des plages sableuses de la baie d'Annaba, une étude relative à l'écologie, la biochimie, et l'évaluation d'une contamination métallique a été réalisée chez le mollusque bivalve, *D. trunculus*, espèce fortement consommée par la population locale.

Deux parties distinctes compose le présent travail. La première partie évalue les effets DFB sur les aspects morphométriques, biochimiques, et enzymatiques d'un poisson larvivoire non visé *G. affinis*. La seconde partie est relative à l'utilisation d'une espèce

bioindicateur abondante et comestible, *D. trunculus*, dans le cadre de la biosurveillance du golfe d'Annaba par la mesure de biomarqueurs. Chaque partie du manuscrit comporte une introduction où on revient sur l'historique et l'importance de chaque espèce ainsi que l'intérêt de l'étude, suivie de la méthodologie adoptée décrivant l'écologie, la biologie et les différentes méthodes d'analyses réalisées. Enfin, on termine par une conclusion générale et des perspectives de recherche.

1. INTRODUCTION

Les insecticides sont non seulement toxiques sur l'environnement et la faune mais également à l'égard de l'homme. En effet, la recherche scientifique qui fait état des répercussions des pesticides sur la faune, indique que ces derniers agissent sur la reproduction, la croissance, le développement neurologique, le comportement, ainsi que sur le fonctionnement des systèmes immunitaires et endocriniens. La prise de conscience progressive des dangers pour l'environnement de l'usage abusif des insecticides, a beaucoup contribué à augmenter l'intérêt porté aux composés alternatifs plus spécifiques et moins toxiques ; les régulateurs de croissance des insectes (IGRs) (Dhadialla *et al.*, 1998).

Les IGRs comprennent les inhibiteurs de la synthèse de la chitine, les mimétiques de l'hormone juvénile et les agonistes de l'ecdysone (Ishaaya & Horowitz, 1998). Les inhibiteurs de la synthèse de la chitine sont représentés par deux groupes : les benzoylphénylurées (BPUs) et la buprofézine. Les BPUs sont des insecticides sélectifs inhibant la synthèse de la chitine (Ishaaya & Casida, 1974 ; Soltani *et al.*, 1993 ; Oberlander & Silhacek, 1998 ; Kellouche & Soltani, 2006 ; Chébira *et al.*, 2006) en interférant avec la mise en place de la nouvelle cuticule causant ainsi des mues incomplètes chez les insectes (Mulder & Gijswijt, 1973 ; Grosscort & Anderson, 1980 ; Ishaaya *et al.*, 2002). Ces dérivés en raison de leur mode d'action spécifique (Casida & Quistad, 1998), et de leur faible incidence sur l'environnement, sont de plus en plus intégrés dans les programmes de lutte contre les moustiques (Paoletti & Pimentel, 2000).

Le représentant majeur des BPUs est le diflubenzuron (DFB), commercialisé sous l'appellation de dimilin. Le mécanisme d'action de ce dérivé a fait l'objet de recherches intensives. Il affecte l'incorporation de précurseurs radiomarqués de la chitine (Soltani *et al.*, 1993), le métabolisme glucidique (Soltani, 1990), la synthèse de l'ADN ovarien (Soltani-Mazouni, & Soltani, 1994 ; Soltani *et al.*, 1994) et la synthèse des lipides (Khebbeb *et al.*, 1997).

La lutte chimique a posé à long terme d'énormes inconvénients avec, entre autres, l'apparition d'espèces de plus en plus résistantes, l'accumulation et la concentration des résidus chez les vertébrés, notamment chez les poissons, les oiseaux et chez l'homme (Conlong & Mugoya, 1976). A côté de la lutte chimique, vient s'intégrer la lutte éthologique (pièges), la lutte mécanique (chaleur, UV), la lutte environnementale (assèchement, destruction des gîtes larvaires), et la lutte biologique (Lacey & Orr, 1994). Nous désignerons sous le terme d'agents de lutte biologique les ennemis naturels des insectes qui regroupent, les organismes prédateurs ainsi que l'ensemble des parasites ou pathogènes des insectes. En effet, la lutte biologique a réalisée de grands progrès lors de la découverte du poisson culiciphage *Gambusia affinis* de la famille des Poeciliidae. Ces poissons larvivores importés d'Amérique latine, sont utilisés depuis le début du XIX^e dans la plupart des systèmes écologiques propices à leur développement. Ils sont très

dépendants des milieux dans lesquels ils vivent, et ne peuvent avoir de rôle de prédation intéressant que dans les plans d'eau permanents non souillés tels que les mares, les étangs, les canaux de drainage et d'irrigation. Bien que les *Gambusies* préfèrent les eaux chaudes des régions tropicales, des souches plus robustes ont été adaptées au climat subpolaire du Canada et de la Russie (Farley & Younce 1979). Par ailleurs, *G. affinis* a été sélectionnée comme un organisme modèle montrant une grande tolérance aux différents polluants, notamment aux pesticides agricoles (Boyd & Ferguson, 1964).

G. affinis a été introduite pour la première fois en Algérie en 1928, dans le cadre de la lutte biologique contre les larves d'Anophèles responsables du paludisme. L'opération de repeuplement a été initiée pour la première fois dans le bassin de Khemissa près de Souk-Ahras. En Algérie, *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) est l'espèce de moustique qui présente le plus d'intérêt en raison de sa large répartition géographique, de son abondance et de sa nuisance réelle surtout dans les zones urbaines (Rehimi & Soltani, 1999). Des essais de prédation ont montré que *G. affinis* était très efficace contre les larves de moustiques comparativement à d'autres espèces de poissons (Bendali *et al.*, 2001). Il constitue cependant un excellent modèle biologique pour les toxicologues chargés de suivre le devenir, et mesurer les effets immédiats et différés des xénobiotiques. Ce poisson ovovivipare a fait l'objet de plusieurs études sur le plan écologique et toxicologique (Bortone & Cody, 1999 ; Dreze *et al.*, 2000 ; Orlando *et al.*, 2002 ; Sivagnaname & Kalyanasundaram, 2004), biologique (Spencer *et al.*, 1999 ; Koya *et al.*, 2003), et endocrinologique (Drysdale & Bortone, 1989 ; Bortone & Davis, 1994 ; Rosa-Moliner *et al.*, 1998 ; Tolar *et al.*, 2001).

Divers travaux ont été effectués afin d'intégrer *G. affinis* dans le programme de lutte biologique. Abouzeitoun (1991), a mis en évidence le potentiel prédateur de *G. affinis* contre les larves de *Culex pipiens pipiens*. Draredja-Beldi (1993), a réalisé une étude sur l'écophysiologie de la reproduction de ce poisson. Ouali (1997) a examiné l'influence de certains facteurs internes et externes sur les principales phases du cycle de reproduction. Tidjani (1997), a étudié l'organisation et la structure des mécanorécepteurs de cette même espèce. Bendali *et al.* (2001), ont étudié l'efficacité de *G. affinis* à l'égard de divers stades de *Culex pipiens pipiens*. Cependant, peu de travaux ont été consacrés à l'impact des insecticides, particulièrement les dérivés de la benzoylphénylurée sur cet organisme non ciblé. Aissaoui (1998) a abordé la toxicité d'un insecticide organochloré, le lindane et son impact sur différents organes de *G. affinis*. Soltani *et al.* (1999), ont évalué l'effet du Triflumuron (TFM), dérivé de la benzoylphénylurée sur le taux de protéines ovariennes. Enfin, Draredja-Beldi & Soltani (2003), ont examiné l'impact du diflubenzuron sur la croissance des alevins et le taux de glutathion corporel chez les femelles adultes de *G. affinis*.

Les impacts négatifs des insecticides conventionnels dans l'environnement, ont abouti à augmenter l'intérêt porté à la lutte biologique comme méthode alternative de la lutte chimique. C'est pourquoi, l'objectif de cette étude est d'évaluer les effets du dimilin (25% PM), une formulation commerciale du diflubenzuron, sur la croissance, les indices

métriques, la biochimie, les activités enzymatiques, ainsi que l'analyse des résidus par chromatographie liquide haute performance (CLHP) chez *G. affinis* poisson prédateur de larves de moustiques.

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet du dimilin sur la croissance pondérale et linéaire des alevins et des femelles adultes en fonction du temps, ainsi que l'estimation de différents indices biométriques (RGS, RHS, K). La deuxième partie, traite de l'effet du DFB sur la composition biochimique (glycogène, lipides et protéines) des ovaires et des hépatopancréas à différents temps après traitement. Une troisième partie aborde les activités enzymatiques de quatre biomarqueurs du stress environnemental : le glutathion réduit (GSH), la glutathion S-transférase (GST), la lactate déshydrogénase (LDH) et l'acétylcholinestérase (AChE) dans un organe cible : l'hépatopancréas. Enfin, la quatrième partie a pour but de détecter et de suivre le devenir de cet insecticide au cours du temps dans l'eau douce, à la surface et à l'intérieur du corps entier de *G. affinis*.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Présentation de l'espèce

2.1.1. Morphologie et anatomie

Gambusia affinis (Baird & Girard, 1853) est un petit poisson ovovivipare d'eau douce, de couleur gris argentée, originaire d'Amérique centrale et de Floride, lieux où il est connu sous le nom de "mosquitofish". Ce poisson présente un dimorphisme sexuel se manifestant par une différence de taille très nette (**Fig. I.1**).

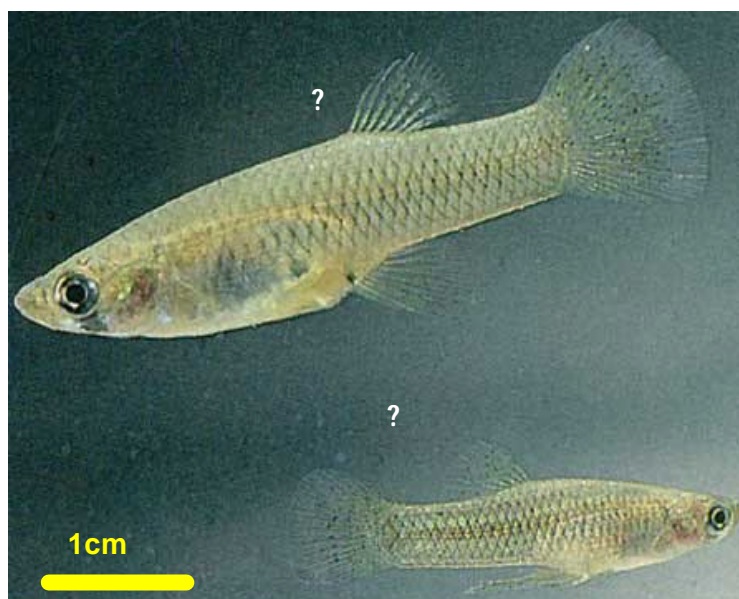


Figure I.1. Morphologie générale de *Gambusia affinis*.

A l'état adulte, la femelle mesure jusqu'à 5 cm de long, alors que le mâle ne dépasse guère 3 cm. En outre, chez le mâle, à maturité sexuelle, la nageoire anale est modifiée en une structure allongée qui constitue le gonopode. Des muscles puissants sont associés au gonopode lui permettant une grande mobilité (Howell & Denton, 1989). Le gonopode est utilisé lors du transfert du sperme dans l'organe génital femelle, durant la copulation (Peden, 1972).

Chez la femelle, la nageoire anale reste inchangée et est de forme arrondie. Pendant la gestation, en avant de cette nageoire, on distingue par transparence à travers le tégument, une tache noire plus ou moins étendue, qui marque l'emplacement de l'ovaire (Chambolle, 1970). Au repos sexuel, l'ovaire est réduit à un mince cordon contenant des ovocytes jeunes de couleur blanchâtre (Draredja-Beldi, 1993).

La Gambusie est loin d'être strictement culiciphage. Son régime comporte des petits crustacés, du zooplancton, divers mollusques et arthropodes aquatiques, des débris, des juvéniles de poissons (y compris de sa propre espèce), et des moustiques gobés surtout au moment de l'émergence de l'imago (Fralval, 2002).

G. affinis est un prédateur de larves de moustique (Rosen & Gordon, 1953) appartenant à la famille des *Poeciliidae*, dont la position systématique est la suivante :

Embranchement	Vertébrés
Classe	Poissons
Sous-classe	Téléostomes
Super-ordre	Téléostéens
Ordre	Cyprinodontiformes
Famille	<i>Poeciliidae</i>
Genre	<i>Gambusia</i>
Espèce	<i>affinis</i> (Baird & Girard, 1853).

2.1.2. Cycle biologique

Chez *G. affinis*, comme chez tous les *Poeciliidae* ovovivipares, l'ovaire est impair et possède en son centre une cavité dite chambre ovarienne. Au moment de l'insémination, les spermatozoïdes sont emmagasinés dans le repli de l'épithélium qui tapisse la cavité ovarienne. Leur survie est très longue puisqu'une femelle peut être l'objet de 4 à 5 gestations successives sans nouvelle insémination (Chambolle, 1973).

La durée de gestation est assez variable ; elle est de l'ordre de 25 jours dans le cas de gestations courtes et de 35 jours pour les plus longues. La vitellogenèse chez *G. affinis* est d'environ 8 jours. Une dizaine de jours après la parturition, l'ovaire renferme des embryons à des stades différents de développements. Ces variations s'atténuent au cours de la gestation ; plus on s'achemine vers la fin du développement plus les portées sont homogènes. A la naissance, les alevins ont tous le même état de développement. Au moment de la parturition ils quittent leur mère et gagnent le milieu externe. La femelle prend part activement à l'expulsion des embryons car au moment de leur sortie, elle est animée de contractions abdominales (Chambolle, 1970). Notons que le nombre d'alevins par portée varie entre 16 et 52 (Draredja-Beldi, 1993).

2.2. Technique d'élevage

2.2.1. Présentation du site d'échantillonnage

Les poissons ont été récoltés dans l'Oued Kherraza (Fig. I.2), rivière saisonnière qui se remplit en hivers et se trouve presque à sec durant l'été. Ce cours d'eau est situé à

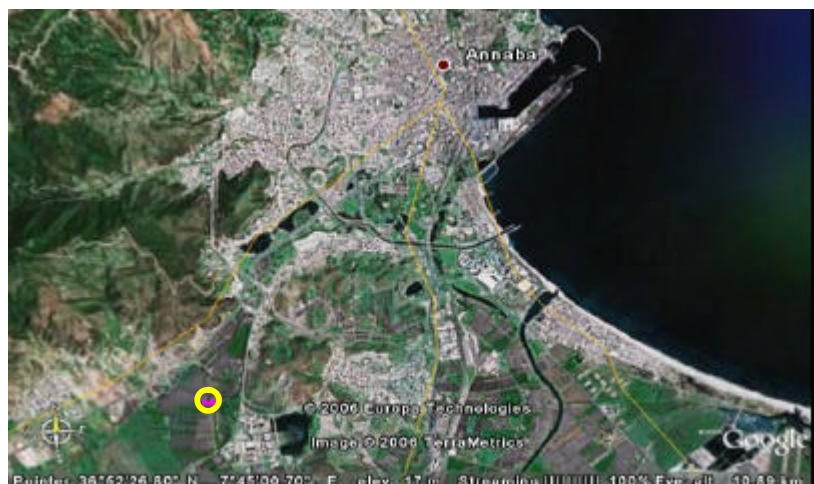


Figure I.2. Site d'échantillonnage de *Gambusia affinis*.

l'Ouest de la ville d'Annaba (36°52'26''N et 7°45'1''S). Sa longueur est d'environ 8 km et prend sa source dans le massif de l'Edough. La pêche a été pratiquée à l'aide d'une grande épuisette avec une ouverture de maille de 1 mm. La robustesse de *Gambusia* rend son transport et son élevage assez aisés.

2.2.2. Élevage des poissons

L'élevage a été réalisé à température ambiante (20 à 25°C) dans des aquariums d'une capacité de 50 à 70 litres, dont le fond a été recouvert d'une mince couche de sable surmonté de galets soigneusement lavés. L'eau utilisée est celle du robinet, mais exposée au préalable à l'air libre pendant au moins 24h, afin pour la débarrasser de l'hypochlorite de sodium. Les aquariums ont été munis de pompes à air (Rena 301 : 220V, 6W 51/mn), de filtre (Rena 225 : 220V, 50HZ, 51/mn, 3W) et de diffuseurs. Une nourriture à base de crevettes et de poissons déshydratés commercialisée sous le nom de Tetramin (Tetrawerk, Allemagne) a été distribuée quotidiennement. Au terme de leurs gestations, les femelles ont été isolées dans des pondeoirs afin de les séparer des alevins, et ceci pour éviter le phénomène de cannibalisme.

2.3. Application insecticide

2.3.1. Présentation de l'insecticide

Le diflubenzuron (DFB) ou (1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea) (**Fig. I.3**) (PM = 310,7 g), appartient à la famille des benzoylphénylurée. C'est un insecticide sélectif, efficace contre les insectes nuisibles. Il perturbe le développement et la croissance des insectes par inhibition de la chitine synthétase (Soltani *et al.*, 1996). Il a été aimablement fourni par le Dr A.C Grosscurt (Solvay Duphar B.V Hollande). Il est commercialisé sous le nom du dimilin 25% WP (poudre mouillable).

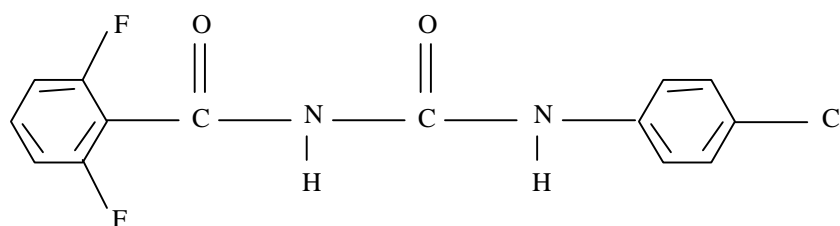


Figure I.3. Formule de structure du diflubenzuron.

2.3.2. Traitement

Le dimilin a été additionné dans l'eau d'élevage des poissons à la dose finale de 78 ng/l, correspondant à la DL₉₀ à l'égard des larves du quatrième stade de *Culex pipiens* (Réhimi, 2005). Le traitement a été réalisé pendant 24 heures sur les alevins, et en continu sur les femelles adultes. Une deuxième dose de 312 µg/l a été retenue pour le dosage de résidus de l'insecticide par chromatographie liquide haute performance, effectuée en traitement continu sur les femelles adultes. Trois séries d'expériences ont été réalisées :

- la première série d'expérience, vise à examiner l'effet du dimilin sur la croissance linéaire et pondérale des alevins en fonction du temps.
- la deuxième série d'expérience, conduite sur des femelles adultes a été menée afin d'évaluer l'effet du dimilin sur la morphométrie, la composition biochimique des ovaires et de l'hépatopancréas, et enfin sur l'activité de quatre biomarqueurs (GSH, GST, LDH et AChE).
- La troisième série d'expérience, effectuée sur des femelles adultes afin d'analyser les résidus du DFB dans l'eau, à la surface et à l'intérieur du corps entier de ce poisson.

2.4. Technique biométrique

2.4.1. Mensurations et prélèvement des organes

La longueur totale (Lt), est la distance entre l'extrémité de la nageoire caudale et l'extrémité du maxillaire, où le poisson doit être bien étalé sur une règle (Kerstant, 1985). Les corps entiers ainsi que les différents organes ont été pesés à l'aide d'une balance de précision Sartorius (1/10 mg). L'anesthésie est réalisée à l'aide du MS 222 (méthanesulfonate de l'éther éthylique de l'acide métaaminobenzoïque, Laboratoire SANDOZ), selon la technique de Bove (1963). Le poisson est fixé latéralement sur une plaque de paraffine. La dissection est réalisée sous loupe binoculaire, une incision est faite de l'orifice uro-génital jusqu'aux opercules. Une fois le tégument dégagé, l'ovaire ainsi que l'hépatopancréas sont récupérés. Les organes prélevés sont pesés puis conservés dans de l'acide trichloracétique (TCA) à 20% à 4°C, jusqu'aux différents dosages biochimiques.

2.4.2. Rapport gonadosomatique

Le rapport gonadosomatique (RGS) permet de caractériser l'importance pondérale des gonades, et il s'exprime selon Bougis (1952) par la formule suivante :

$$RGS = \frac{PG}{PT} \times 100$$

PG : Poids des gonades (mg), PT : Poids total du corps (mg).

2.4.3. Rapport hépatosomatique

Le rapport hépatosomatique (RHS) est exprimé selon Bougis (1952) par la formule suivante :

$$RHS = \frac{PH}{PT} \times 100$$

PH : Poids de l'hépatopancréas (mg)

PT : Poids total du corps (mg).

2.4.4. Coefficient de condition

Le coefficient de condition s'exprime par la formule de [Le Cren \(1951\)](#) :

$$K = \frac{P}{L^3} \times 100$$

P : poids total au corps (mg)

L : longueur totale (mm).

2.5. Techniques analytiques

2.5.1. Extraction des métabolites

L'extraction des métabolites des échantillons (ovaire et hépatopancréas) a été réalisée selon le procédé de [Shibko *et al.* \(1966\)](#) (**Fig. I.4**). Les ovaires et les hépatopancréas, prélevés sur des poissons témoins et traités au DFB à 78 ng/l à différents temps (0, 15, et 30 jours) après traitement, ont été conservés dans 300 µl de TCA 20%. Après un broyage aux ultrasons (Sonifier B-30) et centrifugation (5000 tours/mn pendant 10 mn), le surnageant **I** est récupéré et servira au dosage du glycogène tandis qu'au culot, on ajoute 500 µl d'un mélange chloroforme/méthanol (2V/1V). Une deuxième centrifugation (5000 tours/mn, 15 mn) permet de récupérer le surnageant **II**, contenant les lipides, le culot sera repris dans 200 µl de NaOH (0,1 N) pour l'estimation des protéines totales.

2.5.2. Dosage du glycogène

Le dosage du glycogène a été réalisé selon [Duchateau & Florkin \(1959\)](#). Cette méthode utilise l'antrone comme réactif (150 mg d'antrone, 75 ml d'acide sulfurique et 25 ml d'eau distillée), et une solution mère de glycogène (0,1 g/l). Elle consiste à ajouter au surnageant **I** (contenant le glycogène) 1 ml d'alcool 100° et 5 ml d'alcool 70°, puis chauffer au bain-marie à 70°C pendant 10 mn. Après centrifugation (2700 tours/mn, 15 mn), le surnageant est récupéré et placé dans un bain à sec (60°C), le résidu sec est repris dans 5 ml d'acide sulfurique (72%).

Le principe du dosage du glycogène consiste à prendre 0,5 ml de la solution sulfurique à laquelle on ajoute 4 ml de réactif d'antrone et chauffer au bain-marie pendant 13 mn. Il se développe une coloration verte, dont l'intensité mesurée à une longueur d'onde de 620 nm, est proportionnelle à la concentration du glycogène. La quantification est faite à partir d'une courbe de référence établie selon les indications du **tableau I.1**.

Tableau I.1. Dosage du glycogène ovarien et hépatopancréatique: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère (?l)	0	100	200	300	400	500
Eau distillée (?l)	500	400	300	200	100	0
Quantité de glycogènes (?g)	0	10	20	30	40	50
Réactif Anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

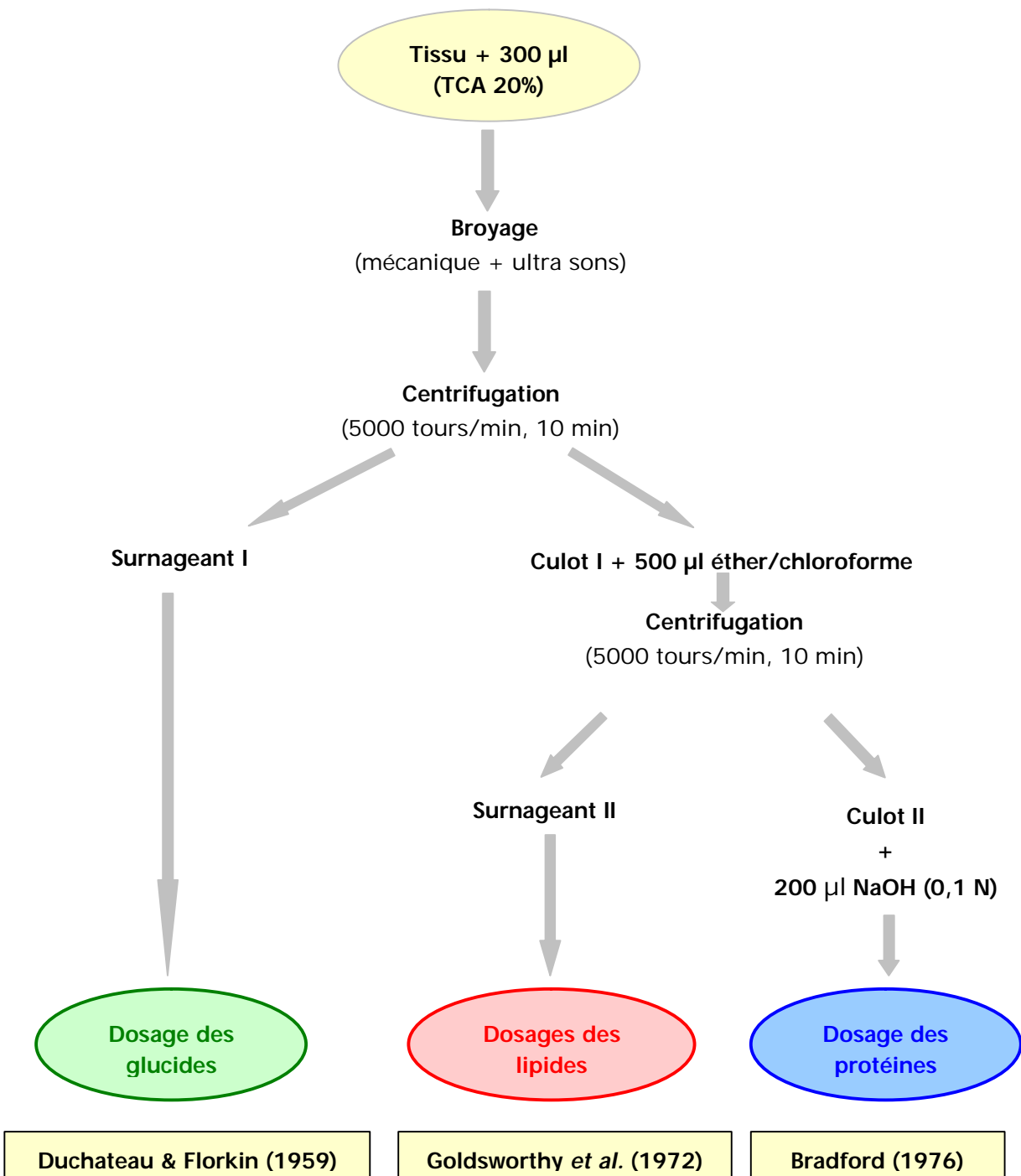


Figure I.4. Principales étapes d'extraction des métabolites : protéines, glucides et lipides (Shibko *et al.*, 1966).

2.5.3. Dosage des lipides

Les lipides ont été déterminés selon la méthode de Goldsworthy *et al.* (1972). Le dosage est effectué sur des fractions aliquotes de 100 µl des extraits lipidiques (surnageant II) ou de la gamme étalon, auxquelles on ajoute 1 ml d'acide sulfurique concentré. Après agitation, les tubes sont chauffés au bain-marie pendant 10 minutes à 100°C. Une fois refroidis, on prélève 200 µl de chaque tube auquel on ajoute 2 ml de réactif sulfo-phospho-vanillinique et on laisse 40 mn dans l'obscurité. Les densités optiques ont été lues dans le spectrophotomètre (20 D Spectronic) à une longueur d'onde

de 546 nm et la quantification est faite à partir d'une courbe de référence établie selon les indications ci-dessous (**Tableau I.2**).

Tableau I.2. Dosage des lipides ovariens et hépatopancréatique: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère (?l)	0	20	40	60	80	100
Solvant chloroforme/méthanol (?l)	100	80	60	40	20	0
Quantité de lipides (?g)	0	274	548	822	1096	13070

A défaut de solution standard type Boeh Ringer, la solution mère a été préparée en utilisant de l'huile de table de la façon suivante : trois tubes eppendorf ont été pesés, vides et contenant 300 µl d'huile, la différence du poids des tubes vides et pleins représente le poids de l'huile. Une première dilution a été effectuée en ajoutant à un des tubes 1 ml de solvant (chloroforme/méthanol) (1V/1V). La deuxième dilution se fait en prenant 50 µl du mélange auquel on y ajoute 950 µl du solvant.

2.5.4. Dosage des protéines

La quantification des protéines ovariennes et hépatopancréatiques a été faite sur une fraction aliquote (100 µl) selon [Bradford \(1976\)](#) avec le bleu brillant de coomassie (G 25, Merck) comme réactif (50 mg de bleu brillant de coomassie, 25 ml d'éthanol, 50 ml d'acide orthophosphorique et complété à 500 ml avec de l'eau distillée) et d'albumine de sérum de bœuf (BSA, Sigma) comme standard. Les absorbances ont été lues à une longueur d'onde de 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, et la gamme d'étalonnage a été effectuée à partir d'une solution d'albumine à 1 mg/ml selon le tableau (**Tableau I.3**) ci- dessous.

Tableau I.3. Dosage des protéines ovariennes et hépatopancréatique: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5
Quantité d'albumine BSA (?g)	0	10	20	30	40
Volume d'albumine (?l)	0	10	20	30	40
Eau distillée (?l)	40	30	20	10	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4

2.6. Activités enzymatiques

Le dosage des enzymes (GSH, GST, LDH et AChE) est effectué au niveau de l'hépatopancréas des femelles adultes témoins et traités au DFB (78 ng/l) au cours du temps. L'activité spécifique des enzymes est mesurée par rapport aux protéines. Le dosage des protéines est réalisé selon [Bradford \(1976\)](#).

2.6.1. Dosage du glutathion réduit

Le taux du glutathion réduit est estimé selon la méthode de [Weckbercker & Cory \(1988\)](#) basée sur l'absorbance de l'acide 2-nitro-5mercapturique résultant de la

réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2 nitrobenzoïque (DTNB) par le groupement thiol (-SH) du glutathion.

Les hépatopancréas sont homogénéisés pendant 30 secondes dans une solution de d'EDTA 0,02 M (7,4448 g EDTA et 1000 ml eau distillée) à l'aide d'un ultrason (Sonifer B-30). Afin de protéger les groupements -SH du glutathion, l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (0,25%) (0,5 g acide sulfosalicylique, 100 ml eau distillée) ; 0,8 ml de l'homogénat sont additionnés à 0,2 ml d'acide sulfosalicylique. Le mélange est vortexé et laissé pendant 15 minutes dans un bain de glace, puis centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 minutes. Le surnageant est utilisé comme source d'enzyme.

Le dosage du GSH est réalisé comme suit : 500 µl de surnageant sont additionnés à 1 ml de tampon tris-EDTA (63,04 g tris[hydroxyméthyl] amino-méthane, 7,4448 g EDTA et 1000 ml eau distillée) et 0,025 ml de DTNB (5-5'-dithio-bis-2 nitrobenzoïque) à 0,01 M (3,96 g DTNB , 1000 ml méthanol absolu) contre un blanc où le surnageant est remplacé par 500 µl d'eau distillée. La lecture des absorbances s'effectue toutes les 5 minutes à température ambiante à une longueur de 412 nm dans un spectrophotomètre UV (SHIMADZI-UV-1202).

Le taux du glutathion est estimé par la formule suivante :

$$\text{GSH } (\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{? \text{ Do} \times 1 \times 1,525}{13,1 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{prot.}}$$

? Do : densité optique

1 : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0,8 ml homogénat + 0,2 ml ASS),

1,525 : volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH (0,5 ml surnageant + 1 ml tris-EDTA + 0,025 DTNB),

13,1 : coefficient d'extinction (concernant le groupement -SH à 412 nm),

0,8 : volume de l'homogénat utilisé en ml,

0,5 : volume du surnageant utilisé en ml,

prot. : protéines en mg.

2.6.2. Dosage du glutathion S-transférase

La mesure de l'activité de la glutathion S-transférase (GST) consiste à fournir à l'enzyme un substrat : le 1-chloro-2,4 dinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement avec le glutathion réduit. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une molécule nouvelle, qui absorbe la lumière à 340 nm de longueur d'onde. La valeur de densité optique mesurée est proportionnelle à la quantité du complexe GSH-CDNB formé, elle-même liée à l'intensité de l'activité GST (Habig *et al.*, 1974).

Les hépatopancréas des femelles témoins et traitées sont homogénéisés dans 1 ml du tampon d'homogénéisation (20 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH = 7 ; 1,71 g saccharose) pendant quelques secondes à l'aide d'un broyeur à ultrasons (Sonifer B-30). L'homogénat hépatique ainsi obtenu est centrifugé à 5000 tours/min et le surnageant servira au dosage de l'activité de la GST. La méthode utilisée dans notre dosage est celle

de [Habig et al. \(1974\)](#) qui consiste à faire agir les GSTs contenus dans l'échantillon sur un mélange de GSH + CDNB à une température ambiante. Le protocole utilisé pour le dosage de l'activité spécifique de la GST est le suivant :

Une fraction aliquote de 0,2 ml est ajoutée à 1,2 ml du mélange CDNB (1 mM) – GSH (mM) ; (4,052 mg CDNB ; 30,73 mg GSH ; 0,8 ml d'éthanol ; 20 ml tampon phosphate 0,1 M pH 7). La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec 0,2 ml d'eau distillée remplaçant le surnageant. La variation de la densité optique due à l'apparition du complexe CDNB-GSH est mesurée toutes les minutes pendant 5 minutes à 340 nm dans un spectrophotomètre (SHIMADZI-UV-1202). L'activité spécifique de la GST est déterminée par la formule :

$$\text{GST (U/mg de protéines)} = \frac{? \text{ Do} \times \text{Vt}}{9,6 \times \text{Vs} \times \text{prot.}}$$

? Do : densité optique

Vt : volume des solutions de dosage (1,2 ml du mélange CDNB-GSH + 0,2 ml du surnageant),

9,6 : coefficient d'extinction du mélange GSH-CDNB (à 340 nm),

Vs : volume du surnageant utilisé dans le dosage,

prot. : protéines en mg.

2.6.3. Dosage de la lactate déshydrogénase

La détermination de l'activité LDH a été réalisée selon [Hill & Levi \(1954\)](#) où la LDH catalyse la conversion réversible du lactate en pyruvate. L'activité de la lactate déshydrogénase est mesurée suivant la vitesse d'oxydation du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) épuisé dans la réaction à une longueur d'onde de 340 nm avec coefficient d'extinction 6,22 ([Hammen & Bullock, 1991](#)).

Les échantillons sont homogénéisés dans 1ml du tampon tris-Hcl (0,1 M, pH 7,2) puis centrifugés à 5000 tours/min pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu est récupéré comme source d'enzyme.

Le dosage est réalisé comme suit : 50 µl de surnageant sont additionnés à 675 µl de tampon substrat lactate (0,2 M et pH 10) (1,25 ml sodium lactate à 70%, 31,25 ml tampon glycine 0,1 M (0,750 g glycine, 0,585 g NaCl, 100 ml eau distillée), 18,75 ml NaOH 1N et une goutte de chloroforme) et 50µl de solution Coenzyme NAD (10 mg NAD, 1 ml eau distillée). La lecture des absorbances s'effectue toutes les minutes pendant 5 minutes dans un spectrophotomètre à UV (SHIMADZI-UV-1202) à une longueur d'onde de 340 nm. L'activité spécifique de la LDH est estimée par la formule :

$$\text{LDH (U/mg de protéines)} = \frac{? \text{ Do} \times \text{Vt}}{6,22 \times \text{Vs} \times \text{prot.}}$$

? Do : Densité optique.

Vt : volume total des solutions (0,05 ml surnageant + 0,675 ml tampon substrat + 0,05 ml Coenzyme NAD)

Vs : volume du surnageant (0,05 ml)

6,22 : coefficient d'extinction micromolaire (à 340 nm)

prot. : les protéines en mg

2.6.4. Dosage de l'acétylcholinestérase

La méthode de dosage de l'acétylcholinestérase (AChE) la plus courante (Ellman *et al.*, 1961) consiste à fournir à l'enzyme un substrat, l'acétylthiocholine (ASCh), dont l'hydrolyse libère de la thiocholine (SCh) et de l'acide acétique. La quantité de thiocholine obtenue est proportionnelle à l'activité enzymatique, on la révèle grâce à une méthode colorimétrique faisant intervenir un ion (le dithiobisnitrobenzoate ou DTNB) qui se lie avec la thiocholine pour former un complexe de couleur jaune que l'on dose à 412 nm.

Les échantillons sont homogénéisés pendant quelques secondes dans 1 ml de solution détergente (38,03 mg éthylène glycol tris-beta-aminoéthyl éther N N N' N' ou EGTA, 1 ml triton X 100%, 5,845 g NaCl, 80 ml tampon tris 10mM) à l'aide d'un homogénéisateur à ultrasons (Sonifer B-30) puis centrifugés à 5000 tours/min pendant 5 minutes. Le surnageant est utilisé immédiatement pour la mesure de l'activité AChE.

L'activité spécifique de l'AChE est déterminée comme suit : 100 µl de surnageant sont additionnées à 100 µl de DTNB (0,1 M, pH 8) (39,6 mg de DTNB, 15 mg CO₃ Na, dans 10 ml tris 0,1 M pH 7) et 1 ml du tampon tris (0,1 M pH7). Après 3 à 5 minutes de repos nécessaire pour épuiser la réaction spontanée, 100 µl de substrat acétylthiocholine iodide (Sigma R) (118 mg ASCh dans 5 ml d'eau distillée) sont ajoutés. La lecture des densités optiques s'effectue à 412 nm toutes les 4 minutes pendant 20 minutes contre un blanc ou le surnageant à été remplacé par un volume équivalent de solution détergente (50 µl). L'activité spécifique de l'AChE est déterminée par la formule suivante :

$$\text{AChE(U/mg de protéines)} = \frac{? \text{ Do} \times \text{Vt}}{1,36 \times \text{Vs} \times \text{prot.}}$$

? Do : Densité optique.

Vt : Volume total des solutions (0,1 ml surnageant + 0,1 ml du DTNB + 1 ml tris + 0,1 ml de substrat ASCh)

Vs : Volume du surnageant (0,1ml)

1,36 : Coefficient d'extinction (concernant le DTNB à 412 nm).

prot. : Les protéines en mg

2.6.5. Extraction et dosages des protéines

Le dosage des protéines est effectué sur une fraction de 0,1 ml de l'homogénat avec 4 ml de bleu brillant de coomassie (BBC) (G 250, Merk) comme réactif (50 mg de bleu brillant de coomassie, 25 ml d'éthanol (95%), 50 ml d'acide orthophosphorique (85%) et complété à 500 ml avec l'eau distillée) et l'albumine sérum de bœuf (Sigma, France) comme standard. La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm, et la gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de bœuf (1 mg/ml).

2.7. Analyse des résidus du diflubenzuron par CLHP

2.7.1. Extraction des résidus

L'extraction et l'analyse des résidus par chromatographie liquide haute performance (CLHP) sont réalisées selon [Soltani & Morsli \(2003\)](#). Des échantillons d'eau d'élevage (3 ml) et des femelles sont prélevés à différents moments au cours de l'expérience (0, 7, 14, 21 et 28 jours), chaque poisson (témoin et traité) est rincé par 3 ml du mélange acétonitrile- eau (50-50) puis broyés dans 3ml du même mélange à l'aide d'un broyeur à ultrasons (Sonifer B-30). Après centrifugation (5000 tours/min) et évaporation du surnageant dans un Speed Vac (Variant), l'extrait sec de chaque échantillon est conservé à -10°C jusqu'au dosage.

2.7.2. Équipement et conditions CLHP

L'extrait sec est repris dans 200 µl de mélange acétonitrile- eau (50-50) et des fractions aliquotes (10 µl) sont injectées dans un chromatographe Waters 600E équipé d'un détecteur UV à barrettes de diode (Waters 99E), d'un injecteur automatique (Waters 717). L'enregistrement et l'intégration sont effectués par un ordinateur Nec Power Mate 433 à l'aide du logiciel Waters Millennium. La colonne utilisée est une colonne Merck RP 18 (longueur 4 X 125 mm ; diamètre 5 mm). L'élution est assurée par un gradient croissant linéaire d'acétonitrile- eau partant d'un mélange acétonitrile- eau (55/45 ; V/V) pour atteindre 100% d'acétonitrile en 25 minutes. La quantification du produit est effectuée par intégration et comparaison avec les pics obtenus par l'injection d'une série de concentrations du standard (diflubenzuron).

2.8. Traitements statistiques des données

Les données sont représentées par la moyenne (\pm l'écart type) établie sur un effectif ou un nombre de répétitions précisés dans les figures et tableaux. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel MINITAB version 13.31 Fr disponible au Laboratoire de Biologie Animale Appliquée. Différents tests ont été utilisés.

Les moyennes des séries témoins et traitées ont été comparées deux à deux en utilisant le test «t» de Student avec un seuil de signification $p = 0,05$. Les résultats des études biométriques, biochimiques et enzymatiques ont fait l'objet d'une analyse de la variance à deux critères de classification (traitement et temps). Les activités spécifiques des enzymes ont été déterminées à partir des équations de régression linéaire exprimant la densité optique en fonction de temps. La quantification des protéines est réalisée à partir d'une courbe d'étalonnage dont l'équation exprime les absorbances en fonction de la quantité d'albumine standard.

3. RESULTATS

3.1. Effets morpho-biochimiques du Diflubenzuron

3.1.1. Effet du DFB sur la morphométrie des alevins

Le dimilin (DL_{90}) a été testé pendant 24 heures sur des alevins de *G. affinis* en élevage, et ceci afin d'analyser son impact sur leur croissance linéaire et pondérale. La comparaison des valeurs moyennes, par le test «t» de Student, obtenues dans les séries témoins et traitées révèle que le DFB induit une diminution significative ($p < 0,001$) de la croissance linéaire et pondérale des alevins (**Figs I.5 et I.6**). Cette diminution apparaît à partir du 30^{ème} jour du traitement. En effet, la longueur atteint une valeur moyenne de 19,30 mm le 45^{ème} jour du traitement chez la série témoin et elle est de l'ordre de 17,71 mm chez les traités. Le poids moyen chez les témoins en fin de traitement est de 60,05 mg, et diminue chez les alevins traités pour atteindre une valeur de 45,71 mg.

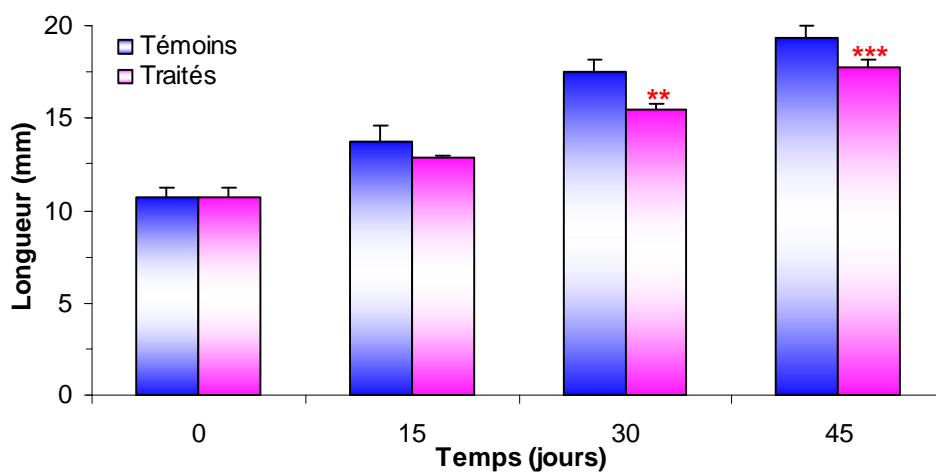


Figure I.5. Effet du DFB ($DL_{90} = 78$ ng/l) sur la longueur (mm) des alevins de *G. affinis* ($m \pm s$, $n = 9-10$).

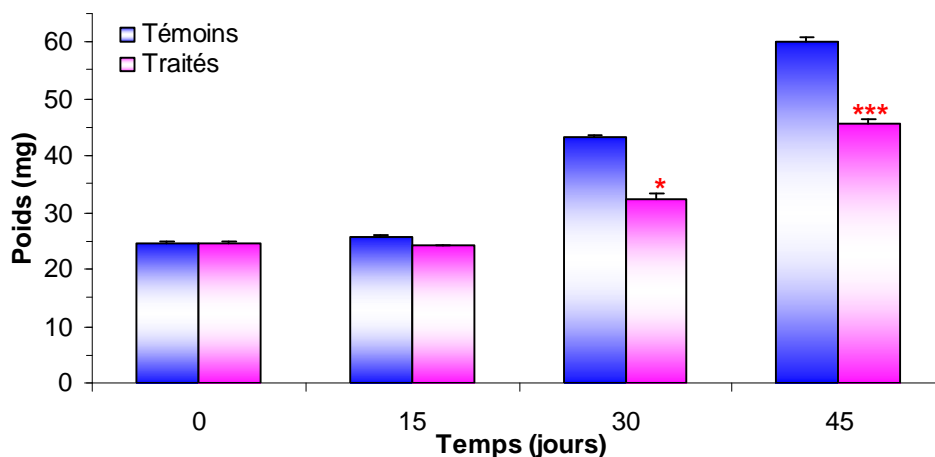


Figure I.6. Effet du DFB ($DL_{90} = 78$ ng/l) sur le poids (mg) des alevins de *G. affinis* ($m \pm s$, $n = 9-10$).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (âge, traitement) révèle qu'il y a un effet traitement, âge et interaction traitement/âge ; significatif pour la longueur et hautement significative pour le poids ($p < 0,001$).

3.1.2. Effet du DFB sur la morphométrie des femelles

Les effets du DFB à la dose 78 ng/l, correspondant à la DL₉₀ ont été examinés sur divers indices métriques chez des femelles de *G. affinis* exposées en continu à l'insecticide. Ainsi, la longueur des poissons, leur poids corporel, le rapport gonadosomatique (RGS), le rapport hépatosomatique (RHS) et le coefficient de condition (K) ont été déterminés à différents temps après traitement (0, 15 et 30 jours) chez les séries témoins et traitées. Les résultats obtenus et présentés dans les **figures I.7 et I.8** montrent que le DFB n'affecte pas la longueur des femelles de *G. affinis*. Cependant, le traitement diminue significativement ($p < 0,01$) leurs poids, ainsi ce dernier passe d'une valeur de 392,11 mg chez les témoins à 355,88 mg chez les traitées après 30 jours d'exposition. L'analyse statistique des données par ANOVA, révèle qu'il a un effet traitement, age et interaction traitement/ age hautement significative ($p < 0,001$) concernant le poids des femelles.

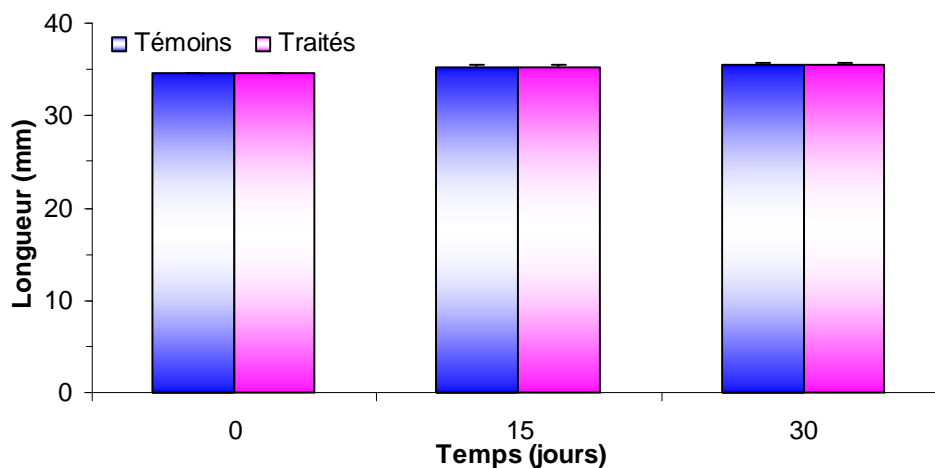


Figure I.7. Effet du DFB (DL₉₀ = 78 ng/l) sur la longueur (mm) chez les femelles de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$; $n = 5-8$).

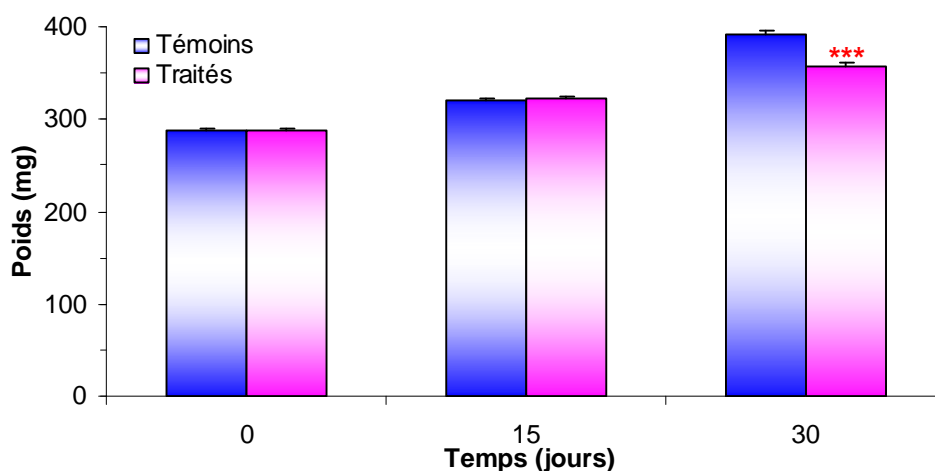


Figure I.8. Effet du DFB (DL₉₀ = 78 ng/l) sur le poids corporel (mg) chez les femelles de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$; $n = 5-8$).

D'autre part, les résultats obtenus montrent que le traitement réduit significativement les indices métriques. En effet, la comparaison des valeurs moyennes obtenues dans les séries témoins et traitées révèle que le DFB provoque une diminution significative ($p < 0,001$) du RGS (**Fig. I.9**). En effet, il passe de 0,83 chez les témoins à 0,69 chez les traités à la fin du traitement. On enregistre également une réduction hautement significative ($p = 0,001$) du RHS, où il atteint la valeur moyenne de 0,24 or, il est de 0,46 chez la série témoin (**Fig. I.10**). Par ailleurs, l'analyse de la variance a montré l'existence d'un effet âge, traitement et interaction âge/traitement hautement significatif ($p = 0,000$) pour le RGS et RHS.

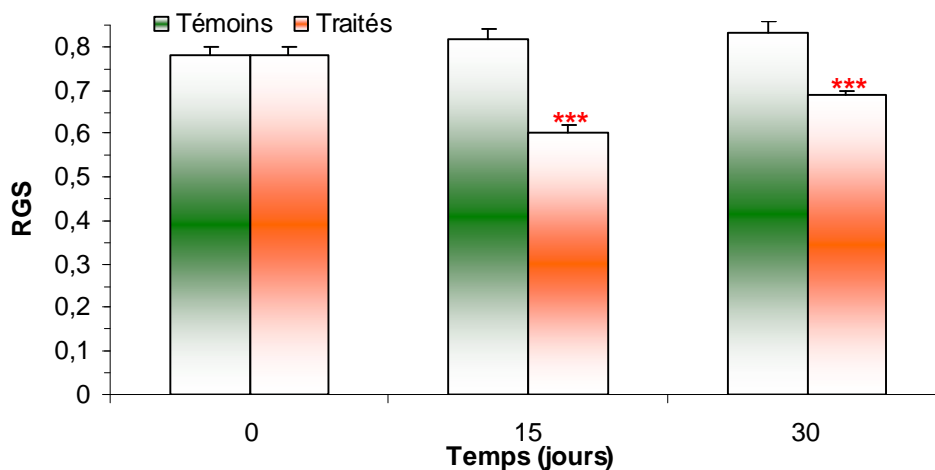


Figure I.9. Effet du DFB ($DL_{90} = 78$ ng/l) sur le rapport gonado -somatique (RGS) chez les femelles de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$; $n = 5-8$).

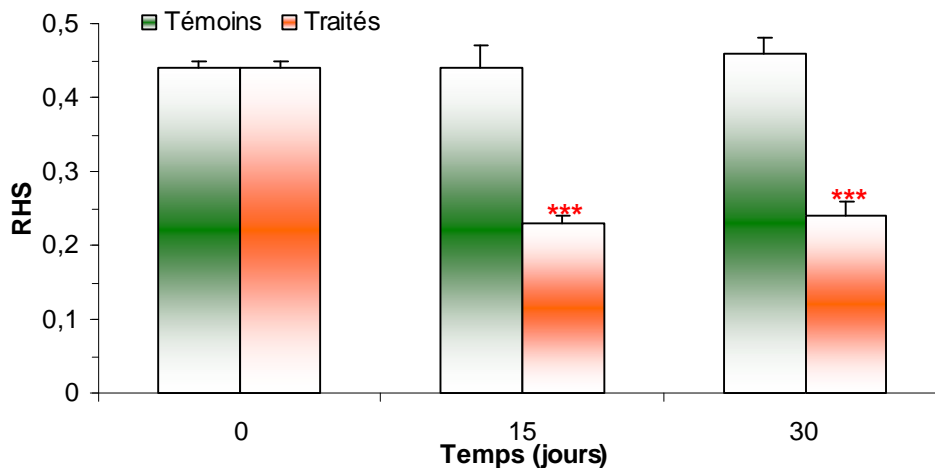


Figure I.10. Effet du DFB ($DL_{90} = 78$ ng/l) sur le rapport hépto -somatique (RHS) chez les femelles de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$; $n = 5-8$).

La comparaison des valeurs moyennes du coefficient de condition des poissons traités avec celles des témoins, indique que le diflubenzuron provoque une diminution significative ($p < 0,05$) de cet indice après 30 jours de traitement (**Fig. I.11**). De plus, l'analyse de la variance à deux critères de classification révèle un effet âge significatif ($p = 0,001$).

3.1.3. Effet du DFB sur la composition biochimique des ovaires

Cette partie, vise à examiner l'effet du DFB sur la composition biochimique des ovaires de *G. affinis* traitées en cont inu, en déterminant les taux de glycogène, de lipides et de protéines à différents temps après traitement (0,15 et 30 jours).

La variation du taux de glycogène ovarien est représentée dans la **figure I.12**. Le traitement semble réduire significativement ($p = 0,02$) le taux de glycogène qui atteint une valeur de $10,28 \mu\text{g}/\text{mg}$ chez les poissons traités contre une valeur de $28,48 \mu\text{g}/\text{mg}$ chez les témoins à la fin du traitement.

Les résultats de l'analyse statistique montrent que le traitement n'a pas d'effet significatif ($p > 0,05$) sur le taux des lipides totaux ovarien au cours du traitement (**Fig. I.13**).

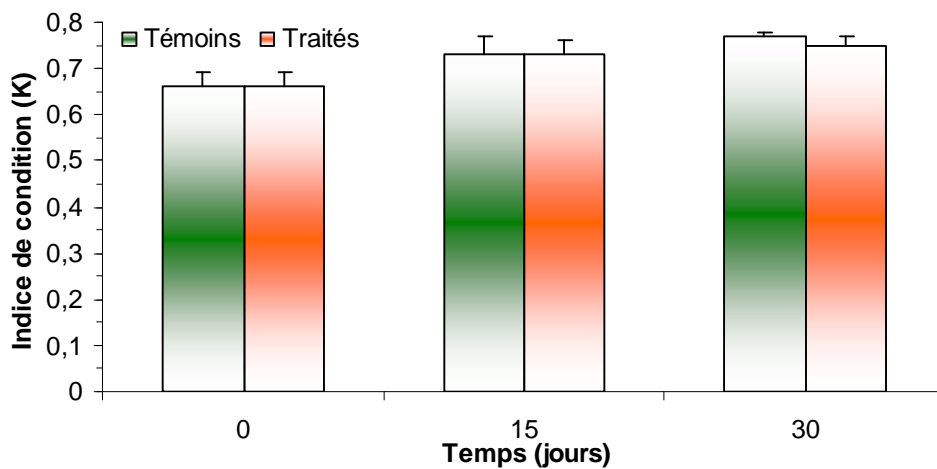


Figure I.11. Effet du DFB ($DL_{90} = 78 \text{ ng}/\text{l}$) sur le coefficient de condition (K) chez les femelles de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$; $n = 5-8$).

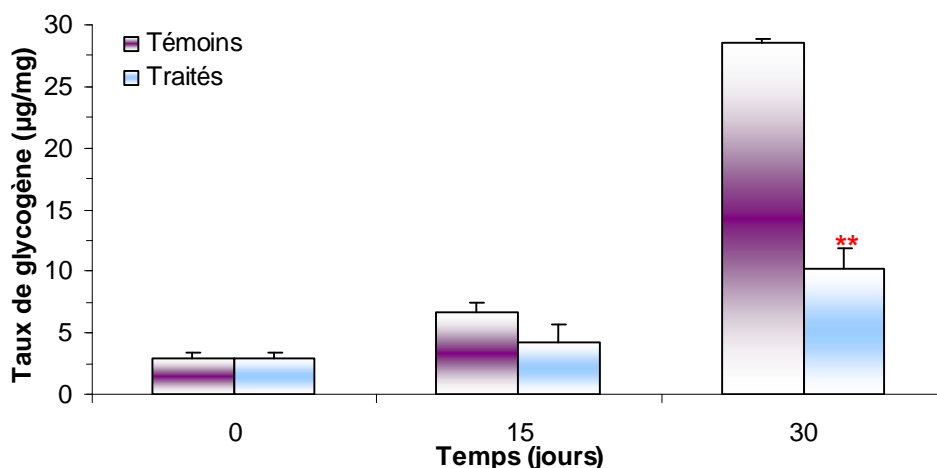


Figure I.12. Effet du DFB ($DL_{90} = 78 \text{ ng}/\text{l}$) sur le taux de glycogène ovariens ($\mu\text{g}/\text{mg}$) chez des femelles adultes de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$; $n = 5-8$).

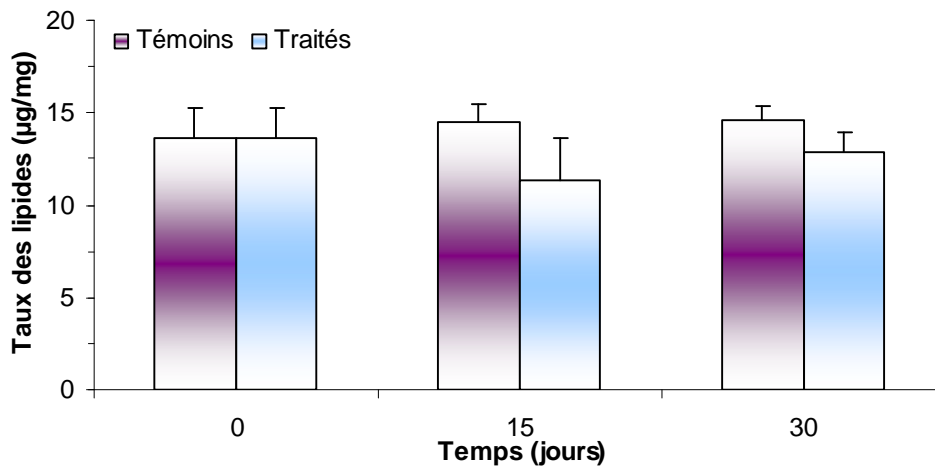


Figure I.13. Effet du DFB ($DL_{90} = 78 \text{ ng/l}$) sur les taux des lipides ovariens ($\mu\text{g/mg}$) chez des femelles adultes de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$; $n = 5-8$).

La détermination de la quantité de protéines dans les ovaires a été réalisée à partir d'une courbe de référence utilisant l'albumine comme protéine standard. Les résultats enregistrés sont représentés dans la **figure I.14**. L'analyse statistique révèle qu'il y a un effet traitement sur les taux ($p = 0,01$) des protéines ovariennes. En effet, les taux de protéines accusent une nette diminution à partir du 15^{ème} jour de traitement. Chez les poissons traités, le taux de protéines est de $18,92 \mu\text{g/mg}$ contre $30,77 \mu\text{g/mg}$ chez les témoins à la fin du traitement.

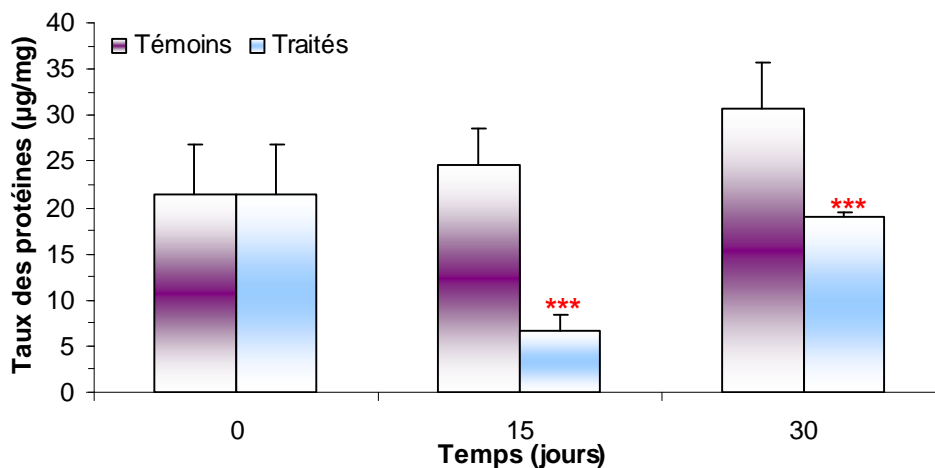


Figure I.14. Effet du DFB ($DL_{90} = 78 \text{ ng/l}$) sur les taux des protéines ovariennes ($\mu\text{g/mg}$) chez des femelles adultes de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$; $n = 5-8$).

3.1.4. Effet du DFB sur la composition biochimique des hépatopancréas

Les résultats concernant la quantification du glycogène hépatopancréatique sont présentés dans la **figure I.15**. Ils mettent en évidence l'effet traitement ($p = 0,0001$) dans le temps sur les taux de glycogène hépatopancréatique. En effet, chez les témoins le taux atteint $62,77 \mu\text{g/mg}$ le 30^{ème} jour du traitement alors qu'il diminue chez les traités à une valeur moyenne de $23,68 \mu\text{g/mg}$.

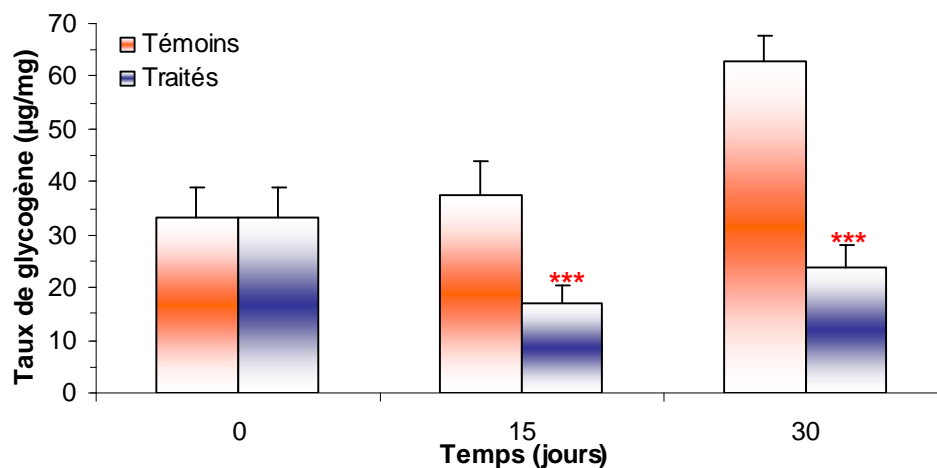


Figure I.15. Effet du DFB ($DL_{90} = 78$ ng/l) sur les taux de glycogène hépatopancréatiques ($\mu\text{g}/\text{mg}$) chez des femelles adultes de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$; $n = 5-8$).

Le DFB induit une réduction significative ($p < 0,05$) des taux de lipides . En effet, l'analyse statistique des données montre qu'il y a un effet traitement ou le diflubenzuron diminue les taux de lipides jusqu'à une valeur d'environ $10,93 \mu\text{g}/\text{mg}$, alors qu'elle atteint la valeur moyenne de $15,33 \mu\text{g}/\text{mg}$ chez les témoins et cela en fin de traitement (**Fig. I.16**) .

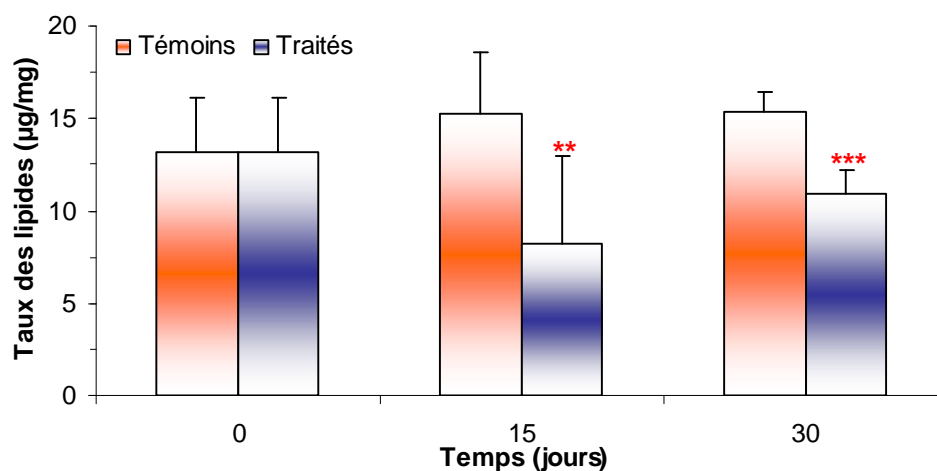


Figure I.16. Effet du DFB ($DL_{90} = 78$ ng/l) sur les taux des lipides hépatopancréatiques ($\mu\text{g}/\text{mg}$) chez des femelles adultes de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$; $n = 5-8$).

Les quantités de protéines hépatopancréatiques ont été déterminées et présentées dans **la figure I.17** . Les résultats relevés, montrent que le traitement réduit significativement ($p = 0,0001$) les taux des protéines hépatopancréatiques au cours du temps. Celui-ci est de $51,47 \mu\text{g}/\text{mg}$ chez la série témoin (30 jours) et diminue à une valeur moyenne de $34,25 \mu\text{g}/\text{mg}$ chez les traitées.

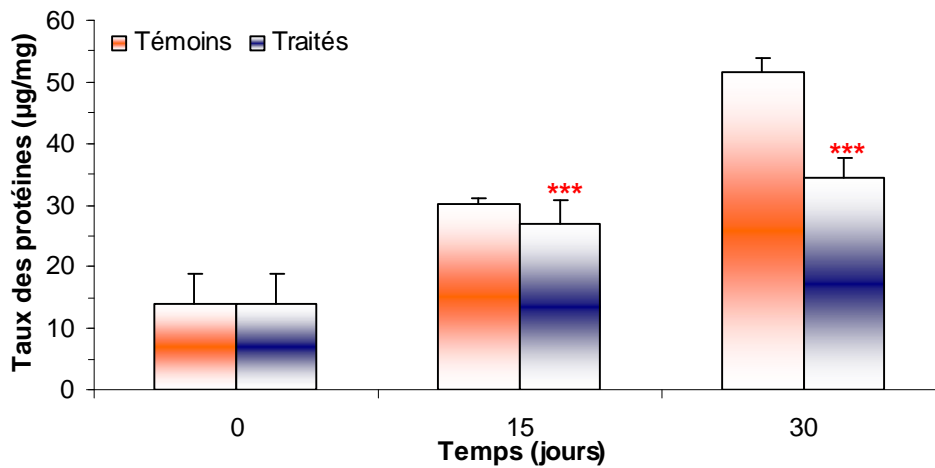


Figure I.17. Effet du DFB ($DL_{90} = 78$ ng/l) sur les taux des protéines hépatopancréatiques ($\mu\text{g}/\text{mg}$) chez des femelles adultes de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$; $n = 5-8$).

3.2. Effets sur les activités enzymatiques

Dans le but d'évaluer l'influence des régulateurs de croissances sur le système enzymatique des organismes aquatiques, quatre biomarqueurs (GSH, GST, LDH et AChE) ont été dosés au niveau des hépatopancréas des femelles adultes de *G. affinis* témoins et traitées avec le dimilin (25% WP). L'insecticide a été administré dans l'eau d'élevage des poissons à une concentration finale de 78 ng/l et l'activité spécifique des enzymes est déterminée à différent moment d'exposition (0, 15 et 30 jours). Le taux de glutathion réduit (GSH) est exprimé en $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines et les activités enzymatiques sont exprimées en mU/mg de protéines et les protéines quantifiées selon Bradford (1976).

3.2.1. Glutathion réduit

Le taux de glutathion réduit ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) a été calculé pour chaque échantillon par application de la formule de Weckberker & Cory (1988). Les résultats obtenus sont représentés graphiquement dans la figure I.18.

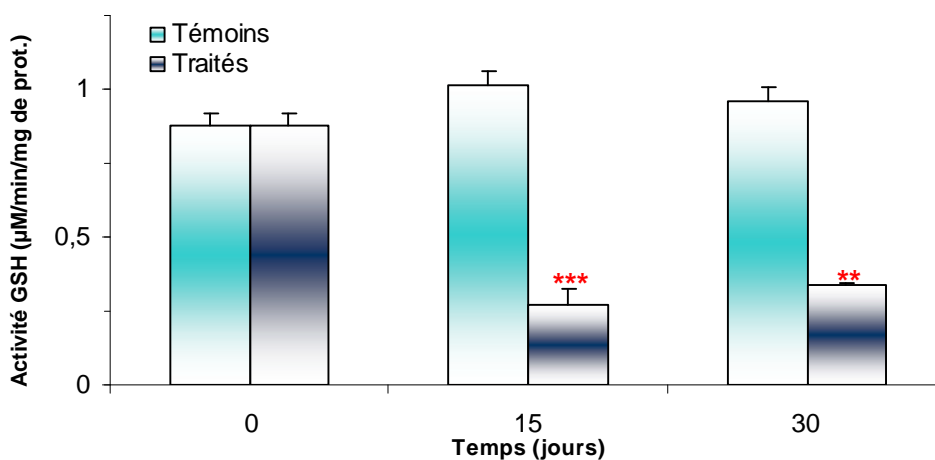


Figure I.18. Effet du DFB ($DL_{90} = 78$ ng/l) sur le taux de glutathion réduit ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) dans l'hépatopancréas chez des femelles adultes de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$, $n = 5-8$).

Chez les femelles témoins, on remarque que le taux de glutathion réduit ne varie pas significativement au cours du temps. Le taux de GSH oscille entre $0,877 \pm 0,044$ $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines à zéro jour pour atteindre $0,957 \pm 0,051$ $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines après 30 jours. Par contre, chez les individus traités le taux de GSH commence à diminuer 24 heures après le traitement et atteint sa valeur minimale $0,268 \pm 0,057$ $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines après deux semaines d'exposition. A la fin du traitement l'activité GSH des femelles traitées augmente et atteint la valeur de $0,341 \pm 0,006$ $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

La comparaison des moyennes enregistrées chez les séries témoins et traitées indique que le diflubenzuron provoque une diminution hautement significative ($p < 0,001$) du taux de GSH après 15 jours de traitement. L'analyse de la variance à deux critères de classification (traitement/ temps) révèle qu'il y'a un effet traitement, temps et interaction traitement/temps hautement significatif ($p < 0,001$).

3.2.2. Glutathion S -transférase

L'effet du traitement avec le dimilin (25% WP) sur l'activité spécifique de la glutathion S -transférase hépatopancréatique a été évalué. La détermination de l'activité GST a été réalisée par application de la formule de [Habig et al. \(1974\)](#).

Les résultats de l'estimation de l'activité spécifique de la glutathion S -transférase des femelles témoins et traitées sont présentés dans la **figure I.19**. Il en ressort que l'activité de la glutathion S -transférase chez les femelles témoins ne présente aucune variation importante pendant la durée du traitement. Cette dernière varie entre $0,755 \pm 0,080$ et $0,799 \pm 0,089$ (mU/mg de protéines) respectivement au début et à la fin du traitement. Chez les femelles traitées l'activité GST diminue puis augmente progressivement avec le temps et atteint une valeur de $1,315 \pm 0,181$ mU/mg de protéines à la fin du traitement.

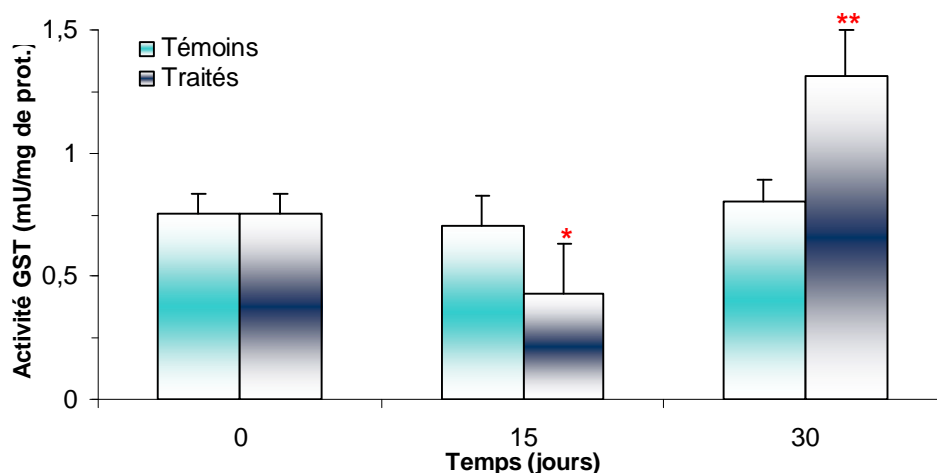


Figure I.19. Effet du DFB ($DL_{90} = 78$ ng/l) sur l'activité spécifique (mU/mg de protéines) de la glutathion S -transférase dans l'hépatopancréas chez des femelles adultes de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$; $n = 5-8$).

L'analyse statistique avec le test «t» de student des activités moyennes enregistrées au cours du temps chez les individus témoins et traités montre que l'insecticide additionné dans l'eau d'élevage induit une augmentation très significative ($p < 0,01$) de l'activité GST à la fin du traitement.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (traitement, temps) révèle un effet traitement, temps et interaction traitement/temps hautement significatif ($p < 0,001$).

3.2.3. Lactate déshydrogénase

L'effet de l'exposition au diflubenzuron sur les enzymes de respiration chez un organisme non ciblé, *G. affinis* a été apprécié par le dosage de l'activité spécifique de la lactate déshydrogénase (LDH). Le dosage est réalisé avec des surnageant d'homogénat des hépatopancréas des poissons témoins et traités utilisant le NAD⁺ comme substrat. L'activité spécifique (mU/mg de protéines) de la lactate déshydrogénase a été estimée par application de la formule de Hill & Levi (1954). La comparaison des activités moyennes obtenus chez les femelles adultes témoins et traitées par le test «t» de student indique que l'activité spécifique de la lactate augmente de manière significative ($P < 0,01$) après 15 jours de traitement atteignant une valeur de $1,062 \pm 0,109$ mU/mg de protéines chez les traités contre la valeur de $0,333 \pm 0,066$ mU/mg de protéines chez les adultes témoins (Fig. 1.20). Par contre, l'activité LDH chez les témoins ne présente aucune variation importante au cours du temps, celle-ci varie de $0,436 \pm 0,079$ mU/mg de protéines au début du traitement à $0,361 \pm 0,093$ mU/mg de protéines à la fin de l'expérience. L'analyse de la variance à deux critères de classification (traitement, temps) montre un effet traitement, temps et interaction /temps hautement significatif ($p < 0,001$).

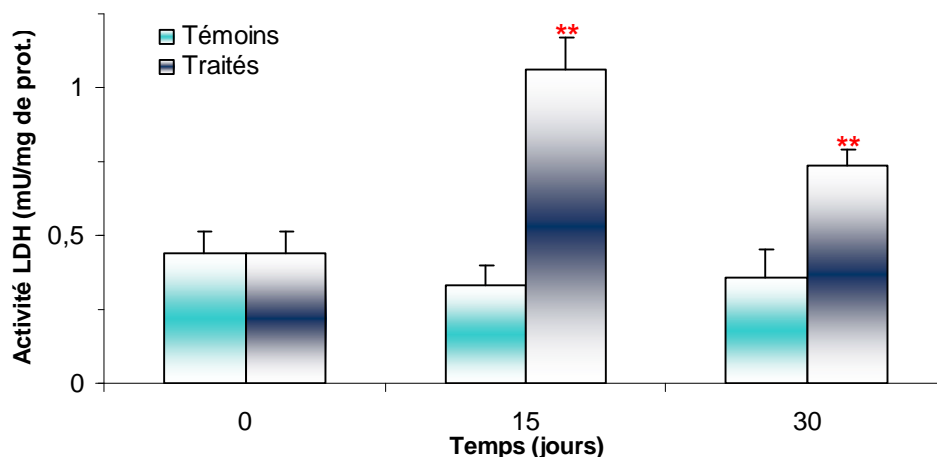


Figure 1.20. Effet du DFB ($DL_{90} = 78$ ng/l) sur l'activité spécifique (mU/mg protéines) de la lactate déshydrogénase dans l'hépatopancréas chez des femelles adultes de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$; $n = 5-8$).

3.2.4. Acétylcholinestérase

Le dosage de l'AChE est une autre possibilité pour évaluer les effets du diflubenzuron sur les activités enzymatiques de *G. affinis*. L'activité spécifique de l'AChE est déterminée selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961) en utilisant les hépatopancréas

des femelles témoins et traitées avec le diflubenzuron comme échantillon et l'acétylthiocholine comme substrat. L'activité spécifique de l'acétylcholinestérase a été calculée par les pentes des équations de régression exprimant l'absorbance en fonction du temps. Les résultats obtenus sont représentés graphiquement dans la **figure I.21**.

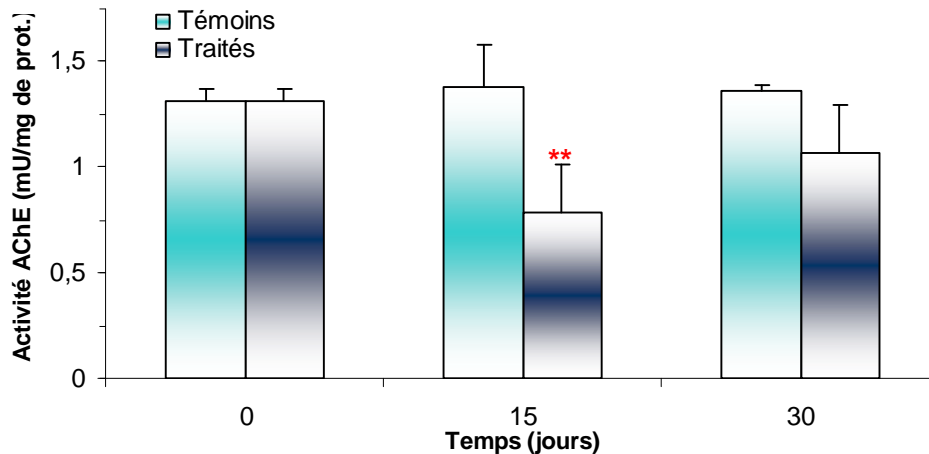


Figure I.21. Effet du DFB ($DL_{90} = 78$ ng/l) sur l'activité spécifique (mU/mg de protéines) de l'acétylcholinestérase dans l'hépatopancreas chez des femelles adultes de *G. affinis* en traitement continu ($m \pm s$; $n = 5-8$).

Chez les individus traités on remarque une diminution significative de l'activité de ce biomarqueur après 15 jours d'exposition, où elle atteint une valeur de $0,789 \pm 0,220$ mU/mg contre $1,381 \pm 0,196$ mU/mg chez les témoins. Cette activité connaîtra par la suite une augmentation progressive avec le temps et atteint la valeur de $1,071 \pm 0,228$ mU/mg de protéines après 30 jours. L'activité de l'AChE ne montre aucune variation importante pendant la durée de l'expérimentation chez les individus témoins. Les valeurs passent de $1,315 \pm 0,055$ mU/mg de protéines au début de l'expérience à $1,366 \pm 0,029$ après 30 jours. La comparaison des activités moyennes enregistrés chez les individus témoins et traités avec le diflubenzuron montre une inhibition significative ($p < 0,05$) de l'activité spécifique de l'AChE après 15 jours de traitement. De plus, l'analyse de la variance à deux critères de classification (traitement/temps) indique un effet traitement hautement significatif ($p < 0,001$).

3.3. Analyse des résidus du dimilin par CLHP

L'analyse des résidus du dimilin (25% WP) additionné dans l'eau d'élevage de *G. affinis* à la dose de $312 \mu\text{g}$ de matière active/l à pour but de détecter la quantité de matière active dans l'eau d'élevage, à la surface et à l'intérieur du corps entier des femelles adultes au cours d'une exposition continue. Les quantités de diflubenzuron ont pu être déterminées à partir des chromatogrammes obtenus après injection en utilisant le diflubenzuron technique comme standard.

3.3.1. Dans l'eau

Les résultats de l'analyse des résidus extraits des échantillons d'eau d'élevage traitée avec le dimilin sont mentionnés dans la **figure I.22**. Cette figure montre que le standard migre approximativement à 8,30 mn (**Fig. I.22A**).

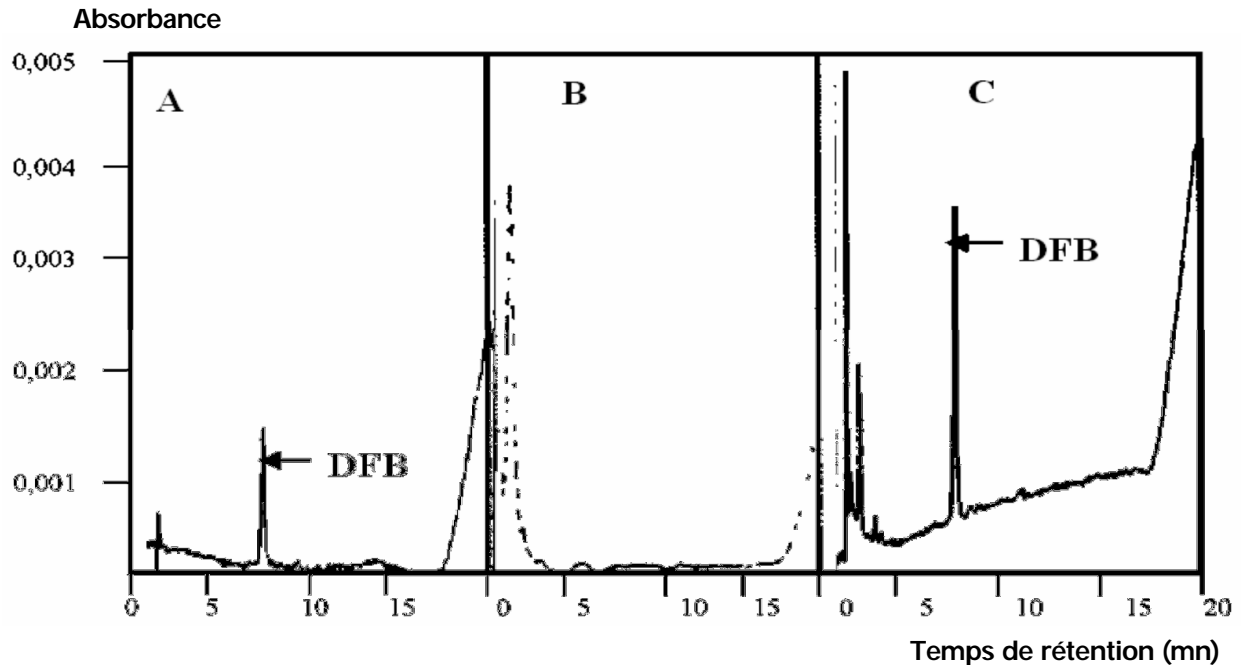


Figure I.22. Chromatogrammes CLHP du standard de diflubenzuron (**A**), eau des poissons témoins (**B**) et eau des poissons traités (**C**) après 28 jours d'exposition au dimilin.

On note l'absence d'interférence d'un quelconque pic à ce temps de rétention dans les extraits d'eau douce témoin (**Fig. I.22B**). Par contre, on détecte la présence de ce produit dans les extraits d'eau douce traitée (**Fig. I.22C**). La quantification des pics des extraits d'eau traitée indique que les taux de résidus détectés diminuent avec le temps. Le t_{aux} de résidus varie de 312 µg/l (concentration de départ) à seulement 187, 2 ± 8,2 µg/l à la fin du traitement (**Tableau I.4**).

Tableau I.4. Analyse par CLHP des résidus du dimilin dans l'eau : concentration et taux de dégradation au cours du temps (m ± s, n = 3).

Temps (jours)	Concentration (µg/l)	Taux de dégradation (%)
0	312,00 ± 0,00	0
7	297,20 ± 9,20	4,80
14	259,80 ± 11,20	16,80
21	215,00 ± 8,70	31,10
28	187,20 ± 8,60	40

3.3.2. A la surface du corps

L'accumulation des résidus du diflubenzuron à la surface du corps des femelles de *G. affinis* après un traitement continu a été détectée par CLHP à différents moments d'exposition.

Les chromatogrammes relatifs au standard, au témoin (eau de rinçage d'un poisson témoin) et à l'échantillon d'eau de rinçage d'un poisson traité avec le dimilin durant 28 jours sont représentés dans la **figure I.23**.

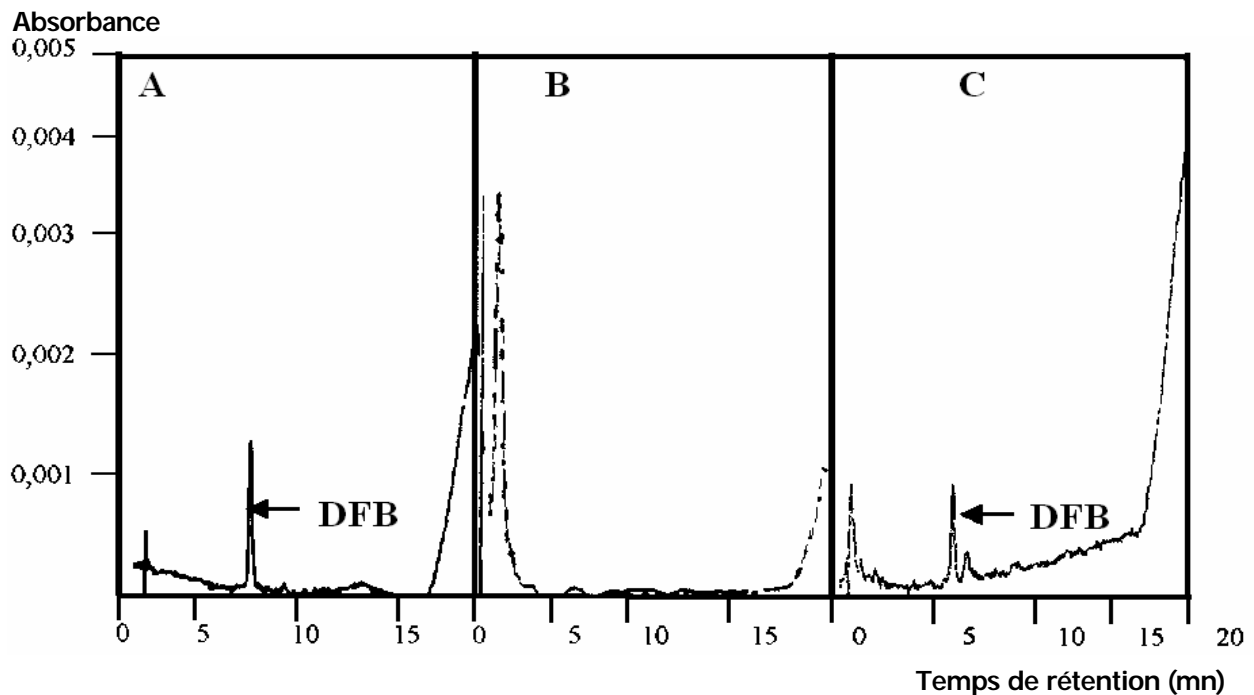


Figure I.23. Chromatogrammes CLHP du standard de diflubenzuron (**A**), extrait d'eau de rinçage du poisson témoin (**B**) et d'un extrait d'eau de rinçage des poissons traités (**C**) après 28 jours d'exposition au dimilin.

Dans nos conditions expérimentales, le diflubenzuron standard a un temps de rétention de 8,30 mn (**Fig. I.23A**) et il n'y a pas d'interférence de pic au niveau du chromatogramme d'extrait d'eau de rinçage témoin (**Fig. I.23B**) mais on remarque la présence du diflubenzuron dans les extraits d'eau de rinçage traité (**Fig. I.23C**). La quantification des pics des extraits d'eau de rinçage des individus traités donne les résultats mentionnés dans le **tableau I.5**.

Tableau I.5. Taux de résidus détecté par CLHP à la surface du corps de *G. affinis* lors d'une exposition continue au dimilin ($m \pm s$, $n = 3$).

Temps (jours)	Taux (ng/ individu)
0	0,00 \pm 0,00
7	156,00 \pm 45,10
14	162,70 \pm 14,00
21	120,00 \pm 22,60
28	78,70 \pm 8,30

Les résultats obtenus montrent que le taux de résidus détecté à la surface du corps atteint sa valeur maximale 162,7 \pm 14,0 ng/individu après 14 jours de traitement. Le taux de résidus connaîtra par la suite une diminution marquée et atteint la valeur de 78,7 \pm 8,3 ng/individu à la fin du traitement.

3.3.3. Dans le corps entier

La quantité d'insecticide incorporée et accumulée dans le corps des femelles de *G. affinis* au cours d'une exposition continue au diflubenzuron a été déterminée par chromatographie liquide haute performance (CLHP). L'analyse par CLHP des extraits de corps entier des femelles adultes témoins et traités avec le dimilin pendant 28 jours donne les chromatogrammes représentés dans la **figure I.24**. Cette figure montre la

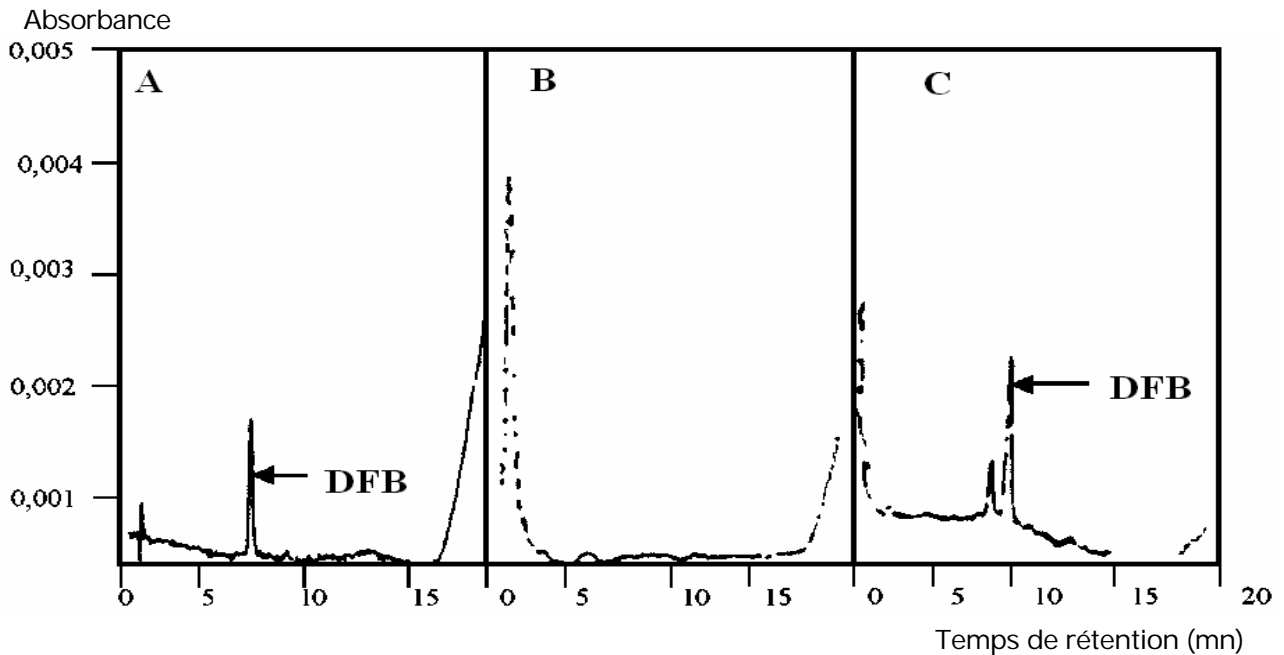


Figure I.24. Chromatogrammes CLHP du standard de diflubenzuron (A), d'un extrait du corps des témoins (B) et d'un extrait du corps des femelles traitées (C) après 28 jours d'exposition au dimilin.

présence du diflubenzuron dans les extraits des corps entiers des femelles traitées et l'absence de cet insecticide dans les extraits des corps des femelles témoins. Les résultats obtenus après la quantification des pics des extraits de corps des femelles traitées à différent moment d'exposition sont représentés dans le **tableau I.6**. Les résultats indiquent que le taux de résidus du diflubenzuron dans le corps augmente progressivement avec le temps d'exposition atteignant la valeur de $160,0 \pm 11,3$ ng/individu à la fin du traitement.

Tableau I.6. Taux de résidus détecté par CLHP à l'intérieur du corps de *G. affinis* lors d'une exposition continue au dimilin ($m \pm s$, $n = 3$).

Temps (jours)	Taux (ng/ individu)
0	$0,00 \pm 0,00$
7	$54,20 \pm 4,50$
14	$101,50 \pm 3,30$
21	$132,60 \pm 14,30$
28	$160,00 \pm 11,30$

4. DISCUSSION

4.1. Aspects morphologiques

La croissance est un élément essentiel d'aptitude, et peut avoir un impact sur le succès des populations naturelles (Burrows & Hughes, 1990 ; Wo *et al.*, 1999). La croissance est considérée comme indicateur de pollution chez les invertébrés aquatiques (Widdows *et al.*, 1997 ; Gomot, 1997). Les variations du coefficient de condition peuvent aider à localiser dans le temps l'émission des œufs, tout en traduisant l'état physiologique des femelles en particulier (Deniel, 1983). Cet indice varie avec l'état nutritionnel et reproductif du poisson (Phillips & Rainbow, 1993). Les modifications des RHS et RGS au cours du temps permettent de suivre les cycles hépatiques et sexuels, et précisent le rôle du foie et de la gonade au cours de la croissance (Stequert, 1971 ; Koya *et al.*, 1998).

Nos résultats ont permis de mettre en évidence que le DFB, additionné à l'eau d'élevage des femelles adultes de *G. affinis* à la dose de 78 ng/l, perturbe leur croissance pondérale. Par ailleurs, le DFB manifeste une toxicité plus élevée à l'égard des alevins, où il semble réduire significativement leur croissance linéaire et pondérale. Nos résultats sont en accord avec des travaux antérieurs. En effet, Drez *et al.* (2000), ont observé une réduction significative de la croissance des mâles et des femelles de *Gambusia holbrooki* après traitement avec le 4-nonylphénol. Aissaoui (1998) rapporte que le traitement des femelles adultes de *G. affinis* par le lindane pendant un mois, induit une réduction significative du poids. Draredja-Beldi & Soltani (2003) signalent que le diflubenzuron provoque une réduction de la croissance des alevins de *G. affinis* après 30 jours d'exposition. Enfin, Leung & Furness (2001) enregistrent une perturbation de la croissance chez le mollusque gastéropode *Nucella lapillus* exposé au cadmium.

D'autre part, dans nos conditions expérimentales, le traitement au DFB (78 ng/l) affecte les indices métriques des femelles. En effet, le DFB réduit significativement les rapports gonadosomatiques, hépatosomatiques et le coefficient de condition.

Par ailleurs, l'application topique du DFB à des organismes visés comme les nymphes de *T. molitor* nouvellement exuviées, retarde l'exuviation (Soltani *et al.*, 1983), et perturbe le développement nympho-adulte via la sécrétion cuticulaire et la production d'ecdystéroïdes (Soltani *et al.*, 1984). Aussi, l'injection du flucyloxuron et du triflumuron (des dérivés de la benzoylphénylurées) aux nymphes de *T. molitor* nouvellement exuviées cause une diminution de l'épaisseur des deux couches cuticulaires (Soltani *et al.*, 1993, 1996). Des résultats similaires ont été obtenus chez les crustacés ; Weis & Ma (1987) ont rapporté que le dimilin perturbe le développement et la reproduction de *Limulus polyphemus* et entraîne d'importantes malformations et même des mortalités chez les larves. Gulka *et al.*, (1982) ont démontré que le DFB affecte le développement de *Balanus eburneus*, crustacé cirripède, les perturbations sont observées même à de faibles doses.

Des traitements au DFB à différentes concentrations ont été appliqués chez plusieurs espèces aquatiques notamment des crustacés et des poissons. Deux microcrustacés, *Ceriodaphnia* sp. et *Daphnia laevis* ont été traités avec le DFB (12 µg/l). Le produit entraîne l'élimination, des deux populations au bout d'une semaine d'application (Ali & Mulla, 1978). On enregistre aussi, une réduction de 75% des populations de *Daphnia* sp.,

suite à un traitement au DFB (4 µg/l) et l'élimination totale des daphnies est observée à la dose de 7 µg/l (Ali & Mulla, 1978). Morsli (1994), a trouvé que le DFB provoque une inhibition du cycle de mue et par conséquent la mise en place de la cuticule pré-exuviale chez *Penaeus kerathurus*. Le DFB a été également testé chez des poissons ostéichtyens entre autres, la truite arc-en-ciel, la truite des ruisseaux, le saumon atlantique, la perche (Mayer & Ellerseick, 1986) et le poisson chat (Julin & Sanders, 1978) chez lesquels il s'avère sans effets.

4.2. Aspects biochimiques

Les Poeciliidés stockent de l'énergie à la fin de l'été et en automne pour hiverner et se reproduire au printemps (Meff & Snelson, 1993). L'importance des réserves dans l'évolution des organismes est liée à deux processus fondamentaux ; la croissance et la reproduction (Meff, 1991). Les ovocytes des poissons, au cours de la croissance, synthétisent et emmagasinent un grand nombre de composés au poids moléculaire élevé principalement les protéines (vitellogénine) et les lipides. Une fois que le développement ovocytaire est terminé, c'est alors que le glycogène sera utilisé comme premier fournisseur de l'énergie métabolique (Soengas *et al.*, 1993). Le foie constitue l'organe de stockage et de réserve chez les poissons et c'est la plaque tournante de tous les métabolites. En effet, après avoir traversé les branchies, les pesticides sont transportés vers le foie *via* la circulation sanguine pour une éventuelle détoxification. *G. affinis* ne possède pas un foie bien défini, les cellules sont confondues avec celles du pancréas d'où l'appellation, hépatopancréas. Cet organe est maintenu dans une enveloppe fibreuse et ferme, sa base antérieure est attachée à la paroi du corps, il est constitué de cellules polygonales avec un noyau bien distinct contenant à la périphérie une importante quantité de chromatine, les cellules hépatopancréatiques sont irrégulièrement distribuées et elles sont fortement concentrées en glycogène. Chez les poissons, l'hépatopancréas constitue l'organe cible des différentes toxines (Suteau *et al.*, 1987).

Les données acquises sur l'effet du dimilin sur les différents métabolites au niveau des ovaires et des hépatopancréas des femelles de *G. affinis* traitées montrent que le traitement affecte, de manière significative, la composition biochimique de ces deux organes. On enregistre, notamment, une diminution de la teneur en glycogène hépatopancréatique plus importante que le glycogène ovarien. La diminution des concentrations des glucides a été également observée chez les crustacés *P. kerathurus* traités au DFB (Morsli, 1994) de même que chez *T. molitor*, la tréhalosémie est réduite (Soltani, 1990). Cette diminution du glycogène dans l'ovaire et l'hépatopancréas pourrait s'expliquer par une perturbation du système enzymatique responsable de la condensation du glucose en glycogène.

Chez les Téléostéens, les lipides sont accumulés dans les œufs et constituent la réserve nutritionnelle durant l'embryogenèse (Wallace, 1985). Ces lipides gagnent les ovaires soit *via* le sang en provenance de l'hépatopancréas (Black & Skinner, 1987), soit *in situ*, par une synthèse endogène au niveau de l'ovocyte (Wiegand & Idler, 1982). Nos résultats concernant le métabolisme lipidique des femelles traitées au DFB ont révélé que le traitement n'a aucun effet sur le taux des lipides ovariens. Cependant, le DFB entraîne

une diminution des taux de lipides hépatopancréatiques. Ces résultats sont en accord avec les données de [Aissaoui \(1998\)](#), qui constate un effet significatif du lindane sur la réduction des concentrations lipidiques au niveau de l'hépatopancréas. Des études antérieures montrent que chez les organismes aquatiques, les lipides servent de réservoir protecteur contre l'effet toxique du lindane et d'autres pesticides lipophiles car, ils sont massivement bioconcentrés dans le corps gras ([Geyer et al., 1994](#)). Le traitement au DFB des femelles de *T. molitor*, entraîne une diminution significative du taux des lipides du corps gras au 6^{ème} jour de traitement ([Khebbeb, 2000](#)). Les divers résultats suggèrent une interférence du DFB avec la reproduction en générale et le processus de la vitellogénèse en particulier selon un mécanisme encore méconnu.

Les protéines jouent un rôle fondamental dans l'organisme biologique. Elles peuvent assurer la catalyse biochimique, la régulation hormonale et s'intégrer dans la cellule en tant que constituants structuraux en même temps que les lipides et les glucides ([Jacob & Monod, 1961](#)). Des travaux faits avec les dérivés de la benzoylphénylurée comme par exemple l'injection du triflumuron (TFM) à des nymphes de *T. molitor* nouvellement exuviées réduit le contenu en chitine, mais sans effet sur le taux en protéines cuticulaires ([Soltani et al., 1996](#)). L'essai conduit en traitement continu sur les femelles de *G. affinis*, indique que les taux des protéines ovariennes et hépatopancréatiques sont significativement réduits par le dimilin comparativement aux témoins. Des résultats similaires ont été obtenus chez les femelles de *G. affinis* traitées au lindane ([Aissaoui, 1998](#)). Des expériences réalisées par [Soltani et al. \(1999\)](#) ont montré que le TFM, un dérivé des benzoylphénylurées, affecte le taux ovarien des protéines chez *G. affinis*. Les travaux menés *in vivo* et *in vitro* sur l'incorporation ovarienne de la leucine tritiée ont montré que le DFB inhibe la synthèse protéique dans les ovaires de *T. molitor* traduisant ainsi son impact sur la vitellogénèse ([Soltani-Mazouni & Soltani, 1995](#)).

Le contenu des ovaires et des hépatopancréas en glycogène, lipides et protéines présente une nette réduction chez les individus traités ; ces perturbations élucident la sensibilité de *G. affinis* à l'égard du diflubenzuron. Cet insecticide affecte le métabolisme lipidoglycidique et protéique, avec des conséquences sur la croissance et la reproduction de ce poisson.

4.3. Aspects enzymatiques

Face au dommage causé par les différents xénobiotiques, les cellules vivantes se défendent grâce à plusieurs systèmes de détoxification tels que les monooxygénases, les estérases, les P450 réductases et les hydrolases ([Scott, 1999](#)).

Après leur pénétration dans les organismes, les polluants organiques subissent le plus souvent des transformations métaboliques, catalysées par différents systèmes enzymatiques capables de prendre en charge des substrats de nature variée. Toutes ces enzymes augmentent l'hydro-solubilité des molécules qu'ils prennent en charge afin d'en faciliter l'élimination par l'organisme ([Scott, 1999](#)). L'activation métabolique de certaines molécules suite à leur métabolisation est cependant possible. Les réactions de biotransformation sont divisées en deux réactions : phase I et phase II. La première phase (phase I) est assurée par des enzymes qui catalysent l'oxydation et la fonctionnalisation

des xénobiotiques. La phase II est réalisée par des enzymes qui assurent la conjugaison des molécules fonctionnalisées à des substrats endogènes. Le glutathion réduit (GSH) et la glutathion-S-transférase (GST) tiennent une place importante parmi les enzymes de la phase II.

Le glutathion réduit est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-Cysteinyl glycine) qui joue un rôle central dans les processus de défense antioxydant intracellulaire (Arrigo, 1999 ; Sies, 1999). Ce tripeptide constitue le composé thiol majeur intracellulaire ; il joue, grâce à son groupement thiol de la cystéine, un rôle important dans la protection des structures cellulaires et tissulaires (Yo *et al.*, 1993 ; Michelet *et al.*, 1995). De plus, le glutathion réduit est un cofacteur de plusieurs enzymes, qui catalysent la détoxification et l'excrétion de plusieurs composés toxiques. Parmi ces enzymes la glutathion peroxydase (GPx) réduit les hydroxydes en alcools primaires, la glutathion synthétase intervient dans la biosynthèse du GSH, et enfin, la glutathion-S-transférase (GST) intervient dans les réactions de conjugaisons des électrophiles (Saint-Denis *et al.*, 1998). Diverses recherches ont montré le rôle du GSH dans la détoxification des xénobiotiques (Reed, 1990 ; Reidy, 1990, Avci *et al.*, 2005).

La diminution des taux de GSH indique directement l'existence de réactions de détoxification des métabolites toxiques. Le GSH a la capacité de réduction et c'est un donneur de proton aux peroxydes. Ces derniers sont transformés alors en alcools primaires non toxiques et solubles dans l'eau. Cette réaction est catalysée par la GPx (Bast & Haenen, 1984 ; Pierce & Tappel, 1987). Suite à cette réaction, le GSH est oxydé en glutathion oxydé (GSSG) ce qui provoque la diminution du taux de GSH dans la cellule. Dans les réactions de conjugaison, le GSH joue le rôle d'un nucléophile via son groupement (-SH), ces réactions sont catalysées par la GST (Chasseaud, 1976 & Addams *et al.*, 1983).

Nos résultats révèlent que le DFB administré dans l'eau d'élevage des adultes de *G. affinis* provoque une diminution du taux de GSH hépatique après 15 et 30 jours d'exposition. En accord avec nos résultats, la diminution du GSH a été également observée par Draredja-Beldi & Soltani (2003) dans le corps entier des femelles de *G. affinis* traitées avec le DFB et par Aissaoui (1998) dans l'hépatopancréas de la même espèce exposée au lindane. La diminution du taux de GSH a été observé au niveau des branchies et de la glande digestive des moules traités avec le mercure et le cuivre (Canesi *et al.*, 1999), ainsi que chez la truite arc-en-ciel exposée à différents niveaux de fuel (Steadman *et al.*, 1991). Le taux de GSH a été réduit chez les rats traités avec le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et le benzopyrane (Della *et al.*, 1994). La relation entre la diminution du taux de GSH et le niveau de contamination est rapportés par Ringwood *et al.*, (1999) chez les juvéniles de la moule, *Crassostrea virginica*, exposées à un mélange de polluants industriels et par Cossu *et al.* (2000) chez le bivalve, *Unio tumidus*, exposé au cuivre. Cependant, quelques études ont montré une augmentation du taux de GSH comme enregistré dans le foie de la truite arc-en-ciel traitée avec le cadmium (Ait-Aissa *et al.*, 2003). Cette augmentation de glutathion correspond à un mécanisme précoce de défense cellulaire et serait suffisant pour prendre en charge les premières atteintes cellulaires, évitant ainsi l'apparition d'un stress oxydant plus important. Le taux de GSH augmente

aussi chez les rats traités au méthyl mercure (Woods & Ellis, 1995), chez les poissons exposés au plomb (Thomas & Juedes, 1992) et chez le bivalve *Mytilus galloprovincialis* traité avec les métaux lourds (Reegoli & Principato, 1995).

Les glutathion-S-transférases représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles, essentiellement cytosoliques impliquées dans des opérations diverses de transport et de biosynthèses intracellulaires (Georges & Buchanan, 1990). Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques parmi lesquels figure la détoxification de nombreux xénobiotiques (Habig *et al.*, 1974 ; Hayes & Dulford, 1996). Mais la fonction la plus étudiée en ce qui concerne la prévention de la pollution dans l'environnement demeure leur capacité de catalyse des réactions de conjugaison entre un peptide, le glutathion et les molécules réactives comportant des sites électrophiles, capable de réagir dangereusement avec les macromolécules comme les acides nucléiques (ADN, ARN). La catalyse de la conjugaison du glutathion réduit avec certains substrats représente une étape dans la formation de composés qui seront moins toxiques et plus hydrosolubles que les molécules de départ (Chatterjee & Bhattacharya, 1984). Le rôle physiologique de la GST dans la protection de l'organisme contre de nombreux produits toxiques a été démontré chez les poissons (Jakoby & Keen, 1977 ; Chatterjee & Bhattacharya, 1984 ; Gallagher *et al.*, 2001 ; Ait-Aissa *et al.*, 2003), chez les bivalves (Hygget *et al.*, 1992 ; Burgeot *et al.*, 1996 ; Stien *et al.*, 1998) et chez les mammifères (Baars & Beimer, 1980 ; Dixit *et al.*, 1980). Dans la présente étude, on note une augmentation de l'activité spécifique de la GST hépatique à partir de 24 heures jusqu'à 30 jours. L'augmentation de l'activité GST après traitement est une forme de défense qui se traduit par la détoxification de l'insecticide dans l'organisme. Dans cette étude l'augmentation de l'activité GST est accompagnée d'une diminution du taux de GSH, ce qui suggère que l'insecticide conjugué par le GSH est catalysé par la GST dans le but de diminuer son effet toxique (Chatterjee & Bhattacharya, 1984). La stimulation de l'activité GST hépatique a été aussi observée par Teles *et al.* (2003) chez le poisson *Anguilla anguilla* exposé à différentes concentrations de naphthalène pendant 48 heures. De plus, Canesi *et al.* (1999) ont montré une induction de l'activité GST chez les moules traitées avec un composé organochloré. Une stimulation de la GST a été aussi observée dans les glandes digestives des moules traitées avec le mercure (Canesi *et al.*, 1999).

De nombreux mécanismes physiologiques tels que la fonction des enzymes, la contraction des muscles et la régulation osmotique sont directement liées aux propriétés des membranes biologiques (Neff, 1979). Les enzymes de respiration telles que la citrate synthétase (CS) et la lactate déshydrogénase (LDH), sont impliquées dans la respiration cellulaire et la production de l'adénosine triphosphate (ATP) par la glycolyse (Stryer, 1988). La lactate déshydrogénase est l'enzyme responsable de la régénération du NAD⁺ à partir du NADH pour assurer la continuation du cycle glycolytique (Gagnon & Holdway, 1999). Elle appartient à la famille des oxydoréductases, décrite pour la première fois par Meyerhof en 1919. La mesure de l'activité LDH a été largement utilisée en biologie clinique comme diagnostic des lésions cellulaires et tissulaires (Tietz, 1987 ; Asztalos *et al.*, 1999 ; Gupta *et al.*, 1991). Cependant, diverses études ont montré que le changement de l'activité des enzymes de respiration peut être utilisé comme bio-marqueurs de

pollution chez les organismes marins (Eertman *et al.*, 1996 ; Gagnon & Holdway, 1999 ; Cohen *et al.*, 2001 ; Long *et al.*, 2003).

Nos résultats révèlent une augmentation significative de l'activité LDH dans l'hépatopancréas des femelles de *G. affinis* à partir du 15^{ème} jours d'exposition au DFB. La régression de l'activité LDH après 15 jours pourrait s'expliquer par la détoxification du DFB dans l'hépatopancréas, et par sa dégradation dans l'eau, à la surface et dans le corps des femelles traitées (40% de la concentration de départ est dégradée au bout de 30 jours). Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Long *et al.* (2003), qui signalent une augmentation suivie d'une diminution de l'activité LDH hépatique chez la moule, *Mytilus edulis* exposée à différentes concentrations d'hydrocarbures. Selon Ribeiro *et al.* (1999), l'activité LDH est altérée par les insecticides organophosphorés et organochlorés. L'augmentation de l'activité LDH après traitement a été enregistrée chez *Blattella germanica* traité avec l'acide borique (Sifi, 2002) et chez *Macquaria novemaculeata* après exposition au pétrole brut (Cohen *et al.*, 2001).

Contrairement aux enzymes citées, l'acétylcholinestérase ne joue aucun rôle dans la détoxification des xénobiotiques chez les êtres vivants. Cette enzyme est impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux à travers l'organisme. Dans les jonctions interneuronales et neuromusculaires, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine (ACh), qui permet la transmission du message nerveux d'une cellule à l'autre. Une fois l'information transmise, l'acétylcholine est rapidement inactivée par l'inhibition de l'enzyme par de nombreux toxiques entraînant une accumulation du médiateur chimique dans l'espace synaptique, qui maintient de ce fait une transmission permanente de l'influx nerveux, laquelle conduit généralement à la tétanie musculaire et à la mort (Bocquené, 1996 ; Bairy, 2000). L'AChE est essentiellement inhibée par deux classes d'insecticides, les organochlorés et les carbamates (Toutant, 1989 ; Fournier & Muter, 1994 ; Ecobichon, 1996 ; Tomita *et al.*, 2000). Cependant, certaines études ont mis en évidence l'inhibition de l'activité de l'AChE par d'autres contaminants environnementaux incluant certains agents surfactants, les hydrocarbures combustibles et les métaux lourds (Herbert *et al.*, 1995 ; Bocquené *et al.*, 1997 ; Forget *et al.*, 1999 ; Kammenga *et al.*, 2000 ; Dellali *et al.*, 2001). L'inhibition de l'activité de l'AChE peut avoir des conséquences sur le comportement des êtres vivants : la recherche de la nourriture, la recherche de partenaire sexuel et le soin des jeunes (Little, 1990 ; Richmonds & Dutta, 1992 ; Hart, 1993 ; Saglio *et al.*, 1996 ; Khessiba *et al.*, 2001). L'analyse de l'activité de l'AChE dans les différents tissus des organismes aquatiques est considérée comme biomarqueur de la contamination des milieux aquatiques par les pesticides anticholinestérasiques (Zinkl *et al.*, 1991 ; Fernandez-Vega *et al.*, 1999 ; Dutta & Arends, 2003).

Le dosage de l'activité de l'AChE dans l'hépatopancréas des femelles de *G. affinis* exposées au diflubenzuron à la dose de 78 ng/l révèle une diminution significative de l'AChE dès les premiers jours d'exposition. Après 15 jours de traitement, l'activité de l'AChE tend à redevenir normale. La diminution de l'activité de l'AChE dans les premiers jours de l'expérience est expliquée par l'inhibition de cette enzyme par le diflubenzuron. La détoxification de l'insecticide dans l'organisme et sa dégradation dans l'eau

expliquent l'augmentation de l'activité après deux semaines d'exposition. Selon [Abdullah et al. \(1994\)](#), la dégradation des insecticides dans l'environnement aquatique réduit leur effet toxique, et permet aux organismes de rétablir leur activité enzymatique. Le rétablissement de l'activité de l'ACHé dépend de plusieurs facteurs : l'espèce, le type de pesticide et l'inhibition de l'ACHé. L'inhibition de l'ACHé chez les poissons a été observée par [Dutta & Arends \(2003\)](#) dans le cerveau de *Lepomis macrochirus* après traitement avec l'endosulfon et par [Fernandez-Vega et al. \(2002\)](#) dans le muscle et le cerveau d'*Anguilla anguilla* traitée par différentes concentrations de thiobencarb (herbicide). Des résultats similaires sont observés chez la moule *Amblima plicata* intoxiquée par le chloropyrifos ([Fleming et al., 1995](#) ; [Wendi et al., 2001](#)).

4.4. Analyse des résidus

Les taux de résidus de dimilin ont été déterminés chez plusieurs espèces animales et végétales : dans les champignons ([Barnes et al., 1995 a](#) ; [Mitchell & Kilpatrick, 2003](#)), dans les fruits ([Barnes et al., 1995 b](#) ; [Gamon et al., 1998](#) ; [Valenzuela et al., 2000](#)), dans les plantes ([Abdel Monem & Mumma, 1981](#)), dans les forêts ([Rodriguez et al., 2001](#)), dans les sols ([Sundaram & North, 1989](#) ; [Selvik et al., 2002](#)), dans le corps entier des insectes ([Spates & Wright, 1980](#) ; [Griffith et al., 2000](#)) et dans le lait de vaches ([Van Der Leek et al., 1991](#)).

Le diflubenzuron est dégradé dans l'environnement par hydrolyse et photodégradation ([Sundram et al., 1991](#)) et donne des métabolites majeurs : 2,6-difluorobenzamide (2,6-DFBA), 4-chlorophényluree (4-CPU), 4-chloroacétanilide (4-CAA), 4-chloroaniline (4-CA), et N-méthyl-4-chloroaniline (NM-4-CA). Le 4-CA et le NM-4-CA sont considérés comme des produits mutagènes ([Rodriguez et al., 2001](#)). La matière organique est le facteur majeur qui influence l'absorption et la dégradation du diflubenzuron dans l'eau douce, l'eau de mer et les sédiments. La demi-vie de cet insecticide dans l'eau douce est approximativement 3 jours à un pH 10 et une température de 36° C. Le diflubenzuron est plus persistant à un pH < 6 et sa demi-vie est approximativement 9 jours ([Fisher & Hall, 1992](#)). Chez les mammifères et les oiseaux et à des doses recommandées le diflubenzuron est sans effet toxique. Son métabolisme est réalisé par hydroxylation, conjugaison et clivage des urées ([Opdycke et al., 1982](#)).

Dans notre étude, l'analyse des résidus du diflubenzuron par CLHP a été effectuée dans l'eau d'élevage, à la surface et à l'intérieur du corps des femelles de *G. affinis* exposées à ce produit pendant 28 jours. La quantification de cet insecticide a pour but de déterminer la quantité de DFB ayant pénétré et accumulé dans le corps ainsi que sa dégradation dans l'eau. Les résultats montrent une diminution progressive de la concentration du produit dans l'eau, 60% de la concentration de départ est détectée après 28 jours d'exposition. De même, le taux de résidus détecté à la surface est diminué avec le temps, il passe de 74 à 33% à la fin du traitement. Par contre, à l'intérieur du corps, on enregistre une augmentation progressive du taux de résidus. La diminution de la concentration dans l'eau et à la surface est due à la pénétration de l'insecticide dans le corps et à sa dégradation dans l'eau. La dégradation du diflubenzuron dans l'environnement aquatique a été rapportée par plusieurs chercheurs. [Soltani & Morsli](#)

(2003) ont trouvé que le diflubenzuron additionné dans l'eau de mer à la dose de 0,01 mg/l, présente une dégradation de 40% au bout de 14 jours. De plus, Colwel & Schaefer (1980) ont montré que le taux de résidus du diflubenzuron détecté dans le corps du poisson-chat varie de 291 à 466 ppm après 24 heures, mais il est négligeable après 7 jours. Selon Wauhope *et al.*, (1992), le diflubenzuron persiste rarement plus que quelques jours dans le sol et l'eau, donc l'effet toxique anticipé de l'application à ces endroits doit être aiguë.

L'augmentation du taux de résidus à l'intérieur du corps des femelles est expliquée par l'accumulation de ce produit dans le corps des poissons. Le phénomène d'accumulation des résidus du DFB chez les poissons est observé par Ahmed & Eid (1991) dans le foie et les lamelles des branchies d'*Oreochromis niloticus* exposé à ce produit pendant 21 jours. En effet, cette espèce présente une accumulation de 76 à 99% plus grande que celle détectée dans l'eau d'élevage à des concentrations de 2,5 et 5 mg/l, respectivement. Chez les insectes, l'accumulation du diflubenzuron a été rapportée par Khebbeb *et al.* (1997) dans le corps gras de *T. molitor* traité par ingestion avec deux doses 5 et 10 mg/g et par Soltani *et al.* (1994) dans les ovaires de *T. molitor* et ceux de *Cydia pomonella* (Soltani & Soltani -Mazouni, 1992).

5. CONCLUSIONS

Ce travail été réalisé en vue d'évaluer l'action d'un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le dimilin sur certains aspects morphométriques, biochimiques, enzymatiques ainsi que l'analyse des résidus par CLHP de cet insecticide chez *Gambusia affinis* (Cyprinodontiformes : Poeciliidae), prédateur des larves de moustiques.

L'étude morphométrique, montre que le dimilin administré à la concentration de 78 ng/l correspondant à la DL₉₀ à l'égard des larves du 4ème stade de *Culex pipiens*, réduit significativement la croissance linéaire et pondérale des alevins. Par ailleurs, il s'avère que le DFB (78 ng/l) additionné à l'eau d'élevage des femelles adultes, n'affecte que la croissance pondérale. Concernant les indices métriques, le DFB affecte de manière très significative l'évolution des RGS et RHS et présente un effet moins marqué sur le coefficient de condition K.

La composition biochimique des ovaires et des hépatopancréas a fait apparaître un effet traitement sur les différents métabolites (glycogène, lipides et protéines) chez les femelles traitées en continu.

Le dosage du glutathion réduit et de l'activité spécifique de la GST, LDH et l'AcChE révèle une induction des systèmes enzymatiques, se traduisant par une diminution du taux de GSH et de l'activité de l'AcChE et l'augmentation de l'activité de la GST et LDH. De plus, la dégradation de l'insecticide dans l'eau diminue son effet toxique et permet à ces enzymes de rétablir leur activité normale.

L'analyse des résidus du dimilin par CLHP indique une pénétration de ce produit dans le corps et une dégradation relativement importante dans l'eau douce et à la surface du corps. On enregistre une accumulation progressive du produit dans le corps des femelles de *G. affinis*.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail a une double finalité. L'évaluation de l'action d'un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le dimilin (diflubenzuron) sur certains aspects morphométriques, biochimiques et enzymatiques ainsi que l'analyse des résidus par CLHP de cet insecticide chez un poisson larvifère *Gambusia affinis* (Cyprinodontiformes : Poeciliidae). Ensuite, l'étude de l'impact de la pollution dans le golfe d'Annaba par un suivi de la structure de la population de *Donax trunculus* (Bivalvia, Donacidae) ainsi que des paramètres biochimiques et enzymatiques sur ce même organisme.

Gambusia affinis : Le dimilin administré à la concentration de 78 ng/l correspondant à la DL₉₀ obtenue à l'égard des larves du 4^{ème} stade de *Culex pipiens*, réduit significativement la croissance linéaire et pondérale des alevins et n'affecte que la croissance pondérale des femelles adultes de *Gambusia affinis*. Concernant les indices métriques, le DFB affecte de manière très significative l'évolution des RGS et RHS et présente un effet moins marqué sur le coefficient de condition K. Un effet traitement sur les différents métabolites (glycogène, lipides et protéines) a été enregistré au niveau des ovaires et de l'hépatopancréas chez les femelles traitées en continu. Le dosage du glutathion réduit et de l'activité spécifique de la GST, LDH et l'AChE révèle une induction des systèmes enzymatiques, se traduisant par une diminution du taux de GSH et de l'activité de l'AChE et l'augmentation de l'activité de la GST et LDH. L'analyse des résidus du dimilin par CLHP indique une pénétration de ce produit dans le corps et une dégradation relativement importante dans l'eau douce et à la surface du corps. On enregistre une accumulation progressive du produit dans le corps des femelles.

Donax trunculus : L'étude granulométrique indique que la plage d'El Battah est constituée de sables moyens purs, alors que celle de Sidi Salem est composée de sable fin. Les paramètres physico-chimiques subissent des variations saisonnières notables en relation avec les conditions climatiques et anthropiques de la région. Par ailleurs la colonne d'eau présente une charge particulaire importante. L'étude de la densité, nous a permis de connaître l'importance quantitative des individus de *D. trunculus* colonisant le sédiment. Celle-ci varie entre 83 ind.m⁻² à 379 ind./m², avec une taille maximale de 38 mm. L'étude de la dynamique de la population de *D. trunculus* a mis en évidence deux recrutements, l'un printanier et l'autre automnal. L'analyse des différents métabolites montre des différences concernant les teneurs en protéines et glucides, où les taux de protéines sont plus élevés au niveau des échantillons recueillis à Sidi Salem. Quant aux glucides, se sont les individus d'El

Battah qui affichent les taux les plus élevés. Pour ce qui est des teneurs en lipides, les mêmes variations sont observées dans les deux sites.

L'évolution de l'indice de condition a permis de repérer les périodes de perte de poids dues aux émissions des gamètes qui se situerait en été et en hiver. L'étude de l'activité de l'acétylcholinestérase dans un tissu, le manteau, indique une inhibition de cette enzyme chez les individus récoltés à Sidi Salem. L'analyse des métaux traces révèle un profil identique dans les deux stations et les taux détectés suivent l'ordre décroissant suivant: Zn, Cu, Pb et Cd, avec des valeurs plus importantes dans la plage de Sidi Salem. L'ensemble des perturbations observées à la fois sur les teneurs en protéines et glucides, sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase ainsi que les différences de concentrations des métaux traces pourrait traduire un effet de la pollution sur la population des Donacidae de Sidi Salem plus important par rapport à celle d'El Battah.

A l'avenir, il conviendrait de poursuivre ces recherches par :

- Une étude de la structure fine des organes cibles (hépatopancréas, ovaires et glandes digestives) afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications.
- Une approche multimarqueurs plus spécifique avec l'utilisation de la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GSH-Px) et la metallothionéine.
- Une étude des relations entre les réponses des systèmes antioxydants et les niveaux de contaminations pour pouvoir à plus long terme connaître la signification d'une induction ou d'une inhibition de ces systèmes.
- Des dosages chimiques des métaux lourds ainsi que des hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP, dans les sédiments.

RESUME

L'étude menée comporte deux principales parties. La première est consacrée à l'évaluation de l'impact du dimilin (25% PM), une formulation commerciale du diflubenzuron (DFB), sur la croissance, le métabolisme et les activités enzymatiques d'un poisson larvinaire de moustiques *Gambusia affinis* (Baird & Girard, 1853) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). La seconde partie traite la structure de la population, l'impact de la pollution sur la composition biochimique et les activités enzymatiques chez un organisme sentinelle *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Donacidae) du golfe d'Annaba.

Le DFB additionné à l'eau d'élevage des poissons à la dose de 78 ng/l correspondant à la DL₉₀ à l'égard des larves du 4ème stade de *Culex pupiens*, réduit significativement les paramètres morphométriques des alevins de *G. affinis* traités pendant 24 heures, ainsi que le poids corporel des femelles adultes exposées à l'insecticide durant 30 jours. D'autre part, et dans nos conditions expérimentales, le traitement réduit significativement les rapports gonadosomatiques, hépatosomatiques et le coefficient de condition des femelles adultes. La composition biochimique des ovaires et des hépatopancréas des femelles est affectée par le dimilin. En effet, on enregistre une diminution des taux de glycogène, et de protéines dans l'hépatopancréas et l'ovaire. Par ailleurs, le traitement entraîne une diminution des taux des lipides hépatopancréatiques ; cependant il est sans effet significatif sur les taux des lipides ovariens. Une diminution du taux de GSH et de l'activité de l'ACHé, ainsi qu'une augmentation des activités de la GST et de la LDH, ont été observées chez les femelles traitées pendant 30 jours. L'analyse des résidus du dimilin (312 µg/l) par chromatographie liquide haute performance (CLHP), indique une pénétration de ce produit dans le corps et une dégradation relativement importante dans l'eau d'élevage et à la surface du corps. On enregistre une accumulation progressive du produit dans le corps des femelles de *G. affinis*.

Afin d'évaluer l'état de santé du golfe d'Annaba, deux stations ont été sélectionnées : El Battah, prise comme référence et Sidi Salem exposée à la pollution. La répartition de *D. trunculus*, dans le golfe d'Annaba a révélé d'importantes variations spatio-temporelles. Le suivi de l'évolution des fréquences de tailles a mis en évidence deux recrutements ; l'un printanier et l'autre automnal. Le dosage des principaux constituants (protéines, glucides et lipides) au niveau du manteau de *D. trunculus* montre d'une part ; une variation mensuelle au sein d'une même station qui est en rapport avec la période de reproduction et les changements environnementaux, ainsi que des différences des taux de protéines et glucides entre les deux sites, d'autre part. Cependant, aucune différence n'a été notée pour les taux de lipides. Le suivi de l'activité de l'acétylcholinestérase indique une inhibition de cette enzyme chez les individus récoltés à Sidi Salem. Les teneurs en Zn, Cu, Pb et Cd ont été mesurées chez *D. trunculus* provenant des deux sites par spectrophotométrie d'absorption atomique (S.A.A). Les données des métaux traces ont révélé que les valeurs les plus élevées ont été détectées à Sidi Salem. Cependant, il n'existe aucune différence significative entre les deux sites, à l'exception du Cd.

Le DFB, molécule de référence des benzoylphénylurées, est un insecticide sélectif, largement utilisé en lutte chimique, notamment contre les insectes, semble manifester des effets secondaires sur un poisson culiciphage non visée *G. affinis*.

De plus, *D. trunculus* est un bon bioindicateur de la pollution. Les mesures biochimiques sur ce modèle révèlent que la pollution est générale dans le golfe d'Annaba, et que le site de Sidi Salem est le plus exposé.

Mots clés : *Gambusia affinis*, *Donax trunculus*, écologie, insecticide, diflubenzuron, pollution, écotoxicologie, biochimie, biomarqueurs, éléments traces, Annaba.

ABSTRACT

This study includes two main parts. The first is devoted to the assessment of the impact of the dimilin (25% W.P), a commercial formulation of the diflubenzuron (DFB), on the growth, the metabolism and activities enzymatic of mosquitofish *Gambusia affinis* (Baird & Girard, 1853) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). The second part treated the structure of the population, the impact of the pollution on the biochemical composition and activities enzymatic at an organism sentinel *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Donacidae) of the Annaba gulf.

The DFB added to the water of fish raising to the dose of 78 ng/l corresponding at LD₉₀ to the consideration of larva of the 4th stage of *Culex pupiens*, reduced meaningfully the morphometric parameters of young fishes of *G. affinis* treaties during 24 hours, as well as the bodily adult female weight exposed to insecticide lasting 30 days. Somewhere, in our experimental conditions, the reduced treatment meaningfully the gonosomatic index, hepatosomatic index and the coefficient of condition of adult female. The biochemical composition of ovaries and hepatopancreas of females is affected by the dimilin. Indeed, one records a reduction of glycogen rates, and of proteins in the hepatopancreas and the ovary. Otherwise, the treatment drags a reduction of hepatopancreas lipids rates; however it is without meaningful effect on ovarian lipid rates. Reductions of the rate of GSH and the activity of the AChE, as well as an increase of activities of the GST and the LDH, have been observed at females treated during 30 days. The analysis of residues of the dimilin (312 µg/l) by chromatography liquidates high performance (CLHP), indicate a penetration of this product in the body and a relatively important deterioration in the water of raising and to the surface of the body. One records a progressive accumulation of the product in the body of females of *G. affinis*.

In order to value the condition of health of the Annaba gulf, two stations were selected: El Battah (station of reference) and Sidi Salem (station exposed to the pollution). The distribution of *D. trunculus*, in the gulf of Annaba revealed an important spatio-temporal variation. The follow-up of the evolution of size frequencies shows two recruitments; a hibernal and the autumnal. The dosage of principal constituent metabolites (proteins, carbohydrates and lipids) to the level of the coat of *D. trunculus* shows: a monthly variation within one same station that is in report with the period of reproduction and changes environmental, as well as of differences of protein rates and carbohydrates between the two sites. However, no difference has not been noted for rates of lipids. The follow-up of the activity of the acetylcholinesterase indicates an inhibition of this enzyme at individuals harvested in Sidi Salem. Contents in Zn, Cu, Pb and Cd have been measured at *D. trunculus* coming of the two sites by atomic absorption spectrophotometer (S.A.A). Data of metals traces revealed that the most elevated values have been detected in Sidi Salem. However, there is no meaningful difference between the two sites, exception of the Cd.

The DFB, molecule of benzoylphenylure reference, is a selective insecticide, extensively used in chemical struggle, notably against bugs seem to show some secondary effects on a fish culiciphage: *G. affinis*.

On top of that, *D. trunculus* is a good bioindicator of the pollution. The biochemical measures on this model reveal that the pollution is general in the gulf of Annaba, and that the site of Sidi Salem is the more exposition.

Key words: *Gambusia affinis*, *Donax trunculus*, ecology, DFB, pollution, ecotoxicology, biochemistry, biomarkers, metals traces, Annaba.

Résumé en arabe

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel Monem A.H. & Mumma R.O., 1981.** Development of analytical procedure for an insect growth regulator (EL-494) employing high-pressure liquid chromatography and its application on residues. *Agric. Food Chem.*, 2: 75-78.
- Abdenmour, C., Smith, B.D., Boulakoud, M.S., Samraoui B., Rainbow, P.S., 2000.** Trace metals in shrimps and sediments from Algerian water. *J. Catalog. Mat. Env.* 3: 9-12.
- Abdenmour, C., Khelili, K., Boulakoud, M.S., Rainbow, P.S., 2004.** Trace metals in marine, brackish and freshwater prawns (Crustacea, Decapoda) from northeast Algeria. *Hydrobiologia*, 432: 217-227.
- Abdullah A.R., Kumar A. & Chapman J.C., 1994.** Inhibition of acetylcholinesterase in the australian freshwater shrimp (*Paratya australiensis*) by profenofos. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 18-61.
- Abouzeitoun M.H., 1991.** Evaluation de la lutte biologique contre les larves de moustiques *Culex pipiens pipiens* (Diptère, Culicide) utilisant un poisson *Gambusia affinis* (Téléostéen, Cyprinodontiformes) et l'impact de *Simocephalus vitulus* (Crustacés, Cladocère). Thèse magister en physiologie animale. Univ. Annaba : 135p.
- Ackman R.G., Tocher C.S. & McLachlan T., 1968.** Marine phytoplankton fatty acids. *J. Fish Res. Board Can.*, 25: 1603-1620.
- Adams J.D., Lauterburg B.H. & Michel J.R., 1983.** Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: Regulation and response to oxidative stress. *Pharmacol, Experim. THERAP.*, 227: 749-754.
- Ahmed M.T. & Eid A.H., 1991.** Accumulation of diflubenzuron in bolti fish *Oreochromis niloticus*. *Nahrung*, 35(1): 27-31.
- Aissaoui R., 1998.** Contribution à l'étude de la toxicité d'un insecticide organochloré, le lindane : Impact sur quelques organes d'un poisson Téléostéen d'eau douce *Gambusia affinis*. Thèse magister. Univ. Annaba : 124p.
- Aït Aïssa S., Palluel O. & Porcher J.M., 2003.** Biomarqueurs précoces d'écotoxicité. INERIS, rapport final DRC 00-02 : 79p.
- Albentosa M., Fernandez-Reiriz J.M., Labarta U. & Pérez-Camacho A., 1999.** Effect of microalgal and inert diets on the growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* seed: wheatgerm diets. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 232: 23-37.
- Ali A. & Mulla M.S., 1978.** Effects of chironomid larvicides and diflubenzuron on nontarget invertebrates in residential-recreational lakes. *Environ. Entomol.*, 7: 483.
- Amiard-Triquet C., Altamann S., Amiard J.C., Ballan-Dufrançais C., Baumard P., Budzinski H., Crouzet C., Guarrigue J.P., His E, Jeantet A.Y., Menarsia R., Mora P., Mouneyrac C., Narbonne J.F. & Pavillon J.F., 1998.** Fate and effects of micropolluants in the Gironde estuary, France: a multidisciplinary approach. *Hydrobiologia*, 373/374: 259 - 279.
- Aminot A. & Chaussepied M., 1983.** Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Éd. CNEXO, Brest : 395 p.

- Amoureux L., 1960.** Quelques observations de base concernant les méthodes granulométriques. Rapp. C.I.E.S.M.M, **XVI**(3) : 704-10.
- Amouroux J.M., 1974.** Etude des peuplements infralittoraux de la côte du Roussillon. III. Variations spatiales et saisonnières. *Vie Milieu*, **24**(2-B): 321-354.
- Anderlini V.C., 1990.** The effect of swadge on trace metal concentrations and scope for growth in *Mytilus edulis aoteanus* and *Perna perna* from Wellington Harbour, New Zeland. Paper presented at the International Conference on trace metals in the environment, Sydney (Australia), July 1990. *In: Trace metals in the aquatic environment. G.E. Batley*, **125**: 263-288.
- Anonyme 1976.** Extension du port d'Annaba. Etude générale des conditions naturelles dans le golfe. Synthèse finale du rapport du LCHF: 50p.
- Ansell A. D. & Trevallion A., 1967.** Studies on *Tellina tenuis* (Da Costa). Seasonal growth and biochemical cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1**(2): 220-235.
- Ansell A. D., 1972.** Distribution, growth and seasonal changes in biochemical composition for the bivalve *Donax vittatus* (da costa) from Kames Bay. *Millport. J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **10**: 137-150.
- Ansell A. D., 1974.** Seasonal changes in biochemical composition of the Bivalve *Nucula sulcata* from the Clyde sea area. *Mar. Biol.* **25**: 101-108.
- Ansell A. D. & Bodoy A., 1979.** Comparison of events in the seasonal cycle for, *Donax vittatus* and *D. trunculus*. Dans : *Cyclic phenomena in marine plants and animals, Proc. Europ. mar. Bisl. Symp.*, Naylor, E. et Hartno, R.G. (eds). Pergamon Press, Oxford et New York: 191-198.
- Ansell A.D. & Lagardère F., 1980.** Observations on the biology of *Donax trunculus* and *Donax vittatus* at Ile d'Oleron (French Atlantic Coast). *Marine Biology*, **57**(4): 287-300.
- Ansell A.D., Frankiel L. & Mouëza M., 1980.** Seasonal changes in tissue weight and biochemical composition for the bivalve *Donax trunculus* L. on the Algerian coasts. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, vol.**45**: 105-116.
- Ansell A.D., 1983.** The biology of the genus *Donax*. In Sandy beaches as ecosystems. (McLachlan, A. & Erasmus, T., eds). *Junk Publishers, The Hague*: 607-635.
- Arrigo A.P., 1999.** Gene expression and the thiol redox state. *Free Rad. Biol. Med.*, **27**: 936-944.
- ASTM, 1994a.** Standard guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Marine and Estuarine Polychaetous Annelids. E-1611-94. *American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.*
- ASTM, 1994b.** Standard guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs. E-724-94. *American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.*
- Asztalos B., Nemcsók J.G., Benedeczyk I., Gabriel R., Szabó A. & Refaie O.J., 1999.** The effects of pesticides on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**(2) : 275-282.
- Avcı A., Kacmaz M. Durak I., 2005.** Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicol. and Environm. Saf.*, **60**: 101-105.

- Baars A.J. & Beimer D.D., 1980.** The glutathione S-transferase, their role in detoxification and toxification of xenobiotics. *Ann. Biol-elin.*, **38**: 49-56.
- Bainy A.C.D., 2000.** Biochemical responses in Peneids caused by contaminants. *Aquaculture*, **191**: 163-168.
- Bakalem A., 1981.** Biologie des principales espèces du peuplement des sables fins de la baie d'Alger. *Pelagos*, **6**(1) :165-220.
- Bast A. & Haenen G.R.M.M., 1984.** Cytochrome P-450 and glutathione, what is the significant of their Inter-relationship in lipid peroxidation. *Trends Biochem. Sci.*, **9**: 510-513.
- Barnes K.A., Fussell R.J., Startin J.R., Thorpe S.A. & Reynolds S.L., 1995a.** Determination of the pesticides diflubenzuron in mushrooms by high performance liquid chromatographic/atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, **712**(1): 85-93.
- Barnes K.A., Fussell R.J., Startin J.R., Thorpe S.A. & Reynolds S.L., 1995b.** Determination of the pesticides diflubenzuron and clofentezine in plums, strawberries and blackcurrant-based fruit drinks by high performance liquid chromatographic/atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, **9**(14): 1441-1445.
- Baudrimont M., Lemaine-Gony L., Ribeyre F., Métivaud J. & Boudou A., 1997.** Seasonal variations of metallothionein concentrations in asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**: 2096-2106.
- Baumard P., Budzinski H. & Garrigues P., 1998.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean Sea. *Environ. Toxicol. Chem.*, **17**: 765-776.
- Bayed A. & Guillou J., 1985.** Contribution à l'étude des populations du genre *Donax* : La population de *D. trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) de Mehdia (Maroc). *Ann. Inst. Oceanogr., Paris*, **61**(2): 139-147.
- Bayed A., 1990.** Reproduction de *Donax trunculus* sur la côte atlantique marocaine. *Cah. Biol. Mar.*, **31**: 159-169.
- Bayed A., 1991.** Etude écologique des écosystèmes de plages de sable fin de la côte atlantique marocaine : Modèles de zonation, Biotypologie, Dynamique de populations. Thèse Doct. d'Etat. Univ. Mohammed V, Rabat : 229p.
- Bayed A. & Guillou J., 1985.** Contribution à l'étude des populations du genre *Donax* : La population de *D. trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) de Mehdia (Maroc). *Ann. Inst. Oceanogr., Paris*, **61**(2): 139-147.
- Belabed B.E., 2006.** Evaluation de la contamination par les métaux lourds dans le littoral d'Annaba et la lagune Mellah. Thèse magister. Univ Annaba : 98p.
- Beldi H., Gimbert F., Maas S., Scheffler R. & Soltani N., 2006.** Seasonal variations of Cd, Cu, Pb and Zn in the edible mollusc *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba, Algeria. *African Journal of Agricultural Research*, **1**(4): 085-090.
- Bellon-Humbert C., 1962.** Les mollusques marins testacés du Maroc. II- Lamllibranches et Scaphopodes. *Travaux de l'institut scientifiques Cherifien Série zoologique* N° 28, Rabat : 184p.

- Bendali F., Djebbar F. & Soltani N., 2001.** Efficacité comparé de quelques espèces de poisons à l'égard de divers stades de *Culex pipiens* L. dans des conditions de laboratoire. *Parasitica*, **57**(4) : 255-265.
- Beninger P.A. & 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 and Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **79**: 19-37.
- Beninger P.G. & Stephan G., 1985.** Seasonal variations in fatty acids of the triacylglycerol and phospholipids of two populations of adult clam (*Tapes decussatus* L. and *T. philippinarum*) reared in a common habitat. *Comp. Biochem. Physiol.*, **B81**: 591-601.
- Benson W.H., Waston CF., Baer K.N. & Stackhouse R.A., 1988.** Response of Hematological and Biochemical Parameters to Heavy Metal Exposure: Implications in Environmental Monitoring. *Mar. Environ. Res.*, **24**: 219-222.
- Benson W.H. & Di Giulio R.T., 1992.** Biomarkers in hazard assessments of contaminated sediments. *In: Sediment toxicity assessment. Edited by GA Burton Jr. Lewis Publishers, Chelsea, Mitch.* : 241-266.
- Berthois L., 1958.** Techniques de l'analyse granulométrique. *C.P.U.*, Paris : 64p.
- Beukema J. J. & De Bruin W., 1977.** Seasonal changes in dry weight and chemical composition of soft parts of the tellinid *Macoma balthica* in the Dutch Wadden sea. *Neth. J. Sea. Res.*, **11**(1): 42-55.
- Bietlot A., 1941.** Méthodes d'analyses granulométriques. Applications à quelques sables éocènes belges. *Mém. Soc. Géol. Belgique*, **64**(2) : 81-170.
- Black D. & Skinner E.R., 1987.** Changes slat-resistant lipase activities during spawning in the rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.) camp. *Biochem. Physiol.*, **88B**: 261.
- Bocquené G., Galgani F. & Truquet P., 1990.** Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.*, **30**: 75-89.
- Bocquené G. & Galgani F., 1991.** Acetylcholinesterase activity in the common prawn (*Palaemon serratus*) contaminated by carbaryl and Phosalone. *Ecotox. Environ. Safety*, **22**: 337 - 345.
- Boquené G., 1996.** L'acétylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité. Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins. Thèse Doct., Ecole Pratique des Hautes Etudes : 250p.
- Bocquené G., Galgani F. & Walker H., 1997.** Les cholinestérases, biomarqueurs de neurotoxicité. *In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F., (eds) Biomarqueurs en écotoxicologie – Aspects fondamentaux. Masson, Paris* : 209-204.
- Bodoy A. & Massé H., 1978.** Quelques paramètres permettant de suivre la production organique d'un Mollusque bivalve au cours d'un cycle saisonnier. *Publ. Sci. Tech. CNEXO, Actes colloq.*, **7** : 753-766.
- Bodoy A., 1980.** Croissance et variations de la composition biochimique du bivalve *Spisula subtruncata* (Da Costa) dans le golfe de Marseille. *Tethys.*, **9**(4): 345-354.
- Bodoy A., 1982.** Croissance saisonnière du bivalve *Donax trunculus* L. en méditerranée nord occidentale (France). *Malacologia*, **22**(1-2): 353-358.

- Bortone S.A. & Davis W.P., 1994.** Fish intersexuality as indicator of environmental stress. *Bio. Science*, **44**: 165-172.
- Bortone S.A. & Cody R.P., 1999.** Morphological masculinisation in Poecillidae females from a paper mill effluent receiving tributary of the St Johns River. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **63**: 150-156.
- Boudouresque C.F. & Verlaque M., 2002.** Biological pollution in the Mediterranean Sea: invasive versus introduced macrophytes. *Mar. Pollut. Bull.*, **44**: 32-38.
- Bougis P., 1952.** Recherche biométrique sur les Rougets *Mullus barbatus* L. et *Mullus surmuletus* L. *Arch. Zool. Expér. Gen. Fr.*, **89**(2) : 57-174.
- Bourcart C. & Loubet P., 1965.** Cycle sexuel et évolution des réserves chez *Mytilus galloprovincialis* (Lmk). *Rapp. PV. Commiss. Internation. Mer Médit., Monaco.*, **18**(2): 155-158.
- Bove F.J., 1963.** Le MS 222 SANDOZ, un anesthésique prometteur pour les animaux à sang froid. *Sandopharm N°1*.
- Boyd C.E. & Ferguson D.E., 1964.** Spectrum of cross-resistance to insecticides in the mosquitofish *Gambusia affinis*. *Mosquito News*, **24**: 19-21.
- Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- Brethead S., Toutant J.P. & Saglio P., 2000.** Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **47**: 117-124.
- Brown T.M., 1992.** Selectives inhibitors of methylparathion resistant acetylcholinesterase from *Heliothis virescens*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **44**: 155-164.
- Burgeot T. Bocquené G., Porte C., Dimmet J., Santella R.M., Garcia D.L., Pfohl-Leszkiwiez A., Raoux G. & Galgani F., 1996.** Bioindicators of pollutant exposure in the Northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **131**: 125-141.
- Burrows M.T. & Hughes R.N., 1990.** Variation in growth and consumption among individuals and populations of dogwhelks, *Nucella lapillus*: a link between foraging behaviour and fitness. *Journal of Animal Ecology*, **59**: 724-742.
- Canesi L., Viarengo A., Leonzio C., Filippelli M. & Gallo G., 1999.** Heavy metals and plutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic toxicology*, **46**: 67-76.
- Caers M., Coutteau P. & Sorgeloos P., 2000.** Impact of starvation and of feeding algal and artificial diets on the lipid content and composition of juvenile oyster (*Crassostrea gigas*) and clam (*Tapes philippinarum*). *Mar. Biol.*, **136**: 891-899.
- Carr R.S., Williams J.W. & Fragata C.T.B., 1989.** Development and evaluation of a Novel Marine Sediment Pore Water Toxicity Test with the Polychaete *Dinophilus gyrocilatus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**: 533-543.
- Carr R.S., 1998.** Marine and Estuarine porewater toxicity testing. In: *Microscale Testing and Aquatic Toxicology Advances, techniques and Pratices*. Edited by P.G. Wells, K. Lee and C. Blaise. *CRC Press, Boca Raton, Chap.*, **36**: 523-537.
- Casida J.E. & Quistad G.B., 1998.** Golden age of insecticide research: past, present, or future ?. *Annual Review of Entomology*, **43**: 1-16.

- Castro H., Aguilera P.A., Martinez J.L. & Carrique E.L., 1999.** Differentiation of clams from fishing areas an approximation to coastal quality assessment. *Environ. Monit. Assess.*, **54**: 229-237.
- Chapman P.M. & Morgan J.D., 1983.** Sediment bioassays with oyster larvae. *Bull Environm. Contam. Toxicol.*, **31**: 438-444.
- Chébira S., Soltani N., Muylle S. & Smaghe G., 2006.** Uptake and distribution of three insect growth regulators-diflubenzuron, flucyclozuron and halofenozide in pupae and adults of *Tenebrio molitor*. *Phytoparasitica* **34**(2): 187-196.
- Chambolle P., 1970.** Modalités du développement et analyse des facteurs physiologiques de la reproduction chez *Gambusia sp.* (Poisson Téléstéen); recherches descriptives et expérimentales. Thèse 3^{ème} cycle. Univ. Bordeaux I : 192p.
- Chaoui L., 1993.** Etude de la reproduction de *Perna perna* (L) (Mytilidae) dans le golfe d'Annaba. Aspect : écologique, histologique et biochimique. Thèse de magister. Univ. Annaba : 89p.
- Chasseaud F.L., 1976.** Conjugaison with glutathione and mercapturic acid excretion, in Gluthathione metabolism and function. Ed. *Erias I.M and Jacoby W.B. Raven Press*, New York: 77-144.
- Chatterjee S. & Bhattacharya S., 1984.** Detoxification of industrial pollutants by the glutathione S- transferase system in the liver of *Anabas testudineus* (Bloch). *Toxicol. Lett.*, **22**: 187-198.
- Chiu, S.T., Lam, F.S., Tze, W.L., Chau, C.W., Ye, D.Y., 2000.** Trace metals in mussel from mariculture zones, Hong Kong. *Chemosphere*, **41**: 101-108.
- Chu F.E., Webb K.L. & Chen J., 1990.** Seasonal changes of lipids and fatty acids in oyster tissues (*Crassostrea virginica*) and estuarine particulate matter. *Comp. Biochem. Physiol.*, **95B**: 385-391.
- Cohen A.M., Nugegoda D. & Gagnon M.M., 2001.** Metabolic respons of fish following exposure to two different oil spill remediation technics. *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, **48**: 306-310.
- Colwel A.E. & Schaefer C.H., 1980.** Diets of *Ictalus nebulosus* and *Pomoxis nigromaculatus* altered by diflubenzuron. *J. Fish. Aqua. Sci.*, **37**: 632.
- Conlong D.E & Mugoya C.F., 1976.** Reading beneficial insects for biological control purposes in ressource poor areas of Africa. *Entomophaga* **41**(3/4): 505-512.
- Connors D.E. & Ringwood A.H., 2000.** Effect of glutathione depletion on copper cytotoxicity in oyster (*Crassostrea virginica*). *Aquatic Toxicology*, **50**: 341-349.
- Corson M.S., Mora M.A. & Grant W.E., 1998.** Stimulating cholinesterase inhibition in birds caused by dietary insecticide exposure. *Ecological Modelling*, **105**: 299-323.
- Cosson R.P., 2000.** Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limis and perspectives. *Cell. Mol. Biol.*, **46**(2): 295-309.
- Cossu C., Doyotte A., Babut M., Exinger A. & Vasseur P., 2000.** Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to diiferent contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **45**: 106-121.
- Costa L.G., 1996.** Biomarker research in neurotoxicology: The role of mechanistic studies to bridge the gap between the laboratory and epidemiological investigations. *Environ. Health Pespect.*, **104**: 55-67.

- Dauberschmidt C., Dietrich D.R. & Schlatter C., 1997.** Esterases in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*: activities, inhibition, and binding to organophosphates. *Aquatic Toxicology*, **37**: 295-305.
- Day K.D. & Scott I.M., 1990.** Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquat. Toxicol.*, **18**: 101-114.
- Dhadialla T.S., Carlson G.R. & Le D.P., 1998.** New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology*, **43**: 545-569.
- Degiovanni C. & Mouèza M., 1972.** Contribution a l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque, Lamellibranche), dans L'Algérois : écologie en Baie de Bou-Ismaïl. *Tethys*, **4**(3): 729-744.
- Delauney F., Marty J., Moal J. & Samain J.F., 1993.** The effect of monoespecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **173**: 163-179.
- Della M.R., Villani G.R., Dimartino E., Squillacioti De marcol, Belisario M.A. & Station N., 1994.** Glutathione depletion induced in rat liver fraction by seven pesticides. *Bull. Soc. Ital. Boil. Sper.*, **70**(8-9) : 185.
- Dellali M., Gnassia-Barelli M., Romeo M. & Aissa P., 2001.** The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.*, **130**: 227-235.
- Dembélé K., Haubruge E. & Gaspar C., 2000.** Concentration Effects of Selected Insecticides on Brain Acetylcholinesterase in the Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **45**(1): 49-54.
- De Moreno J.E.A., Moreno V.J. & Brenner R.R., 1976.** Lipid metabolism of the yellow clam, *Mesodesma mactroides*: I. Composition of the lipids. *Lipids*, **11**: 334-340.
- De Moreno J.E.A., Pollero R.J., Moreno V.J. & Brenner R.R., 1980.** Lipids and fatty acids of the mussel (*Mytilus platensis* d'Orbigny) from South Atlantic waters. *J. Exp. Biol. Ecol.*, **48**: 263-276.
- Deniel C., 1983.** La reproduction des poissons (Téléostéens, Pleuronectiformes) en Baie de Douarnez. I- Cycles sexuels fécondité des Arnoglosses, *Arnoglossus thori*, *A. laterna*, *A. imperialis* (bothidae). *Cahier de Biologie marine*. **Tomé XXIV** : 231-252.
- Devi M. & Fingerman M., 1995.** Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red Swamp crayfish, *Procambarus clarkii* by mercury, cadmium and lead. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **55**: 746-750.
- Dewes L.J., Sandrine J.Z., Monserrat J.M., Yunes J.S., 2006.** Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapod, Brachyura). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **65**: 201-208.
- Dixit R., Mukhtar H., Seth P.K. & Krishnamurti C.R., 1980.** Conjugation of acrylamide with glutathione catalysed by glutathione S-transferase of rat liver and brain. *Biochem. Pharmacol.*, **30**: 1739-1744.
- Doving K.B., 1991.** Assessment of animal behaviour environmental toxicity. *Comp. Biochem. Physiol.*, **100**: 247-252.

- Draredja-Beldi H., 1993.** Contribution à l'étude de *Gambusia affinis* (Téléostéen, *Poeciliidae*), poisson prédateur des larves de moustiques, croissance des alevins, étude du cycle sexuel et corrélations métaboliques. Thèse magister en physiologie animale. Univ. Annaba : 107p.
- Draredja-Beldi H. & Soltani N., 2003.** Laboratory evaluation of dimilin on growth and glutathione activity in mosquitofish, a non-target species. *Comm. Appl. Biol. Sci.*, Ghent University, **68**(4a): 299-304.
- Draredja B., 2007.** Structure et fonctionnement d'un milieu lagunaire méditerranéen : lagune Mellah (El-Kala, Algérie Nord-Est) Thèse Doct. d'Etat. Univ. Annaba : 225p.
- Dreze V., Monod G., Cravedi J.P., Biagiante-Risbourg S. & Le Gac F., 2000.** Effects of 4-nonylphenol on sex differentiation and puberty in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Ecotoxicol. Kluwer. Acad. Pub.*, **9**: 93-103.
- Drysdale D.T. & Bortone S.A., 1989.** Laboratory induction of intersexuality in the mosquitofish, *Gambusia affinis*, using paper mill effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **43**: 611-617.
- Duchteau G. & Florkin M., 1959.** Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Arch. Insect. Physio. Biochem.*, **67** : 306-314.
- Dutta H.M. & Arends D.A., 2003.** Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile blue gill sunfish. *Environmental Research*, **91**: 157-162.
- Eertman R.H.M., Zurburg W., Schipper C.A., Sandee B. & Smad A.C., 1996.** Effects of PCB 126 and cadmium on the anaerobic metabolism of the mussel *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, (part C), **113**: 267-272.
- Ecobichon D.J., 1996.** Toxic effects of pesticides. In: Klaassen C.D. (ed.). Casarett and Doull's toxicology; the basic science of poisons Mc Graw-Hill, New York: 643-689.
- Edwards C.A. & Fisher S.W., 1991.** The use of measurements in assessing the impacts of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates. In: Mineau P. (ed). Cholinesterase inhibiting insecticides. *Elsevier, Amsterdam*: 225-275.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. & Featherstone R.M., 1961.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology and Physiology*, **38**: 84-90.
- EPA, 1994.** Methods for Assessing the Toxicity of Sediment-associated Contaminants with Estuarine and Marine Amphipods. 600/R-94/025.
- Escartin E. & Porte C., 1997.** The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**: 2090-2095.
- Farley D.G & Younce A., 1979.** Dynamics of *Gambusia affinis* in Fresno Country rice fields. *Proc. Calif. Mosq Vect. Contr. Assoc.*, **47**: 71.
- Fernández J., Otero J. & De Coo A., 1984.** Contribución al estudio de la coquina (*Donax trunculus* L.) en Galicia. *Actas do IV Simposio Ibérico do Estudos do Benthos Marinho*, II: 133-142.
- Fernández-Reiriz M.J., Labarta U., Albentosa M. & Pérez-Camacho A., 1998.** Effect of microalgal diet and commercial wheatgerm flours on the lipid profile of *Ruditapes decussatus* spat. *Comp. Biochem. Physiol.*, **119B**: 369-377.

- Fernandez-Vega C., Sancho E., Ferando M.D. & Andreu-Moliner E., 1999.** Thiobencarb toxicity and plasma AChE inhibition in the european eel. *J. Environ. Sci. Health*, **B34**: 64.
- Fernandez-Vega C., Sancho E., Ferando M.D. & Andreu-Moliner E., 2002.** Thiobencarb induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla Anguilla*. *Pestic. Biochem. and Physiol.*, **72**: 55-63.
- Fishelson, L., Bresler V., Manelisa R., Zuk-Rimon Z., Dotanb A., Hornung H. & Yawetz A., 1999.** Toxicological aspects associated with the ecology of *Donax trunculus* (Bivalvia, Mollusca) in a polluted environment, *Elsevier Science*, **56**: 121-131.
- Fischer W., Bianchi G. & Scott, W.B., 1981.** Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Atlantique centre-est ; zones de pêche 34, 47. Canada Fonds de Dépôt, Ottawa, *Ministère des Pêcheries et Océans Canada*, en accord avec la FAO, Vol. **6** (Bivalves).
- Fischer, W., Bauchot M.L. & Schneider M., 1987.** Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Volume I. Invertébrés. Rome, FAO. Vol.1:760p.
- Fisher S.A. & Hall L.W., 1992.** Environmental concentrations and aquatic toxicity data on diflufenuron (dimilin). *Crit. Rev. Toxicol.*, **22**(1): 45-79.
- Fleming W.J., Auguspurger T.P. & Alderman J.A., 1995.** Freshwater mussel die-off attributed to anticholinesterase poisoning. *Environ. Toxicol. Chem.*, **14**: 877-879.
- Forget J., 1998.** Impact neurotoxique de contaminants (Pesticides et métaux) sur un crustacé marin (*Tigriopus brevicornis*, Müller). Caractérisation de la Cholinestérase et application à la surveillance des effets de polluants sur l'environnement marin. Paris : 171p.
- Forget J., Pavillon J.F., Beliaeff B. & Bocquené G., 1999.** Joint action of pollutants combinations (pesticides and metals) on survival (LC₅₀ value) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**(5): 912-918.
- Fossi M.C., Leonzio C., Massi A., Lari L. & Cassini S., 1992.** Serum esterase inhibition in birds: A non-destructive biomarker to access organophosphorus and carbamate contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **23**: 99-104.
- Fournier D. & Mutero A., 1994.** Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.*, **108C**: 1-9
- Fraval A., 2002.** Elles aussi, elles aiment les insectes, les Gambusies. *Insectes*, **125**(2) : 14-16.
- Frehi H., Ayada M., Kara M.H. & Coute A., 2004.** Hydrologie de la baie d'Annaba (Algérie Nord-Est): caractères physico_chimiques et biomasse chlorophy-lienne. *Rapp. Comm. int. Mer Medit.*, **37** : 359
- Freites L., Fernandez-Reiriz M.J. & Labarta U., 2002a.** Fatty acid profiles of *Mytillus galloprovincialis* (Lmk) mussel of subtidal and rocky shore origin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B.*, **132**: 453-461.
- Gabbott P. A. & Bayne B. L., 1973.** Biochemical effects of temperature and nutritive stress on *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Bio. Ass. U. K.*, **53**: 269-286.

- Gabbott P. A., 1976.** Energy metabolism, *In*: Bayne B. L. ed., Marine mussels. Their ecology and physiology. *Cambridge Univ. Press.*
- Gagnon M.M. & Holdway D.A., 1999.** Metabolic enzyme activities in fish gill as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, **44**: 92-99.
- Galgani F. & Bocquené G., 1989.** A method for routine detection of organophosphorates and carbamates in sea water. *Envir. Technol. Lett.*, **10**: 311-322.
- Galgani F., Henocque Y., Lafaurie M., 1992.** Surveillance des effets biochimiques des polluants sur les organismes marins le long des côtes de France. "Qualité du milieu marin - Indicateurs biologiques et physico-chimiques", Boudouresque C.F., Avon M. & Pergent-Martini C. edit., *GIS Posidonie publ.*, Fr : 59-71.
- Gallagher E.P., Gross T.S. & Sheehy K.M., 2001.** Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in lake Apoka brow bulheads (*Ameiurus nebulosus*). *Aquatic Toxicology*, **55**: 223-237.
- Gamon M., Saes A., Pelegri R. & Cuadra J.G., 1998.** Liquid chromatographic determination of five benzoylurea insecticides in fruit and vegetables. *J. AOAC. Int.*, **81**(5): 1037-1042.
- Gaspar M.B., Ferreira R. & Monteiro C.C., 1999.** Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Mollusca: Bivalvia) off Faro, southern Portugal. *Fisheries Research*, **41**: 309-316.
- Gaspar M.B., Chicharo L.M., Vasconcelos P., Garcia A., Santos A.R. & Monteiro C., 2002.** Depth segregation phenomenon in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) population of the Algarve coasts (southern Portugal). *Scie. Mar.*, **66**(2): 111-121.
- Georges G.S. & Buchanan G., 1990.** Isolation, properties and induction of piace liver cytosolic glutathione S-transferase. *Fish. Physiol. Biochem.*, **8**(6): 437-449.
- Geyer H.J., Scheunert I., Bruggmann R., Mathies M., Steinberg C.E., Zitz V., Kettrup A. & Garisson W., 1994.** The relevance of aquatic lipid content to the toxicity of lipophilic chemicals toxicity of lindane to different fish species. *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, **28**(1): 53-70.
- Gharsallah Z., Rétima A., Derbal F. & Kara M.H., 2004.** Niveaux de cinq métaux lourds (Fe, Cu, Zn, Cr, Mn) dans les sédiments superficiels de la baie d'Annaba (Méditerranée Sud-Occidentale). *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*, **37**: 203.
- Giese A. C., Hart M. A., Smith A. M. & Cheung M. A., 1967.** Seasonal changes in body component indices and chemical composition on the pismo clam *Tivela stultorum*. *Com. Biochem. Physiol.*, **22**: 549-561.
- Goldsworthy G.J., Mordue W. & Guthkelch J., 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. *General and comparative Endocrinology*, **18**(3): 545.
- Gomot A., 1997.** Does dependent effects of cadmium on the growth of snails on toxicity bioassys. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*, **33**: 209-216.
- Goldberg E.D., Bowen V.T., Farrington J.W., Harvey G., Martin J., Parker P.L., Risebourg R. & Robertson W., 1975.** The mussel watch. *Marine Pollution Bulletin*, **5**: 101-126.
- Goldberg E.D., Bowen V.T., Farrington J.W., Harvey G., Martin J.H., Parker P.L., Risebrouch R.W., Robertson W., Sheneider E. & Cambel E., 1978.** The mussel watch. *Environmental Conservationist*, **5**: 101-125.

- Gouiez H., 2006.** Apport en sels nutritifs et en matières organiques oxydables au littoral d'Annaba par l'oued Seybouse et l'estuaire de la Mafrag. Mémoire de magister, univ. Annaba : 30p.
- Griffith M.B., Barrows E.M. & Perry S.A., 2000.** Effect of diflubenzuron of adult aquatic insects (Plecoptera, Trichoptera) following emergence during the second year after aerial application. *J. Ecom. Entomol.*, **93**(6): 695-700.
- Grosscurt A.C. & Anderson S.O., 1980.** Effect of diflubenzuron on some chemical and mechanical properties of the elytra of *Leptinotarsa decemlineata*. *Proceeding of the Nedherland Akademy Wet*, **83c**: 143-150.
- Grue C.E., Guilbert P.L. & Seeley M.E., 1997.** Neurophysiological and behavioural changes in non-target wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticide: Thermoregulation, food consumption and reproduction. *Am. Zool.*, **37**: 369-388.
- Gruvel A., 1926.** La pêche maritime en Algérie. Ed. *Chalamel* :162p.
- Guettaf M., 2007.** Aspects chimiques des apports de l'oued Seybouse au littoral d'Annaba. Apport en azote, phosphore et en matières organiques. Mémoire de magister, univ. Annaba : 35p.
- Guilhermino L., Lopes M.C., Silveira L., Carvalho A.P. & Soares A.M., 1996.** Acetylcholinesterase activity in juvenils of *Daphnia Magna* Staus. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **57**: 979-985.
- Guillou J., 1980.** Les peuplements de sables fins du littoral nord-Gascogne. Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle. Univ. Bretagne occidentale : 209p.
- Gupta R. C., 1994.** Carbofuran toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health*, **43**: 383-418.
- Guillou J., 1980.** Les peuplements de sables fins du littoral Nord-Gascogne. Thèse 3^{ème} cycle, Univ. Bretagne occidentale : 209p.
- Guillou J. & Le Moal Y., 1980.** Aspects de la dynamique des populations de *Donax vittatus* et *Donax trunculus* en baie de douarnenez. *Ann. Inst. Océanogr.*, **56**(1) : 55-64.
- Guillou J. & Bayed A., 1991.** Contraintes du milieu sur les populations de *Donax trunculus* L. et *Donax venustus* Poli, du littoral atlantique marocain. *Oceanologica Acta.*, **14**(3) : 291-298.
- Gulka G., Gulka C.M. & Watabe N., 1982.** Histopathological effects of diflubenzuron on the Cirripede crustacean *Balanus eburneus*. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, **11**: 11-16.
- Gupta R.C., Goad J.T. & Kadel W.L., 1991.** *In vivo* alterations in lactate deshydrogenase (LDH) and LDH isoenzymes patterns by acute carbofuran intoxication. In: Ribeiro S., Guilhermo L., Sousa J.P. and Soares A.M. (eds) Novel bioassay based on acetylcholinesterase and lactate deshydrogenase activities to evaluate toxicity of chemical soil isopods. *Ecotoxicol and Environ. Safety*, **44**: 287-293.
- Habig W.H., Pabst M.J. & Jacoby W.B., 1974.** The glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**: 7130-7139.
- Hammen C.S. & Bullock R.C., 1991.** Opine oxidoreductases in brachiopods, bryozoans, phoronids and molluscs. *Biochem. Syst. Ecol.*, **19**(4): 263-269.
- Hart A.D.M., 1993.** Relationship between behaviour and the inhibition of acetylcholinesterase in birds exposed to organophosphorus pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**: 321-336.

- Hayes, J.D. & Dulford, D.J., 1995. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **30**: 445–600.
- Herbert A., Guilhermino L., Assis H.C.S. & Hansen P.D., 1995. Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker. *Zeitschrift Angewandte Zoologie*, **3**: 1-5.
- Hill B.R. & Levi C., 1954. Elevation of a serum component in neoplastic disease. *Cancer Res.*, **14**: 513–515.
- Howell W.M. & Denton T.E., 1989. Gonopodial morphogenesis in females mosquitofish, *Gambusia Affinis* masculinized by exposure to degradation products from plant sterols. *Environmental biology of fish*, **24**: 43-51.
- Hoy T., Horseberg T.E. & Wichstrom R., 1991. Inhibition of acetylcholinesterase in rainbow trout following dichlorvos treatment at different water oxygen levels. *Aquaculture*, **95**: 33-40.
- Huggett R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M. & Bergman H.L., 1992. Biomarkers, biochemicals, physiological and histological markers of anthropogenic stress. *Boca Raton, Lewis Publisher*: 347p.
- Hygget R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M. & Bergman H.L., 1992. Biomarkers, biochemicals, physiological and histological markers of anthropogenic stress. *Boca Raton, Lewis Publisher*: 347p.
- Ishaay I. & Casida J.E., 1974. Dietary TH 6070 alters composition and enzyme activity of housefly larval cuticle. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **4**: 484.
- Ishaay I. & Horowitz A.R., 1998. Insecticides with novel mode of action : overview. *In*: Ishaaya I & Degheel D. (eds). Insecticides with novel mode of action-mechanism and application, p:1-24, Berlin: Springer.
- Ishaay I., Horowitz A.R. & Tirry L., 2002. Novaluron (rimon), a novel IGR-mecanism, selectivity and importance in IPM programs. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, **67**(3): 617-626.
- ISO., 1998. Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonemas costatum* et *Phaedactylum tricornutum*. *International Standards Organisation*, Standard NF EN ISO10253: T90-311, 8p. *J. Fish.*, **1**(3): 325-48.
- Jacob F. & Monod J., 1961. Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J. Biol. Med.*, **3**: 318-321.
- Jakoby W.B. & Keen J.H., 1977. A triple-threat in detoxification: the glutathione S-transferases. *TIBS*, **3**: 299-301.
- Julin, A.M. & Sanders H.O., 1978. Toxicity of the IGR, diflubenzuron, to freshwater invertebrates and fishes. **38**: 256.
- Kaaya M., Najimi S., Ribera J.F., Narbonne J.F. & Moukrim A., 1999. Characterisation of glutathione S-transferase (GST) activities in *Perna perna* and *Mytillus galooprovincialis* used as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (south of Morocco). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **62**: 623-629.
- Kammenga J.E., Dallinger R., Donker H.M., Koheler H.R., Smonsen V., Triebkorn R. & Weeks M.J., 2000. Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **164**: 93-147.

- Kellouche A. & Soltani N., 2006.** Impact of hexaflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on growth, development and reproductive performance of the progeny in *Callosobruchus maculatus* after adult treatments. *African Journal of Agricultural Research*, **1**(3) : 057-064.
- Kerstant M., 1985.** Age, growth, maturity and mortality estimates of horse mackerel *Trachurus trachurus* from the western West of Great Britain and Ireland in 1984. *Arch. Fishwiss.*, **36** : 115-154.
- Khammar H., 2007.** Caractères chimiques des effluents urbains introduits au littoral d'Annaba. Mémoire magister. Univ. Annaba : 49p.
- Khebbeb M.E.H., Delachambre J., & Soltani N., 1997.** Lipid metabolism during the sexual maturation of melworm (*Tenebrio molitor*): Effect of ingested Diflubenzuron. *Pesticides Biochemistry and Physiology*, **58**: 209-217.
- Khebbeb M.E.H., 2000.** Étude du métabolisme lipidique au cours de la maturation sexuelle chez un ravageur des denrées stockées *Tenebrio molitor* : effet du diflubenzuron. Thèse Doctorat d'Etat. Univ. Annaba : 158p.
- Khélifi-Touhami M., Ounissi M., Saker I., Haridi A., Djorfi S. & Abdenour C., 2006.** The hydrology of the Mafrag estuary (Algeria): Transport of inorganic nitrogen and phosphorus to the adjacent coast. *Journal of food, agriculture and environment*, **4**(2): 340-346.
- Khessiba U.N., Hoarau P., Magnassia B. Aissa P. & Roméo M., 2001.** Réponse biochimique de la moule *Mytilus galloprovincialis* du lac de Bizerte (Tunisie) à une exposition du polluant chimique. *Environ. Toxicol. Chem.*, **40** : 222-229.
- Koya Y., Iitazu T. & Inoue M., 1998.** Annual reproduction cycle based on histological changes in the ovary of the female mosquitofish, *Gambusia affinis* in central Japan. *Ichthyol. Res.*, **45**(3): 241-248.
- Koya Y., Fujita A., Niki F., Ishihara E. & Hiyama H., 2003.** Sex differentiation and pubertal development of gonads in the viviparous mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Zoological Science*, **20**: 1231-1242.
- Labrot J., Ribera D., Saint-Denis M. & Narbonne J.F., 1996.** *In vitro* and *in vivo* study of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase and glutathione peroxidase activities in three non mammalian species. *Biomarkers*, **1**: 21-28.
- Lacey L.A. & Orr B.K., 1994.** The role of biological control of mosquitoes in integrated vector control. *Amer. J. Med. Hyg.*, **50** (6): 97-115.
- Lafaurie M., Narbonne J.F. & Galgani F., 1992.** Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin. *Anal. Mag.*, **20**(6): 27-33.
- Lagadic L., Caquet T. & Amiard J.C., 1997.** Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F., (eds). Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. *Masson*. Paris : 1-9.
- Lagbouri A., 1997.** Etude de la biologie de *Donax trunculus* dans la baie d'Agadir et de sa réponse à la pollution à travers trois biomarqueurs (Acétylcholinestérase, Peroxydation lipidique et Glutathion S-Transférase). *Fac. Sci. Agadir* (Maroc) : 171p.

- Larsenneur C., 1977.** La cartographie des dépôts meubles sur le plateau continental français : Méthodes mises au point et utilisées en Manche. *J. Rech. Océanogr.*, **II(2)** : 33-39.
- Le Cren E.D., 1951.** The length-weight relationship and seasonal cycle in goad weight and condition in the perch. *J. Anim. Ecol.*, **20**: 201-219.
- Leung K.M.Y. & Furness R.W., 2001.** Survival, growth, metallothionein and glycogen levels of *Nucella lapillus* (L.) exposed to subchronic cadmium stress: the influence of nutritional state and prey type. *Marine Environmental Research*, **52**: 173-194.
- Little E.E., Archeski R.D., Flerov B.A. & Koslovskay V.I., 1990.** Behavioural indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**: 380-385.
- Livingstone D.R., 1993.** Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biootechnol.*, **57**: 195-211.
- Long E.R., & Wilson C.J., 1997.** On the identification of toxic hot spots using measures of the sediment quality triad. *Environ. Toxicol. Chem.*, **34(6)**: 373-374.
- Long E.R., 2000.** Degraded sediment quality in US estuaries: A review of magnitude and ecological implications. *Ecol. Appl.*, **10(2)**: 338-350.
- Long S.M., Ryder K.J. & Holdway D.A., 2003.** The use of respiratory enzymes as biomarkers of petroleum hydrocarbons exposure in *Mytilus edulis plumulatus*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **55**: 261-270.
- Lubet P., Brichon G., Besnard J.Y. & Zwingelstein G., 1986.** Sexual differences in the composition and metabolism of lipids in the mantle of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk (Mollusca: Bivalvia). *Comp. Biochem. Physiol.*, **84B**: 279-285.
- Lucas A., 1965.** Recherche sur la sexualité des Mollusques Bivalves. Thèse, Rennes, 135p. In : Mouëza M., 1971. Contribution à l'étude de l'écologie et de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque : Lamellibranche). Thèse Doct. Sciences Biologiques mention Océanographie : 130 p.
- Luoma S.N. & Ho K.T., 1993.** Appropriate uses of marine and estuarine sediment bioassays. In: *Handbook of Ecotoxicology*, **1**: 193-226, P. Calows (ed.), Blackwell, Oxford.
- Manca Zeichen M., Agnesi S., Mariani A., Maccaroni A. & Ardizzone G. D., 2001.** Biology and population dynamics of *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Donacidae) in the south Adriatic coast (Italy). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **56**: 345-358.
- Mayer F.L. & Eilersieck M.R., 1986.** Manual of acute toxicity: Interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals, *U.S. Fish Wildl. Serv. Resour. Pub.* : 160p.
- Mc Carthy J.F. & Shugart L.R., 1990.** Biomarkers of environmental contamination (Boca Raton, Florida: Lewis Publishers).
- Mc Cauley D.J., De Graeve G.M., & Linton T.K., 2000.** Sediment quality guidelines and assessment: overview and research needs. *Environmental Science & Policy.*, **3**: 133-144.
- Meff G.K., 1991.** Life history changes in eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) induced by thermal elevation. *Can. J. Sci.*, **48**: 60-66.

- Meff G.K. & Snelson F.F., 1993.** Lipid dynamics during reproduction in two livebearing fishes, *Gambusia holbrooki* and *Poecilia latipina*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**: 2185-2191.
- Michel X., Narbonne J.F., Mora P., Daubèze M., Ribera D., Lafaurie M., Budzinski H. & Garrigue P.H., 1998.** Indicateurs biochimiques de la pollution des écosystèmes côtiers : expérience du groupe interface chimie-biologie des écosystèmes marins (GCBEM) In : Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., & Ramade F., 1998. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Lavoisier* : 3209.
- Michelet F., gueguen R., Leroy P. Wellman M., Nicolas A. & Sies G. 1995.** Blood and plasma glutathione measured in healthy subjects by HPLC: Relation to sex, again, biological variables and life habits. *Cein. Chem.*, **41**(10): 1509-1517.
- Miller B.S., Pine D.J. & Redshaw C.J., 2000.** An assessment of the contamination and toxicity of marine sediments in the Holy Loch, Scotland. *Mar. Pollut. Bull.*, **40**: 22-34.
- Mitchell S.H. & Kilpatrick M., 2003.** Occurrence of pesticide residues in mushrooms in Northern Irland, July 1997 – January 1999. *Food Additives and Contaminants*, **20**(8): 716-719.
- Mora P., Fournier D., & Narbonne J.F., 1999.** Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *Mytilus edulis* L. from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Muller. *Comp. Biochem. Physiol.*, **122** (3): 353-361.
- Morsli M.S., 1994.** Effect d'un dérivé de la benzoylphenylurée, le Dimilin sur la physiologie de *Penaeus Kerathurus* (Crustacea, Decapoda) : étude structurale et biologique. Thèse magister en Ecotoxicologie animale. Univ. Annaba : 87p.
- Mouëza M., 1971.** Contribution à l'étude de l'écologie et de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque Lamellibranche). Thèse Doct. Sciences Biologiques. Univ. Marseille : 130p.
- Mouëza M. & Frenkiel-Renault L., 1973.** Contribution á l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusques : Lamellibranches) dans l'Algérois : la reproduction. *Cah. Biol. Mar.*, **14**: 261-283.
- Mouëza M., 1975.** Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque Lamellibranche) dans l'Algérois. Thèse Doct., es Sciences Naturelles. Univ. Aix-Marseille : 206p.
- Mouëza M., & Chessel D., 1976.** Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque Lamellibranche) dans l'Algérois : analyse statistique de la dispersion le long d'une plage en baie de Bou-Ismaïl. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **21**: 211-221.
- Mulder R. & Gijswijt M., 1973.** The laboratory evaluation of two promising new insecticides, which interfere with cuticles deposition. *Pesticide Science* **4**, 737.
- Najimi S., 1997.** Evaluation de l'état de santé de la baie d'Agadir: Bioaccumulation métallique et réponses de deux biomarqueurs de pollution chez *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna*. Thèse de Doct. Univ. Ibnou Zohra (Maroc) : 161p.
- Nalepa T. F., Cavaletto J. F., Ford M., Gordon W. M. & Wimmer M., 1993.** Seasonal an annual variation in weight and biochemical content of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in lake St Clair. *J. Great Lakes Res.*, **19**(3): 541-552.

- Namour P., 1992.** Les mono oxygénases de poissons, un outil pour la caractérisation des pollutions chroniques. Etudes du CEMAGREF, série Ressources en Eau, n° 6 : 232p.
- Narbonne J.F., Ribera D., Michel X., Raoux C., Garrigue P., Monod J.L., Lemaire P., Galgani F., Romeo M., Salaun J.P. & Lafaurie M., 1991.** Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin : Etude comparative en mer Méditerranée. *Océanis*, **17**: 257-275.
- Narbonne J.F. & Michel X., 1992.** Use of biomarkers in assessment of contamination in marine ecosystems. Fundamental approach and applications. *Medit. Action Plan Tech. Rep. Ser.*, **71**: 1-20.
- Narbonne J.F., Daubèze M., Clérandeau C. & Garrigues P., 1999.** Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers*, **6**: 415-424.
- Neff J.M., 1979.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment sources, fates and biological effects. *Applied Science, Barking, Essex*.
- Neuberger-Cywiak L., Achituv Y., & Mizrahi L., 1990.** The ecology of *Donax trunculus* Linnaeus and *Donax semistriatus* Poli from the Mediterranean coast of Israël. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **134**: 203-220.
- Oberlander H. & Silhacek D.L., 1998.** New perspectives on the mode of action of benzoylphenyl urea insecticides with novel mode of action. Springer, 92-105.
- O'Conner T.P., 1996. Trends in chemical concentrations in mussels and oyster collected along the US coast from 1986 to 1993. *Marine Environmental research*, **41**: 183-200.
- Okumus I. & Stirling H.P., 1998.** Seasonal variation in the weight, condition index and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis*) in suspended culture in two Scottish sea lochs. *Aquaculture*, **159**: 249-261.
- Opdycke J.C., Miller R.W. & Menzer R.E., 1982.** Metabolism and fate of diflubenzuron in swine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **30**: 1223-1227.
- Orlando E.F., William P.D. & Louis J.G., 2002.** Aromatase activity in the ovary and brain of the eastern mosquitofish exposed to paper mill effluent. *Environmental Health Perspectives*, **10**: 429-433.
- Oruc E.O. & Usta D., 2007.** Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **95**: 48-55.
- Ouali K., 1997.** Observation de l'influence de quelques facteurs externes et internes sur les principales phases du cycle de reproduction d'un poisson téléostéen vivipare, *Gambusia affinis*. Thèse magister. Univ. Annaba : 95p.
- Ounissi M., 2007.** Devenir et incidences des flux de matières continentales enrichissantes et polluantes dans le littoral d'Annaba. Bilan final du projet de recherche ONEDD/MATE/05/04: 11p.
- Paoletti M.G. & Pimentel D., 2000.** Environmental risks of pesticides versus genetic engineering for agricultural pest control. *Journal of Agricultural & Environmental Ethics* **12**(3): 279-303.
- Peden A.E., 1972.** The function of gonopodial parts and behavioral pattern during copulation by *Gambusia* (Poeciliidae). *Can. J. Zool.* **50** : 955-968.

- Pellerin-Massicotte J.B., Vincent Y. & Pelletier E., 1989.** Evaluation de la qualité de l'estuaire du Saint-Laurent. Etudes spatiales. Rapport remis au *Ministère de l'Environnement du Québec* : 130p.
- Perez E., Blasco J. & Solé M., 2004.** Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cádiz bay. *Mar. Environ. Res.*, **58**: 275-279.
- Perez-Camacho A., Labarta U. & Beiras R., 1995.** Growth of mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis*) on cultivation rafts: influence of seed source, cultivation site and phytoplankton availability. *Aquaculture*, **138**: 349-362.
- Phillips D.J. & Rainbow P.S., 1993.** Biomonitoring of trace aquatic contaminants. Elsevier Applied Science. London.
- Pierce S. & Tappel A., 1987.** Glutathion peroxidase activities from rat liver. *Biochem. Biophys. Acta*, **523**: 27-36.
- Pieters H., Kluytmans J.H., Zurburg W. & Zandee D.I., 1979.** The influence of seasonal changes on energy metabolism in *Mytilus edulis* L. I. Growth rate and biochemical composition in relation to environmental parameters and spawning. *In*: Naylor E. & Hartnoll R.G. (eds). Cyclic Phenomena in Marine Plants and Animals. *Prgamon Press, New York*: 285-292.
- Pollero R.J., Ré M.E. & Brenner R.R., 1979.** Seasonal changes in lipids of the molluscs *Chlamys tehuelcha*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **64A**: 257-263.
- Prenant M., 1932.** L'analyse mécanique des sables littoraux et leurs qualités écologiques. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, **74**(29) : 581-95.
- Ramón M., Abello P. & Richardson C. A., 1995.** Population structure and growth of *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) in the western Mediterranean. *Marine Biology*, **121**: 665-671.
- Réhimí N., 2004.** Etude de la reproduction chez *Culex pipiens pipiens*. Aspects : morphologique, éthologique et physiologique. Effets de quelques inhibiteurs du développement sur quelques paramètres biologiques. Thèse Doct. d'Etat. Univ. Annaba : 175p.
- Reed D.J., 1990.** Glutathione: toxicological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**: 603-631.
- Reegoli F. & Principato G., 1995.** Glutathione dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicol.*, **3**: 141-164.
- Rehimi N. & Soltani N., 1999.** Laboratory evaluation of Alsystine. A chitin synthesis inhibitor, against *Culex pipiens* L. (*Diptera Culicidae*) : effects on development and cuticle secretion. *J. Appli. Ent.*, *Nlack-Well Wissenschafts-Verlag, Berlin.*, **123**: 437-441.
- Reidy G.F., Rose H.A., Viseton S. & Murray M., 1990.** Increased glutathione S-transferase activity and glutathione content in an insecticide-resistant strain of *Tribolium castaneum* (Herbst). *Pesticide Biochemestry and Physiology*, **36**: 269-279.
- Ribeiro S., Guilhermol L., Sousa J.P. & Soares A.M., 1999.** Novel bioassay based on acetylcholinesterase and lactate deshydrogenase activities to evaluate toxicity of chemical soil isopods. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **44**: 287-293.

- Richmonds C. & Dutta H.M., 1992.** Effect of malathion on optomotor behaviour of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **102**: 523-526.
- Ringwood A.H., Connors D.E., Keppler C.J. & Dinovo A.A., 1999.** Biomarkers studies with juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) deployed *in situ*. *Biomarkers*, **4**: 400-414.
- Rodriguez-Ariza A., Abril N., Navas J.L., Dorado G., Lopez-Barea J. & Pueyo C. 1992.** Metal, mutagenicity, and biochemical studies on Bivalve Molluscs from Spanish coasts. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **19**: 112-124.
- Rodriguez E., Ramon J.B., Arantxa G., Roberto P., Zurine G.D.B. & Carmen S., 2001.** Persistence of the insecticides dimilin 45 ODC on conifer forest in an Atlantic climate ecosystem. *Environ. Sci. Technol.*, **35**: 3804-3808.
- Rosa-Moliner E., Proskocil B.J., Hendricks S.E. & Fritzsche B., 1998.** A mechanism for anterior transposition of the anal fin and its appendicular support in the western mosquitofish, *Gambusia affinis* (Baird and Girard, 1854). *Acta Anatomica*, **163**: 75-91.
- Rosen D.E. & Gorden M., 1953.** A new fish of the genus *Gambusia* from southern Veracruz, Mexico, with discussion of the tribe *Gambusiini hubbs*. *Zoologica* (N.Y.), **36** (21): 267-272.
- Russell-Hunter W. D., 1985.** Physiological, ecological and evolutionary aspects of molluscan tissue degrowth. *American Malacological Bulletin*, **3**: 213-221.
- Saglio P., Trijasse S. & Azam D., 1996.** Behavioural effects of water-borne carbofuron in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **31**: 232-238.
- Saint-Denis M., Labrot F., Nabronna J.F & Rebera D., 1998.** Glutathione-related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **35**: 602-614.
- Saker I.E., 2007.** Pollutions chimiques par les effluents industriels directs introduits au littoral d'Annaba. Mémoire magister. Univ. Annaba: 34p.
- Salas-Casanova C., 1987.** Ecología de los Donacidae (Mollusca, Bivalvia) de la bahía de Málaga (SE de España). *Investigacion Pesquera*, **51**: 67-77.
- Sancho E., Ferrando M.D. & Andreu E., 1997a.** Response and recovery of brain acetylcholinesterase in the European eel, *Anguilla anguilla*, exposed to fenitrothion. *Ecotoxicol. Environ. Safte.*, **38**: 205-209.
- Sancho E., Ferrando M.D., & Andreu E., 1997b.** Response and recovery of acetylcholinesterase in the European eel *Anguilla anguilla* exposed to fenitrothion. *J. Environ. Sci. Health B.*, **32**: 915-928.
- San Juan Serrano F., Alonso A.S., Lopez S.L.B. & Martin O.G., 1998.** Regulation of *Mytilus galloprovincialis* glycogen phosphorylase by glucose and glucose-6-phosphate. *Journal of Shellfish Research*, **17**(1): 159-163.
- Scheifler R., Gauthier-Clerc M., Le Bohec C., Crini N., Coeudassier M., Badot P.M., Giraudoux P. & Le Maho Y., 2005.** Mercury concentrations in king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) feathers at Crozet islands (sub-Antarctic): Temporal trend between 1966-1974 and 2000-2001). *Environ. Toxicol. Chem.*, **14**: 1233-1239.
- Scherer E., 1992.** Behavioural responses as indicators of environmental alteration: Approaches, results, developments. *J. Appl. Ichthyol.*, **8**: 122-131.

- Scott J.G., 1999.** Cytochrome P450 and insecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **125**: 757-777.
- Selvik A., Hansen P.K., Ervik A. & Samuelson O.B., 2002.** The stability and persistence of diflubenzuron in marine sediments studies under laboratory conditions and the dispersion to the sediment under a fish farm following medication. *Sci. Tot. Environ.*, **285**: 237-245.
- Semadi, A., Deruelle, S., 1993.** Lead pollution monitoring by transplanted lichens in Annaba area (Algeria). *Rev. Poll. Atmos.* Oct-Dec: 86-102.
- Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyneck C., New hall A. & Freidman L., 1966.** A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analyt. Biochem.*, **19**: 415-428.
- Sies H., 1999.** Glutathione and its role in cellular functions. *Free Rad Biol Med.*, **27**: 916-921.
- Sifi K., 2002.** Evaluation des effets d'un xénobiotique, l'acide borique sur la structure du tube digestif, l'inhibition d'un site cible, l'acétylcholinestérase, et l'activité d'une enzyme de detoxification, la lactate déshydrogénase (LDH) chez *Blatella germanica*. Thèse magister, univ. Annaba : 105p.
- Silbergeld E.K., 1993.** Neurochemical approaches as indicators of environmental biochemical markers of neurotoxicity: Review of current status and evaluation of future prospects. *Environ. Res.*, **63**: 274-286.
- Singh D.K. & Agarwal R.A., 1983.** *In vitro* and *in vivo* studies on synergism with acetylcholinesterase pesticides in the snail *Lymnaea acuminata*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **12**: 483-487.
- Sivagnaname N. & Kalyanasundaram M., 2004.** Laboratory evaluation of methanolic extract of *Atlantia monophylla* (Family: Rutadeae) against immature stage of mosquitoes and non-target organisms. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, **99**(1): 115-118.
- Soengas J.L., Sanmartin B., Barciela P., Aldegunde M. & Rozas G., 1993.** Changes in carbohydrate metabolism related to the onset of ovarian recrudescence in domesticated Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. **105A**(2): 293-301.
- Sokolowski, A., Fichet, D., Garcia-Meunier, P., Rafenec, G., Wolwicz, M., Blanchard, G., 2002.** The relationship between metal concentrations and phenotypes in the Baltic clam *Macoma baltica* from the gulf of Gdansk, southern Baltic. *Chemosphere* **47**, 475-484.
- Soltani N., Delbecque J.P. & Delachambre J., 1983.** Penetration and insecticidal activity of diflubenzuron in *Tenebrio molitor* pupae. *Pestic. Sci.*, **14**: 615-622.
- Soltani N., Delbecque J.P. & Delachambre J., 1984.** Effects of diflubenzuron on the pupaladult development of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): Growth and development, cuticle secretion epidermal all density, and DNA synthesis, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **21**: 256-264.
- Soltani N., 1990.** Action du diflubenzuron et de la 20-hydroxyecdysone sur les glucides et les protéines hémolyphatiques chez la nymphe de *Tenebrio molitor* L. *Ann. Soc. Ent. Fr. (n.s.)*, **26**(4) : 575-584.

- Soltani N. & Soltani-Mazouni N., 1992.** Diflubenzuron and oogenesis in coding moth, *Cydia pomonella* (L.), *Pest. Sci.*, **34**: 257-261.
- Soltani N., Chebira S., Delbecque J.P. & Delachambre J., 1993.** Biological activity of flucycloxuron, a novel benzoilphenylurea derivate, on *Tenebrio molitor* : Comparison with diflubenzuron and triflumuron. *Experientia.*, **49**(12): 1088-1091.
- Soltani N., Pitozet N., Soltani-Mazoni N. & Delbecque J.P., 1994.** Quantification par chromatographie liquide de haute performance du diflubenzuron et du flucycloxuron chez *Tenebrio molitor* et *Thaumetopoea pytiocampa*. *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent*, **59/2a** : 481-486.
- Soltani-Mazouni N. & Soltani N., 1994.** Diflubenzuron affected DNA synthesis in the ovaries of *Tenebrio molitor*. *J. Invert. Reprod. Dev.*, **25**: 19-21.
- Soltani-Mazouni N. & Soltani N., 1995.** Effet du diflubenzuron en traitement *In vivo* and *in vitro* sur la morphométrie de *Tenebrio molitor*. *Fac. Landbouww. Univ. Gent*. **60** (35) : 961-967.
- Soltani N., Soltani-Mazouni N., Quennedy B. & Delachambre J., 1996.** Protein synthesis in developing ovaries of mealworm under *in vivo* and *in vitro* conditions: Effects of diflubenzuron. *J. Stored. Prod. Res.*, **32**(3): 205-212.
- Soltani N., Rehimi N., Beldi H. & Bendali., 1999.** Activité du triflumuron sur *Culex pipiens pipiens* (diptra : *Culicidae*) et impact sur deux espèces larvivoires non visées. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S)*, **35** (suppl.) : 502-508.
- Soltani N. & Morsli S., 2003.** Quantification du dimilin par chromatographie liquide haute performance : étude de sa dégradation dans l'eau de mer. *J. Rech. Océanogr.*, **28** : 118-120.
- Spates G.E. & Wright J.E., 1980.** Residues of diflubenzuron applied topically to adult stable flies. *J. Entomol.*, **73**: 595-598.
- Spencer C.C., Chlan C.A., Neigel J.E., Scribner K.T., Wooten Wm.C. & Leberg P.L., 1999.** Polymorphic microsatellite markers in the western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Molecular Ecology*, **8**: 157-168.
- Steadman B.L., Farag A. & Bergman H.L., 1991.** Exposure related patters of biochemical indicators in rainbow trout exposed to NO 2 fuel oil. *Environ. Toxicol. Chem.*, **10**: 365-374.
- Stequert B., 1971.** Contribution à l'étude de la croissance et de la reproduction du Bar (*Dicentrarchus labrax* L.) dans le réservoir à poissons du bassin d'Arcachon. Rapport D.E.A, Université de Bordeaux I : 54p.
- Stien X., Risso C., Gnassia-Barelli M., Romeo M. & Lafaurie M., 1997.** Effect of copper chloride *in vitro* and *in vivo* on the hepatic EROD activity in the fish *Dicentrarchus labrax*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**: 214-219
- Stien X., Percic P., Gnassia-Barelli M., Romeo M. & Lafaurie M., 1998.** Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to asses the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean sea. *Environ. Poll.*, **99**: 111 - 117.
- Stryer L., 1988.** Biochemistry. 3rd Edition. *Freeman*, New York: 231p.
- Sundaram K.M.S. & North R., 1989.** High performance liquid chromatographic method for the determination of diflubenzuron from forestry substrates. *Journal of Liquid Chromatography*, **12**: 2333-2343.

- Sundaram K.M.S., Holmes S.B., Kreutzweiser D.P., Sundram A. & Kingsbury P.D., 1991.** Environmental persistence and impact of diflubenzuron in a forest aquatic environment following aerial application. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **20**: 313-324.
- Sureda A., Box A., Ensenat M., Alou E., Tauler P., Deudero S. & Pons A., 2006.** Enzymatic antioxidant response of a labrid fish (*Coris julis*) liver to environmental caulerperpyne. *Comp. Biochem. Physiol.*, **144**: 191-196.
- Suteau P.M., Migand M.L. & Narbone J.F., 1987.** Absorption and distribution of radioactivity in mussels (*mussels galloprovincialis*) exposed to low concentration of C¹⁴ polychlorinated biphenyl. *Sci. Tox. Environ*, **67**: 187-193.
- Straus D.L. & Chambers J.E., 1995.** Inhibition of acetylcholine esterase and aliesterase of fingerling channel cat fish by chlorpyrifos, parathion and S, S, S -tributyl phosphorotrithioate (DEF). *Aquat. Toxicol.*, **33**: 311-324.
- Swartz R.C., Deben W.A. & Cole E.A., 1979.** A bioassay for the toxicity of sediment to marine macrobenthos. *J. Water Pollut. Control. Fed.*, **54**: 944-950.
- Swartz R.C., De Ben W.A., Sercu K.A. & Lamberson J.O., 1982.** Sediment toxicity and distribution of Amphipods in Commencement Bay, Washington, USA. *Mar. Pollut. Bull.*, **13**: 359-364.
- Swartz R.C., Ditsworth G.R., Schults D.W. & Lamberson J.O., 1985.** Sediment toxicity to a marine infaunal amphipod: cadmium and its interaction with sewage sludge. *Mar. Environ. Res.*, **18**: 133-153.
- Teles M., Pacheco M. & Santos M.A., 2003.** *Anguilla Anguilla* L., liver ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and β -naphthoflavone. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **55**(1): 98-107.
- Thomas D.J. & Juedes M.J., 1992.** Influence of lead on the glutathione status of the atlantic croaker tissues. *Aquatic Toxicology*, **23**: 11-30.
- Thompson B., Anderson B., Hunt J., Taberski K. & Phillips B., 1999.** Relationship between sediment contamination and toxicity in San Francisco Bay. *Mar. Environ. Res.*, **48**: 285-310.
- Tidjani O.H., 1997.** Topographie, structure et ultrastructure des mécanorécepteurs de la ligne latérale d'un poisson Téléostéen prédateur de larves de moustiques *Gambusia affinis*. Thèse magister. Univ. Annaba : 87p.
- Tietz N.W., 1987.** Fundamentals of clinical chemistry. In: Ribeiro S., Guilherme L., Sousa J.P. and Soares A.M. (ed) Novel bioassay based on acetylcholinesterase and lactate dehydrogenase activities to evaluate toxicity of chemical soil isopods. *Ecotoxicol. And Environm. Safety*, **44**: 325-333.
- Tirado C. & Salas C., 1998.** Reproduction and fecundity of *Donax trunculus* L., 1758 (Bivalvia: Donacidae) in the littoral of Málaga (Southern Spain). *Journal of Shellfish Research*, **17**(1): 169-176.
- Tomita T., Hidoh O. & Kono Y., 2000.** Absence of protein polymorphism attributable to insecticide – insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotellix cincticeps*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **30**: 325-333.

- Torres M.A., Testa C.P., Gaspari C., Masutti M.B., Panitz C.M.N., Curi-Pedrosa R., Almeida E.A., Di Mascio P. & Filho D.W., 2002.** Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.*, **44**: 923-932.
- Toutant J.P., 1989.** Insect acetylcholinesterase: Catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog. Neurobiol.*, **32**: 719-734.
- Trevallion A., 1971.** Studies on *Tellina tenuis* Da Costa. III. Aspects of general biology and energy flow. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **7**: 95-122.
- Vaissière R. & Fredj G., 1963.** Contribution à l'étude de la faune benthique du plateau continental de l'Algérie. *Bull. Inst. Océanogr. Monaco.*, **60**(1272): 83p.
- Valenzuela A.I., Pico Y. & Font G., 2000.** Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometric analysis of benzoylurea insecticides in citrus fruits. *Rapid Commun. Mass Spectr.*, **14**: 572-577.
- Van Der Leek M.L., Donovan G.A., Saltman R.L. & Moja R.J., 1991.** Effect of an insecticide controlled-release bolus on a milk antibiotic residue test. *Journal of Dairy Science*, **74**: 433-435.
- Vanegas C., Espina S., Botello A.V. & Villanueva S., 1997.** Acute toxicity and synergism of cadmium and zinc in white shrimp, *Penaeus setiferus*, juveniles. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **58**: 87-92.
- Varanka I., 1968.** Biochemical investigation of cholinesterase in central nervous system of *Lymnaea stagnalis* L. (Gasteropoda). *Annal. Biol. Tihany.*, **35**: 93-107.
- Voliani, A., Auteri, R., Bairo, R. & Giannardi, G. 1990.** Changes in size and abundance of *Donax trunculus* related to depth and bottom characteristics. *Rapp. Comm. Int. Mer. Medit.* **32** (1): 29.
- Wade B.A., 1964.** Notes on the ecology of *Donax denticulatus* (Linné). *Proc. Gulf. Carib. Fish. Inst.*, **17**: 36-41.
- Walker C.H. & Thompson H.M., 1991.** Phylogenetic distribution of cholinesterase and related esterases. In: Mineau P (ed) Cholinesterase-inhibiting insecticides. Elsevier, Amsterdam : 1p.
- Wallace R.A., 1985.** Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: Browder LW(ed) Developmental biology. Plenum Press, New York, **1**: 127-177.
- Wan X., Ma T., Wu W. & Wang Z., 2004.** EROD activities in a primary cell culture of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) hepatocytes exposed to polychlorinated aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **58**: 84-89.
- Wauhope R.D., Butler T.M., Hornsby A.G., Augustijn-Bekers P.W.M. & Burt J.P., 1992.** The SCS/ARS/CES pesticides properties data base for environmental decision making. *Rev. Envi. Contam. Toxicol.*, **123**: 1-157.
- Webb K.L. & Chu F.E., 1983.** Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. In: Freitas L., Labarta U. & Fernandez-Reiriz M. J., 2002c. Evolution of fatty acid profiles of subtidal and rocky shore mussel seed (*Mytillus galloprovincialis*, Lmk.). Influence of environmental parameters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **268**: 185-204.
- Weckbercker G. & Cory J.C., 1988.** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L 12: O Cells *in vitro* cancer. *Letters*, **40**: 257-264.

- Weis J.S. & Ma A., 1987** . Effects of the pesticide diflubenzuron on larval horseshoe crab *Limulus polyphemus* . *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* , **39**: 224 -228.
- Weisberg S., 1985** . Minitab reference manual. PA states college, Minitab : 232p.
- Wendi J.D., Cope W.G., Rada R.G. & Sandheinrich M.B. , 2001**. Acetylcholinesterase inhibition in the threeridge mussel (*Ambuema plicata*) by chlorpyrifos: implication for biomonitoring. *Ecotoxicol. Environ. Safety* , **49**: 91 -987.
- Widdows J., Donkin P., Brinsley M.D., Evans S.V., Salkeld P.N., Franklin A., Law R. J. & Waldock M.J., 1995**. Scope for growth and contaminants levels in North Sea mussels *Mytilus edulis* . *Mar. Ecol. Prog. Ser.* , **127**: 131 -148.
- Widdows J., Nasci C. & Fossato V.U., 1997** . Effects of pollution on the scope for growth of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice lagoon, Italy. *Mar. Environ. Research* , **43**: 69 -79.
- Wiegand M.D. & Idler D.R. 1982**. Synthesis of lipids by the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ovary *in vitro* . *Can. J. Zool.* , **60**: 2683 -2693.
- Williams A.K. & Sova C.R. , 1966**. Acetylcholinesterase I evels in brains of fishes from polluted water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* , **5**: 198 -204.
- Williams C.J. & McMahon R. F., 1989**. Annual variation of tissue biomass and carbon and nitrogen content in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* relative to downstream dispersal. *Can. J. Zool.* , **67**: 82 -90.
- Wo K.T., Lam P.K.S. & Wu R.S.S., 1999**. A comparison of growth biomarkers for assessing sublethal effects of cadmium on marine gastropod, *Nassarius festivus* . *Marine Pollution Bulletin* , **39**: 165 -173.
- Woods J.S. & Ellis M.P., 1995**. Up-regulation of glutathione synthesis in rat kidney by methyl mercury -induced oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* , **5**: 1719 -1724.
- Yang Y., Wu Y., Chen S., Devine G.J., Denholm I., Jewess P. & Moores G.D., 2004**. The involvement of microsomal oxidases in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* from Asia. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* , **34**: 763 -773.
- Yo C.L., Liu C.L., Tsai C.Y., Sun K. H., Liao T.S. W.M. chen H.L. & Y o H.S., 1993** . Prostaglandin E₂ suppresses phytohemagglutinin -induced immune responses of normal human monocyat cells by decreasing intracellular glutathione generation, but not due to increased DNA strand breaks or apoptosis. *Aegent Action* , **40**: 191 -199.
- Zandee D.I, Klutymans J. H., Zurburg W. & Pieters H., 1980**. Seasonal variation in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. *Nether. J. Sea Res.* , **14**: 1 -29.
- Zinkl J.G., Lokhart W.L., Kenny S.A. & Ward F.J., 1991**. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. *In: Chemicals in agriculture* (P. Mineau, Ed), **2**: 233 -253.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

I- Publications internationales : (08)

1- Soltani N., Réhimi N., **Beldi H.** & Bendali F., 1999. Activité du triflumuron sur *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) et impacts sur deux espèces larvivores non visées. *Annales de la société entomologique de France*, **N° Spécial** (35) : 502-508.

2- **Beldi H.** & Soltani N., 2001. Effects of diflubenzuron on growth and glutathione in mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Med. Fac. Landbouww.Univ. Gent*, **66/2b**: 857-862.

3- Draredja B. & **Beldi H.**, 2002. Contribution à la connaissance des mollusques testacés de la lagune du Mellah (Nord-Est algérien). *Bull. Inst. Nat. Sci. Techn. Mer. N° spécial* (7). Actes des Cinquièmes journées tunisiennes des sciences de la mer, Ain Draham (Tunisie) : 29-32.

4- **Beldi H.** & Soltani N., 2003. Laboratory evaluation of dimilin on growth and glutathione activity in mosquitofish, a non – target species. *Comm. Appl. Biol. Sci.*, Ghent University, **68**(4a): 299-304.

5- Draredja B & **Beldi H.**, 2003. Macrofaune benthique d'un milieu lagunaire à vocation aquacole en période automnale : lagune Mellah (Algérie septentrionale). *Bull. Inst. Nat. Sci. Techn. Mer. N° spécial* (8). Actes des Sixièmes journées tunisiennes des sciences de la mer, Tunis (Tunisie) : 25-28.

6- Draredja B. & **Beldi H.**, 2004. Distribution de la palourde *Venerupis decussata* (Linnaeus, 1758) dans la lagune Mellah durant la période automne, hiver et printemps''. *Bull. Inst. Nat. Sci. Techn. Mer. N° spécial* (9). Actes des Septièmes journées tunisiennes des Sciences de la Mer, Zarzis (Tunisie) : 9-12.

7- Draredja B., **Beldi H.** & Kara M.H., 2005. Composition et abondance de la macrofaune benthique d'une lagune côtière non polluée : lagune Mellah (Algérie Nord-Est). *Proceeding du Xth International Workshop Proceeding of Marine and Coastal Protected Areas*, Meknès (Morocco) : 250-252.

8- **Beldi H.**, Gimbert F., Maas S., Scheifler R. & Soltani N., 2006. Seasonal variations of Cd, Cu, Pb and Zn in the edible mollusc *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba, Algeria. *African Journal of Agricultural Research*, **1**(4) : 085-090.

2- Publications nationales : (01)

1. **Beldi H.** "Reproduction de *Gambusia affinis* (Poisson, Téléostéen) dans la région de Annaba." *Revue des Sciences et Technologie, Synthèse, N° spécial* Biologie Animale. Université d'Annaba, Juin 2001 : 15-24.

3- Communications internationales: (22)

1- Soltani N., Rehimy N., **Beldi H.** & Bendali F. "Activité du triflumuron à l'égard de *Culex pipiens* et impacts sur deux espèces larvivores non visées. IVème conférence internationale francophone d'entomologie, Saint-Malo, 5-9 juillet 1998.

2- **Beldi H.** & Bouziouk F. "Évaluation des effets secondaires d'un insecticide inhibiteur de la synthèse de la chitine sur la croissance et la reproduction d'un poisson larvivoire. Journées Internationales d'Étude sur les Sciences Marines "J'NESMA-99", GET/1°RM, 29-31 mai 1999.

3- **Beldi H.** & Soltani N. " Effects of diflubenzuron on growth and glutathione in mosquitofish (*Gambusia affinis*)". 52th International Symposium on crop protection. Université de Gent, Belgique, (2000).

4- **Beldi H.** & Draredja B. "Cycle sexuel de *Gambusia affinis* (poisson téléostéen) dans la région d'Annaba". International Workshops on the marine biodiversity in islamic countries. Algiers, October 22-24th 2001.

5- Draredja B. & **Beldi H.** "Macrofaune benthique d'un milieu lagunaire méditerranéen : lagune Mellah (Algérie Est)". Quatrième congrès magrébin des Sciences de la Mer, Mahdia (Tunisie), 9-11 novembre 2001.

6- Draredja B & **Beldi H.** " Contribution à la connaissance des mollusques testacés de la lagune du Mellah (Nord-Est algérien)". Cinquième journées tunisienne des sciences de la mer, Ain Draham (Tunisie), 21-24 décembre 2002.

7- Aouadene A., **Beldi H.** & Soltani N.. "Dosage de deux biomarqueurs chez *Donax trunculus* provenant de deux sites dans le golfe d'Annaba". Cinquième journées tunisienne des sciences de la mer, Ain Draham (Tunisie), 21-24 décembre 2002.

8- **Beldi H.** & Soltani N. "Laboratory evaluation of dimilin on growth and glutathione activity in mosquitofish, a non – target species". 55th International Symposium on crop protection. Université de Gent, Belgique, (2003).

- 9- Beldi H. & Soltani N.** "Cycle sexuel de *Gambusia affinis* (Poisson téléostéen) dans la région d'Annaba (Algérie)". Cinquième journées tunisienne des sciences de la mer, Ain Draham (Tunisie), 28-30 novembre 2003.
- 10- Draredja B. & Beldi H.** "Macrofaune benthique d'un milieu lagunaire à vocation aquacole en période automnale : lagune Mellah (Algérie septentrionale)". Sixième journées tunisienne des Sciences de la Mer, Tunis (Tunisie), 28-30 novembre 2003.
- 11- Draredja B. & Beldi H.** "Composition et abondance du macrobenthos de la lagune Mellah (El-Kala, Algérie Nord-Est)". Colloque Euro-Méditerranéen d'Écologie Animale, Annaba (Algérie), 22-24 novembre 2004.
- 12- Soltani N., Zaïdi N. & Beldi H.** "Effets secondaires d'un insecticide sélectif sur un poisson non ciblé (*Gambusia affinis*) : croissance des alevins, activité de biomarqueurs et analyse des résidus". Colloque Euro-Méditerranéen d'Écologie Animale, Annaba (Algérie), 22-24 novembre 2004.
- 13- Beldi H., Draredja B. & Soltani N.** "Données préliminaires sur la coque *Cardium glaucum* dans la lagune Mellah (Algérie Nord-Est)". Septième journées tunisienne des Sciences de la Mer, Zarzis (Tunisie), 18-22 décembre 2004.
- 14- Draredja B. & Beldi H.,** "Distribution de la palourde *Venerupis decussata* (Linnaeus, 1758) dans la lagune Mellah durant la période automne, hiver et printemps". Septième journées tunisienne des Sciences de la Mer, Zarzis (Tunisie), 18-22 décembre 2004.
- 15- Beldi H., Soltani N. & Draredja B.,** "Évaluation d'un insecticide sélectif sur un poisson larvivoire non ciblé (*Gambusia affinis*)". Quatrième Congrès Maghrébin des Sciences de la Mer, Monastir (Tunisie), 17-21 décembre 2005.
- 16- Beldi H. & Soltani N.,** "Impact d'un insecticide (Diflubenzuron) sur un poisson non ciblé : croissance des alevins et indices métriques des adultes". CILEF, Tunisie, 19-21 mars 2006.
- 17- Beldi H. & Soltani N.,** "Étude du cycle reproducteur de *Gambusia affinis* dans la région d'Annaba (Algérie)". 3^{ème} Congrès Franco-tunisien de Zoologie, Tabarka (Tunisie), 3-7 novembre 2006.
- 18- Beldi H. Scheifler R. & Soltani N.,** "Métaux traces chez *Donax trunculus* dans le golfe d'Annaba, Algérie Nord-Est". 2^{ème} Colloque Euro-méditerranéen de Biologie environnementale, Marseille (France), 7-10 décembre 2006.

19- Beldi H., Draredja B. & Soltani N. "Étude préliminaire de la répartition du Bivalve *Donax trunculus* dans le golfe d'Annaba (Algérie Nord-Est)". Workshop International, Gestion Intégrée des Zones Côtières (GIZC), ISMAL (Alger), 11-13 décembre 2006.

20- Draredja B., **Beldi H.** & Ouali N. "Étude préliminaire de la répartition de la palourde *Ruditapes decussatus* dans la lagune Mellah (Algérie Nord-Est)". Huitième Journées tunisiennes des Sciences de la Mer, Hammamet (Tunisie), 16- 19 décembre 2006.

21- Beldi H., Draredja B. & Soltani N. "Statut des Patellidés du golfe d'Annaba (Algérie Nord-Est)". VIIème Congrès maghrébin des Sciences de la Mer & Premier congrès Franco-maghrébin de zoologie et d'ichtyologie, El Jadida (Maroc), 4-7 novembre 2007.

22- Draredja B. & **Beldi H.** "Abondance du bivalve fouisseur *Loripes lacteus* (Linnaeus, 1758) dans la lagune Mellah (Algérie Nord-Est)". VIIème Congrès maghrébin des Sciences de la Mer & Premier congrès Franco-maghrébin de zoologie et d'ichtyologie, El Jadida (Maroc), 4-7 novembre 2007.

Communications nationales: (02)

1- Beldi H. & Soltani N. "Données sur la reproduction de *Gambusia affinis* (Poisson, Téléostéen) et corrélation métabolique". Colloque national sur la Biologie animale appliquée, Annaba (Algérie), 11-12 octobre 1993.

2- Beldi H. & Soltani N. "Étude de la reproduction de *Gambusia affinis*, poisson prédateur de larves de moustiques à Annaba". 2^{èmes} journées d'entomologie, organisées par l'I.N.A d'El-Harrach (Algérie), 16-18 mars 1998.

Full Length Research Paper

Seasonal variations of Cd, Cu, Pb and Zn in the edible mollusc *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba, Algeria

Hayette Beldi¹, Frédéric Gimbert², Samuel Maas², Renaud Scheifler², Noureddine Soltani^{1*}

¹Laboratory of Applied Animal Biology Department of Biology, University of Annaba 23000-Annaba, Algeria

²University of Franche-Comté, Department of Environmental Biology, EA 3184 MR USC INRA, Place Leclerc 25030-Besançon Cedex, France

Accepted 2 November, 2006

Seasonal variations in the concentrations of four trace heavy metals (cadmium (Cd), copper (Cu), lead (Pb) and zinc (Zn)) were determined in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) at two contaminated sites in the gulf of Annaba (East of Algeria): El Battah and Sidi Salem. The average concentrations of the metals exhibited the following order: Zn>Cu> Pb>Cd for the two sites. The statistical analysis revealed a significant effect of seasons for all metals measured, the highest values being recorded in winter for Zn and in summer for the other metals. Contrary to expectation, both sites were contaminated with trace heavy metals analysed. Although the highest levels were detected in Sidi Salem beach, there was no significant difference on trace heavy metal concentrations between sites, except for Cd. The implication of this metal contamination for local population was discussed.

Keywords: Bivalve Molluscs; *Donax trunculus*; Environmental contamination; Trace heavy metals, Biomonitoring.

INTRODUCTION

The coastal zone receives a large amount of metal pollution from agricultural and industrial activity (Usero et al., 2005). Pollution by heavy metals is a serious problem due to their toxicity and ability to accumulate in the biota (Islam and Tanaka, 2004). There is still a general concern about the impact of metals in the aquatic environment (Grosell and Brix, 2005). Bivalves are filter-feeders and thus uptake heavy elements not only from food and water but also from ingestion of inorganic particulate materials (El-Sikaily et al., 2004). Moreover, they have been well established as bioindicators for monitoring the concentration of heavy trace metals in many areas in the world (Neuberger-Cywiak et al., 2003).

Due to their economic and ecological importance, as well as their sedentary life, molluscs have assumed a

major role in monitoring contaminants worldwide (Boening, 1999). The bivalve *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Donacidae) is a widespread clam that lives in sandy beaches of the world (McLachlan et al., 1996). This species has also been used as a monitor of baseline environmental metal concentration (Romeo and Gnassia-Barelli, 1988). This species was found in higher densities in the sand beaches of the Annaba gulf in Algeria (Vaissière and Fredj, 1963) and is widely consumed by the local population. Their habitats are exposed to several pollutants from different sources (Abdenour et al., 2004). Recently, acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *D. trunculus* were used as biomarkers of contamination in the gulf of Annaba (Abbes et al., 2003).

The present experiment completes previous reports made on the studied area concerning the trace heavy metals (Abdenour et al., 2000, 2004) or on *D. trunculus* (Abbes et al., 2003; Bouzeraa et al., 2004). Cadmium (Cd), copper (Cu), lead (Pb) and zinc (Zn) are the most present trace heavy metals in the wastewater of the gulf (Semadi

*Corresponding author's Email: nsolt@yahoo.fr Fax: + 213 38 87 11 91.

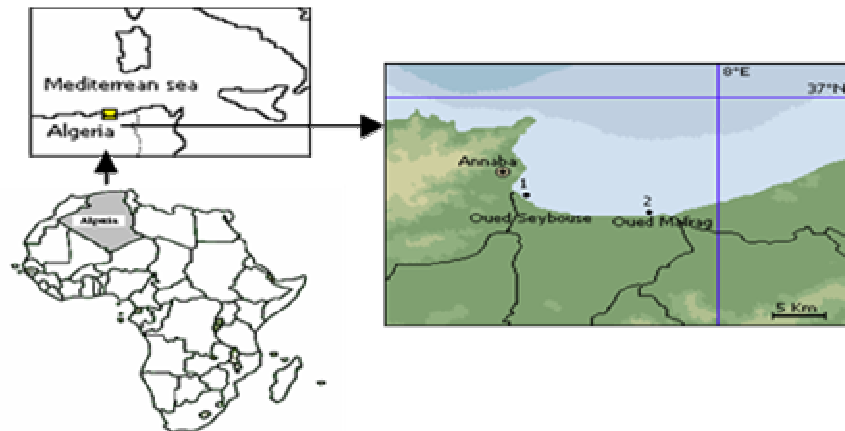


Figure 1. Location of studied area in Algeria and the two sampling sites in the Annaba gulf: Sidi Salem (1) and El Battah (2) beaches.

and Deruelle, 1993; Abdenmour et al., 2000, 2004). Zn and Cu are used in small amounts as fertilizers in some soils deficient in these elements, while Zn, Cu and Cd are constituents of some fungicides. In addition, Cd and Zn occur as contaminants of phosphoric fertilizers (Migon et al., 1991). Biomonitoring programs based on measures of contaminants in marine organisms are also interesting from a human health point of view. Many factors such as season and physiological state or size of animals could affect the bioaccumulation of heavy metals in molluscs (Romeo and Gnassia-Barelli, 1988). Therefore, this study examined the seasonal variations of heavy trace metal concentrations in *D. trunculus* from coastal waters from northeast Algeria.

MATERIALS AND METHODS

Animals and collection sites

The Northeast of Algeria is characterised by its Mediterranean climate: hot and dry in summer (June-September), cold and wet in winter (December-February) and moderate in autumn and spring, with an average annual precipitation of 800 mm. Samples of standardized shell size (30 ± 5 mm) of *D. trunculus* were collected during four seasons (spring, summer, autumn and winter). Individuals were collected from two selected sites in the Annaba gulf (Figure 1). El-Battah beach ($8^{\circ} 15' \text{LE}$, $36^{\circ} 38' \text{IN}$), located about 30 km to the East of Annaba, far from any source of pollution and expected as a relatively clean site, and Sidi Salem beach ($7^{\circ} 16' \text{LE}$, $36^{\circ} 68' \text{IN}$) situated about 1 km to the East of Annaba and considered affected by the emission of considerable domestic, agricultural and industrial waste and locally untreated sewage (Semadi and Deruelle, 1993; Abdenmour et al., 2000). Animals were collected from the two sites in May, July, September and December 2005. Analyses were made in six pooled samples per site and per season, each containing 20 individuals.

Analysis of trace metals

After collection, the clams were allowed to flush out undigested matter in filtered seawater from the sampling sites for 24 h (Soko-

lowski et al., 2002). The whole soft tissues of 20 individuals from each location and season were carefully removed by shelling the bivalves with a plastic knife (Chiu et al., 2000). Samples were dried at 60°C to a constant weight. All reagents were of analytical grade and obtained from Carlo Erba (Val de Rueil, France). All samples were digested in 4 ml of HNO_3 (50%) in closed polystyrene crystal tubes in a drying oven at 60°C for 48 h. Following acid digestion, all samples were analysed for Cd, Cu, Pb and Zn by atomic absorption spectrophotometry (Varian 220 FS and 220Z with Zeeman background correction). Validity of analytical methods was checked using standard biological reference materials (TORT-2, lobster hepatopancreas) provided by the National Research Council of Canada (Institute for National Measurement Standard, Ottawa, ON, Canada).

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error (SD). Comparison of mean values between sites (for the same season) and between seasons (for the same site) were estimated by Student's t-test. The effects of both seasons and sites of sampling were tested by a two-way analysis of variance (ANOVA). Statistical analyses were performed using MINITAB 12.21 software (PA State College, USA). The significance level was $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

From an environmental point of view, coastal zones can be considered as the geographic space of interaction between terrestrial and marine ecosystems that is of great importance for the survival of a large variety of plants, animals and marine species (Castro et al., 1999). Adverse anthropogenic effects on the coastal environment include eutrophication, heavy metals, organic and microbial pollution and oils spills (Boudouresque and Verlaque, 2002).

The concentrations of metals found in *D. trunculus* were presented in Figure 2. Generally, a similar seasonal profile was observed for the different metals in the two studied sites. The mean values recorded exhibited the following decreasing order: Zn, Cu, Pb and Cd for the two studied sites. An important concentration of Zn was also observed in the muscle of *Perna perna* (Moukrim et al., 2000). The concentrations measured in the soft tissues of *D. trunculus*

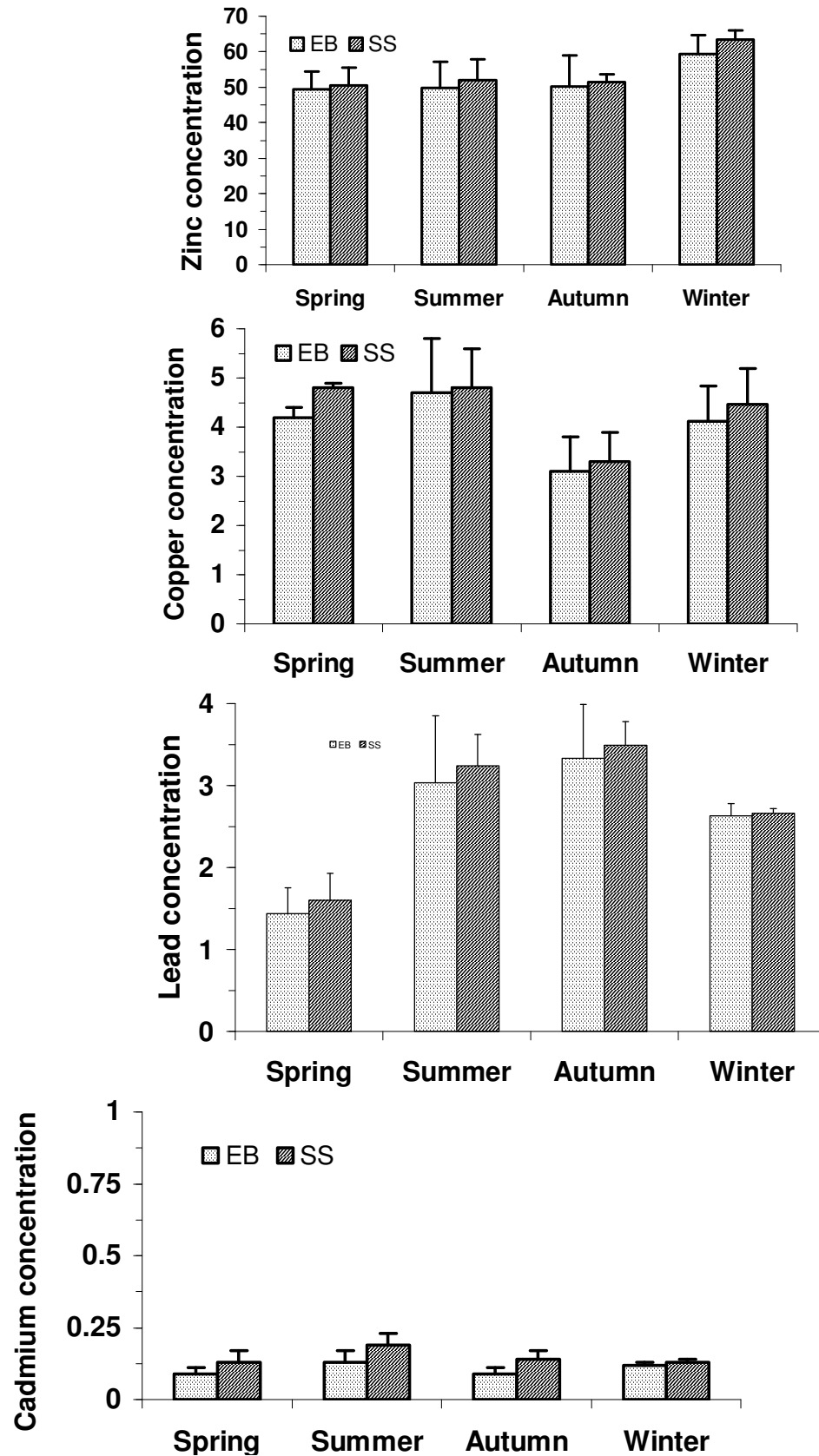


Figure 2. Seasonal variation of trace heavy metal concentrations ($\mu\text{g/g}$ dry weight) in *D. trunculus* sampled at two sites (EB: El Battah; SS: Sidi Salem) in the gulf of Annaba ($m \pm SD$)

Table 1. ANOVA *p* values and significance levels for analyses of tissue trace heavy metal concentrations in *D. trunculus*.

	Cd	Cu	Pb	Zn
Season	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***
Site	0.000***	0.954	0.320	0.228
Season x Site	0.341	0.419	0.978	0.942

*** *p* < 0.001**Table 2.** Comparative trace heavy metal levels (µg/g dry weight) in some species of *Donax*.

Species	Site	Season	Cd	Cu	Pb	Zn	Reference
<i>Donax deltooides</i>	Contaminated	Spring Autumn		7-11 7-16	85-125 145-155		Haynes et al., 1997
<i>Donax trunculus</i>	Control Contaminated	?	6-11 6-9	10-13 6-8	2-11		Fishelson et al., 1999
<i>Donax trunculus</i>	Control Contaminated	Autumn	0.19 0.20	60 383	1.1 3.6	63 107	Usero et al., 2005
<i>Donax rugosus</i>	Contaminated	Autumn Winter	0.63 1	13.3 6		53-70 64-80	Sidoumou et al., 2006

Table 3. Maximum acceptable limits (µg/g) of some trace heavy metals

Metal	µg/g	Reference
Cd	5	CEFAS, 1997
	10	NHMRC, 1987
Cu	100	BOE, 1991
	350	NHMRC, 1987
Pb	25	BOE, 1991
	50	Great Britain-Parliament, 1979
Zn	250	Ministry of Food, 1953
	750	NHMRC, 1987

revealed a significant ($p < 0.001$) effect of season for all metals measured. The temporal accumulation in *D. trunculus* varied according to the metals. Thus, the highest values were recorded in winter for Zn and in summer for the other metals.

It is generally agreed that heavy metal uptake occurs mainly from water, food and sediment. However, effectiveness of metal uptake from these sources may differ in relation to ecological needs and metabolism of animals and concentrations of the heavy metals in water, food and sediment as well as some other factors such as salinity, temperature, interacting agents (Roesijadi and Robinson, 1994). The seasonal variation in metal concentrations observed in the gulf of Annaba could be related to the marine currents and the reproductive cycle of this species in the gulf of Annaba. The high accumulation of metals coincides with the low currents

and the reproduction in the gulf of Annaba. The concentrations of trace metals were slightly higher in Sidi Salem in comparison with El Battah. However, there was no significant ($p > 0.228$) differences in Zn, Cu and Pb concentrations (Zn, $p = 0.228$; Cu, $p = 0.954$; Pb, $p = 0.320$) between the two sites, except for Cd ($p < 0.001$) (Table 1). The significant high concentrations of Cd in *D. trunculus* from site 1 (Sidi Salem) observed in summer, autumn and winter, indicate a local source of contamination. The site of Sidi Salem is located near several sources of pollution: harbour and many factories such those producing phosphoric fertilizers and pesticides. As shown in (Table 2), trace metal concentrations were also found to vary as function seasons and contamination levels of sites examined in several species of *Donax*: *D. deltooides* (Haynes et al., 1997), *D. trunculus* (Fishelson et al., 1999; Usero et al., 2005) and *D. rugosus* (Sidoumou et al., 2006). Concentrations of the trace metals Zn, Cu, Fe, Cd and Pb in four caridean decapods from northeast Algeria, varied according to locations and seasons (Abdenour et al., 2000), while in sediments they were low in clean sites, and slightly higher in the other locations in relation to anthropogenic sources (Abdenour et al., 2004). The high concentrations of Zn and Cu observed in *D. trunculus* were correlated with the metal contamination of sediments. Based on a previous report (Abdenour et al., 2004), the highest metal concentrations in sediments recorded for Annaba gulf are represented by Fe, followed by Zn and Cu. Similarly, a fair correlation between concentration of pollutants in animal tissue and in sediments was observed (Baumard et al., 1998).

Heavy metals pollutants are conservative and often highly toxic to biota (Clark, 1992; Richardson, 1995). They have been shown to be an important group of toxic contaminants because of their high toxicity and persistence in all aquatic system (Amin, 1996). As, Cd, Cu, Hg, and Zn are the five metals with most potential impact that enter the environment in elevated concentrations through storm water and wastewater discharges as a consequence of agricultural and industrial activity. Accumulation of such contaminable amount of heavy metals can cause toxic reactions along the food chain. The values of trace heavy metals detected in this edible species were low as compared to the maximum acceptable limits (Table 3).

CONCLUSION

The determination of metal concentrations in organisms is part of an assessment and monitoring program in the coastal zone of Annaba that will bring results useful for health and environmental risk assessment. *D. trunculus* is suitable as bioindicators for monitoring the quality of water from the Annaba gulf. Concentrations of metals showed seasonal variations. The two monitored sites were contaminated by metals. The difference observed between these two sites was related to their pollution level. However, the metal contamination in the gulf of Annaba is relatively low as compared with values reported in some mollusc species from other countries. Thus, the contamination risks of local population via this edible species were low.

REFERENCES

- Abbes A, Chouahda S, Soltani N (2003). Activité comparée de deux biomarqueurs du stress environnemental dans divers tissus chez deux espèces de bivalves pêchées dans la région d'Annaba. Bulletin INSTM 8:123-126.
- 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.
- Abdenmour C, Khelili K, Boulakoud MS, Rainbow PS, (2004). Trace metals in marine, brackish and freshwater prawns (*Crustacea, Decapoda*) from northeast Algeria. Hydrobiologia 432: 217-227.
- Amin O (1996). Heavy metal concentrations in littoral sediments from the Beagle Channel, Tierra Del Fuego, Argentina. Environ. Monit. Assess. 4(1): 219-231.
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean Sea. Environ. Toxicol. Chem. 17: 765-776.
- BOE (Boletín Oficial del Estado or Official Gazette of the State), (1991). "Normas microbiológicas, límites de contenido en metales pesados y métodos analíticos para la determinación de metales pesados para los productos de la pesca y de la agricultura (Microbiological standards, limits of heavy metal concentration and analytical methods for the determination of heavy metals in fish and agricultural produce)" August 2 Order. Madrid, Spain: Ed. BOE: 5937-5941.
- Boening DW, (1999). An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. Environ. Monit. Assess. 55: 459-470.
- Boudouresque CF, Verlaque M (2002). Biological pollution in the Mediterranean Sea: invasive versus introduced macrophytes. Mar. Pollut. Bull. 44 : 32-38.
- Bouzeraa N, Abbes A, Soltani N (2004). Analyse des protéines chez trois espèces de bivalves vivant dans des milieux différents, la lagune El Mellah et le golfe d'Annaba. Bulletin INSTM 9: 97-100.
- Castro H, Aguilera PA, Martinez JL, Carrique EL (1999). Differentiation of clams from fishing areas an approximation to coastal quality assessment. Environ. Monit. Assess. 54 : 229-237.
- CEFAS (Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science) (1997). "Monitoring and surveillance of non-radioactive contaminants in the aquatic environment and activities regulating the disposal of waste at sea (1994). Aquatic Environment Monitoring Report 47", Lowestoft, UK: Centre for Environment, Fisheries, and Agriculture Science.
- Chiu ST, Lam FS, Tze WL., Chau CW, Ye DY (2000). Trace metals in mussel from mariculture zones, Hong Kong. Chemosphere 41 : 101-108.
- Clark RB (1992). Marine Pollution, Clarendon Press, Oxford. pp 172
- El-Sikaly A, Khaled A, El Nemr A, (2004). Heavy metals monitoring using bivalves from Mediterranean Sea and red sea. Environ. Monit. Assess. 98 : 41-58.
- Fishelson L, Bresler V, Manelisa R, Zuk-Rimon Z., Dotan A, Hornung H, Yawetz A, (1999). Toxicological aspects associated with the ecology of *Donax trunculus* (Bivalvia, Mollusca) in a polluted environment. Sci. Total Environ. 226: 121-131.
- Great Britain-Parliament (1979). "Food and Drugs Composition. The Lead in Food Regulation 1979", Statutory Instrument N° 1254: 1-7. London: Her Majesty's Stationery Office .
- Grosell M, Brix KV (2005). Introduction to the special issue on mechanisms in metal toxicology. Aquat. Toxicol. 72: 3-4.
- Haynes D, Leeder J, Rayment P (1997). A comparison of the bivalve species *Donax deltoides* and *Mytilus edulis* as monitors of metal exposure from effluent discharges along the ninety mile beach, Victoria, Australia. Mar. Pollut. Bull. 34: 326-331.
- Islam MD, Tanaka M (2004). Impact of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. Mar. Pollut. Bull. 48: 624-649.
- McLachlan A, Dugan JE, Defeo O, Ansell AD, Hubbard DM, Jaramillo E, Penchaszadeh PE (1996). Beach clam fisheries. Oceanog. Mar. Biol. Ann. Rev. 34: 163-232.
- Migon C, Morelli J, Nicolas E, Copin-Motegut G (1991). Evaluation of total atmospheric deposition of Pb, Cd, Cu and Zn to the Ligurian Sea. Sci. Total Environ. 105: 135-148.
- Ministry of Food, Food Standards Committee, 1953. "Report on Zinc", London: Her Majesty's Stationery Office
- 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.
- NHMRC (National Health and Medical Research Council) (1987). "National Food Standard A 12: Metals and Contaminants in Food", Canberra, Australia Australian Government Publishing Service.
- Neuberger-Cywiak L, Achituv Y, Garcia EM (2003). Effects of Zinc and Cadmium on the Burrowing Behavior LC₅₀ and LT₅₀ on *Donax trunculus* Linnaeus (Bivalvia - Donacidae). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 70: 713-722.
- Richardson BJ (1995). The Problem of Chlorinated Compounds in Australia's Marine Environment. In: LP Zann and DC. Sullon (eds). The State of the Marine Environment report for Australia, Technical Annex 2 Pollutants, Great Barrier Reef Marine Park Authority, Townsville pp 53-61.
- Roesijadi G, Robinson WE (1994). Metal regulation in aquatic animals: mechanism of uptake, accumulation and release. In: Malins, DC, Ostrander GK (Eds), Aquatic Toxicology (Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives). Lewis Publishers, London p539 .
- Romeo M, Gnassia-Barelli M (1988). *Donax trunculus* and *Venus verrucosa* as bioindicators of trace metal concentrations in Mauritanian coastal waters. Mar. Biol. 99: 223-227.
- Semadi A, Deruelle S (1993). Lead pollution monitoring by transplanted lichens in Annaba area (Algeria). Rev. Poll. Atmos. Oct-Dec. 86-102.

Sidoumou Z, Gnassia-Barelli M, Siau Y, Morton V, Romeo M (2006). Heavy metal concentrations in molluscs from the Senegal coast. *Environ. Int.* 32: 384-387.

D, Garcia-Meunier P, Rafenec G, Wolwicz M, Blanchard G (2002). The relationship between metal concentrations and phenotypes in the Baltic clam *Macoma baltica* from the gulf of Gdansk, southern Baltic. *Chemosphere* 47: 475-484.

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

Vaissière R, Fredj G (1963). Contribution à l'étude de la faune benthique du plateau continental de l'Algérie. *Bull. Inst. Océanogr. Monaco* 60 p83