

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA



FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOSURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE

Thèse En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat
Domaine : SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
Filière : Biologie et Physiologie Animale
Spécialité : Biologie et Physiologie Animale
-Santé Environnementale-

Intitulé

Evaluation des risques toxiques des rejets industriels et urbains sur la santé via un indicateur biologique la moule Africaine *Perna perna* : utilisation de la méthode caging

Présentée par : M^{lle} Imèn LAOUATI

Directeur de thèse : Kheireddine OUALI (Pr, Université Badji Mokhtar - Annaba)

Co-directeur de thèse : Farid DERBAL (Pr, Université Badji Mokhtar - Annaba)

Devant un jury composé de :

Pr. Mohamed Achou	Président	Université Badji Mokhtar - Annaba
Pr. Wyllia Khati	Examinatrice	Université Chadli Bendjedid - El Taref
Pr. Lamya Chaoui	Examinatrice	Université Badji Mokhtar - Annaba
Dr. Hana Bouzahouane	Examinatrice	Université Cherif Messaidia - Souk Ahras

Année universitaire : 2020/2021

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,

A mon très cher papa,

De tous les pères, tu es le meilleur.

Tu es et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et perfectionnismes.

En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières.

Pourriez vous trouvez dans ce travail le fruit de toutes vos peines et de vos efforts.

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, ma gratitude, ma reconnaissance et mon profond amour éternel.

Merci mille fois de m'avoir soutenue durant ce long parcours. J'espère que je serais à la hauteur des valeurs que tu as semées en moi. Je t'aime énormément.

Puisse Dieu te préserver et vous procurer santé, longue vie et bonheur.

A ma très chère mère ;

Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie.

Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance.

Puisse Dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

"Que le bon dieu me donne la puissance de vous rendre au moins une partie de ce que vous m'aviez donnée chers parents "

A ma regrettée ma grand-mère " mama Zoulikha "

Comment t'oublier ? ta bonté reste encore gravée dans ma mémoire, Si j'ai réussi, c'est bien grâce à tes prières, j'imagine quelle serait ta joie aujourd'hui, j'aurai voulu que tu assiste à l'aboutissement de ces années de dur labeur, Dieu en a décidé autrement. Que Dieu t'accorde la paix éternelle et t'accueille dans son paradis.

A ma chère sœur Ibtissem et son mari Rachid

Aucune dédicace ne peut exprimer la profondeur des sentiments fraternels et d'amour, d'attachement que j'éprouve à votre égard.

Je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection en souvenirs de notre indéfectible union qui s'est tissée au fil des jours.

Puisse dieu vous protéger, garder et renforcer notre fraternité.

A mes chers frères Amine et Aymen

Je ne peux exprimer à travers ces lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous deux mes chers frères.

Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.

Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler.

A ma petite princesse ma chère nièce adorée Nour Iline

Une nièce comme on ne peut trouver nulle part ailleurs, Puisse Allah te Protéger et garder.

Je te souhaite tout le bonheur du monde

*A ma belle sœur Loubna,
Que dieu vous procure santé et bonheur.*

*A mes oncles, mes tentes, mes cousins et cousines,
Il me serait difficile de vous citer tous, vous êtes dans mon cœur, affectueusement.*

*A mes tès chers amis et collègues
A tous ceux qui me sont chers et que j'ai involontairement omis de
citer.*

*J'associe aussi à mes remerciements l'expression de ma reconnaissance à toutes les
personnes qui ont participé bénévolement de près ou de loin à la réalisation de cette thèse;
Merci à tous ceux que je n'ai pas cités ici mais à qui je pense quand même !!!*

Remerciements

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à **ALLAH**, le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail. Qui m'a inspirée et guidée dans le bon chemin, je lui dois ce que je suis devenue. Louanges et remerciements pour sa clémence et sa miséricorde.

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Mes chaleureux remerciements et reconnaissance vont tout d'abord à mon Directeur de Thèse, Monsieur **Kheireddine OUALI**, Professeur à l'Université Badji-Mokhtar- Annaba et Directeur du laboratoire de Biosurveillance Environnementale, qui a accompagné ma carrière scientifique depuis mes années d'étude et j'ai beaucoup appris de lui. Je le remercie pour ses encouragements, ses conseils, son soutien, sa patience et sa disponibilité tout au long de mon travail de recherche et pour la confiance et la liberté qu'il m'avait accordé dans mes recherches, et qui m'a permis d'acquérir l'autonomie nécessaire pour arriver à ce stade.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements et reconnaissance à mon co-Directeur de thèse, Monsieur **Farid DERBAL**, Chef de Département des Sciences de la Mer et Professeur à l'université de Badji-Mokhtar- Annaba, pour son aide précieuse sur terrain, sa disponibilité, ses conseils et son soutien.

Je tiens à remercier très sincèrement les membres de mon jury de thèse, pour l'honneur qu'ils m'ont accordé :

Monsieur **Mohamed ACHOU**, Professeur à l'université de Badji Mokhtar-Annaba, pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury.

Je suis très honorée que Madame **Lamya CHAOUI**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar-Annaba et Mlle **Hana BOUZAHOANE**, Maître de conférences à l'Université Mohamed Cherif Messaidia- Souk Ahras, qu'elles trouvent ici mes remerciements les plus cordiaux.

Je remercie infiniment Madame **Willia KHATI**, Professeur à l'université de Chadli Bendjedid- El Taref, pour son aide sur terrain, ses encouragements sa gentillesse et pour l'honneur qu'elle me fait de sa participation à ce jury.

J'exprime également mes plus sincères remerciements à Monsieur **Hacene Omar ROUANE**, Professeur à l'université de Oran 1 Ahmed Ben Bella, pour son aide précieuse à l'amélioration de la qualité scientifique de ce travail, en réalisant les analyses statistiques, pour sa disponibilité toujours pour me donner des conseils et de m'aider et guidé dans mon travaille, qu'il trouve ici, le témoignage de ma profonde reconnaissance et ma sincère gratitude.

Un merci tout particulier à Monsieur **Idris YAHIAOUI**, Maître de conférences à l'université de Bejaïa pour son aide précieuse dans les analyses des métaux traces, je suis vraiment très reconnaissante, mille mercis monsieur.

Je remercie tous mes enseignants le long de mon parcours universitaire et en particulier monsieur **Fouzi BOULKENEFET** Maître de conférences à l'université 20 Août 1955-Skikda qu'il m'a encadré en licence et j'ai beaucoup appris de lui et qui n'arrêtait pas de suivre mes actualités et était toujours présent pour me guider quand j'en avais besoin. Aussi tous mes enseignants en master à l'université de Badji Mokhtar- Annaba, particulièrement Madame **Fouzia TREA-OUALI** qu'elle m'a encadré en master et qu'elle m'a toujours conseillé, encouragé et cru en moi et mes capacités elle a tous mon respect et que ce travail témoigne ses espérances et ses croyances en moi.

Un chaleureux remerciement à mon amie et collègue **Nabila BENSAFIA**, Maître de conférences à l'université de Chadli Bendjedid- El Taref, pour son aide, sa gentillesse sa générosité ses encouragements continus et son soutien.

Un grand merci à mon collègue, **Aimen Adib MENAIL**, Doctorant à l'université de Badji Mokhtar- Annaba pour son soutien et ses encouragements et sa présence les jours de déprime. Aussi, je te remercie vivement pour ton aide lors de la réalisation de ce travail.

Comment pourrais-je trouver les mots pour remercier mon collègue **Islem ZERARGUIA**, Doctorant à l'université Chadli Bendjedid- El Taref, aucun mot ne peut décrire au quel point je suis reconnaissante pour tout que tu m'as fait, tu étais présent et tu m'as partagé les pires moments avant les bons, et je ne suis pas certaine que sans ton aide, ton soutien, ton écoute et ta disponibilité j'aurais pu digérer correctement les différentes épreuves qui m'ont été imposées pendant la durée de ma thèse. Merci infiniment Islem.

Table des matières

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
Chapitre I : Généralités	5
1. Pollution marine.....	5
1.1 Types de pollutions.....	6
1.1.1 Pollution biologique	6
1.1.2 Pollution physique.....	7
1.1.3 Pollution chimique	7
1.2 Types de polluants	7
2 Éléments traces métalliques (ETMs)	9
2.1 Éléments Traces Métalliques (ETMs) en milieu marin.....	10
2.2 Présentation des Eléments Traces Métalliques étudiés	11
2.2.1 Cuivre (Cu).....	11
2.2.2 Zinc (Zn)	12
2.2.3 Plomb (Pb).....	12
2.2.4 Cadmium (Cd).....	13
2.3 Transferts des contaminants dans l'environnement marin	14
2.3.1 Bioconcentration	14
2.3.2 Bioaccumulation.....	14
2.3.3 Bioamplification.....	15
2.4 Effets écotoxicologiques des contaminants chimiques.....	16
2.5 Effets des métaux lourds sur la santé humaine	17
3 Biosurveillance environnementale	19
3.1 Développement d'approches de biosurveillance en milieu aquatique	20
3.1.1 Biosurveillance passive	20
3.1.2 Biosurveillance active en milieu marin	21
3.2 Indicateurs biologiques de pollution.....	23

3.3	Intérêt d'utilisation des moules en biosurveillance	24
3.4	Biomarqueurs : définitions, avantages et limites.....	26
3.4.1	Classes de biomarqueurs et leur application aux écosystèmes aquatiques	28
3.4.1.1	Biomarqueurs d'exposition	28
3.4.1.2	Biomarqueurs d'effets	29
3.4.1.3	Biomarqueurs transcriptomiques qui intègrent l'exposition et les effets	32
3.5	Approche multi-biomarqueurs.....	34
3.6	Choix des biomarqueurs	34
3.6.1	Glutathion réduit (GSH).....	34
3.6.2	Glutathion S-transférase (GST).....	35
3.6.3	Catalase (CAT).....	36
3.6.4	Acétylcholinestérase (AChE).....	36
3.6.5	Malonedialdéhyde (MDA)	37
4	Présentation du modèle biologique : <i>Perna perna</i>	38
4.1	Position systématique	38
4.2	Synonymie	38
4.3	Critères de diagnose.....	38
4.4	Répartition géographique	40
4.5	Cycle de reproduction.....	40
4.6	Régime alimentaire.....	41
4.7	Rôle écotoxicologique	41
5	Présentation du golfe d'Annaba.....	41
Chapitre II : Eléments Traces Métalliques		43
1	INTRODUCTION	43
2	MATERIEL ET METHODES.....	45
2.1	Choix et localisation des stations de transplantation	45
2.2	Matériel biologique.....	49
2.3	Stratégie d'échantillonnage	49
2.3.1	Choix du matériel biologique	49
2.3.2	Collecte des échantillons références	50
2.3.3	Mise en stabulation des moules.....	50
2.3.4	Préparation des cages	51
2.3.5	Opération de transplantation	52

2.4	Mesure des paramètres physico-chimiques	53
2.5	Prélèvement de sédiment	54
2.6	Récupération des cages.....	54
2.7	Traitement des échantillons	55
2.7.1	Préparation des tissus des moules pour les dosages des ETMs.....	56
2.7.2	Analyse granulométrique des sédiments	55
2.7.3	Préparation des sédiments pour les dosages des ETMs	55
2.7.4	Dosage des métaux lourds par la SAA.....	56
2.8	Détermination des indices métalliques	56
2.8.1	Calcul des indices métalliques	57
2.9	Evaluation de l'Indice de Contamination (IC)	57
2.10	Analyse statistique	58
3	RESULTATS	59
3.1	Paramètres physico-chimiques	59
3.2	Eléments traces métalliques.....	59
3.2.1	Dosage des ETMs dans la moule	59
3.2.1.1	Cuivre (Cu).....	59
3.2.1.2	Zinc (Zn).....	60
3.2.1.3	Plomb (Pb).....	61
3.2.1.4	Cadmium (Cd)	61
3.2.2	Dosage des éléments traces métallique dans le sédiment superficiel.....	62
3.2.2.1	Cuivre (Cu)	62
3.2.2.2	Zinc (Zn).....	63
3.2.2.3	Plomb (Pb).....	64
3.2.2.4	Cadmium (Cd).....	64
3.3	Analyse granulométrique.....	65
3.4	Détermination du niveau de contamination du sédiment par les ETMs.....	65
3.5	Indice métallique	66
3.5.1	Indice du cuivre	66
3.5.2	Indice du zinc	67
3.5.3	Indice du plomb.....	67
3.5.4	Indice du cadmium	68
4	DISCUSSION	69

Chapitre III : Biomarqueurs	76
1 INTRODUCTION	76
2 MATERIEL ET METHODES	79
2.1 Choix et localisation des stations de contrôle.....	79
2.2 Matériel biologique.....	79
2.3 Récupération et traitement des échantillons	79
2.4 Préparation des tissus de moules pour le dosage des biomarqueurs.....	79
2.4.1 Dosage des protéines	79
2.4.2 Dosage du glutathion réduit (GSH).....	80
2.4.3 Dosage de la glutathion S-transférase (GST).....	81
2.4.4 Dosage de la catalase (CAT)	82
2.4.5 Dosage de malondialdéhyde (MDA).....	83
2.4.6 Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE).....	84
2.5 Analyse statistique	84
3 RESULTATS	86
3.1 Glutathion réduit (GSH)	86
3.2 Glutathion S-transférase (GST)	86
3.3 Catalase (CAT)	87
3.4 Malondialdéhyde (MDA)	88
3.5 Acétylcholinestérase (AChE)	89
3.6 Analyse en composantes principales	90
4 DISCUSSION	92
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	95
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	97
ANNEXES.....	124

RESUME

Dans le cadre du programme de biosurveillance du golfe d'Annaba (Nord-est d'Algérie), cette présente étude avait pour objectif principal d'apprécier l'état de santé des petits fonds côtiers du littoral d'Annaba soumis à différentes sources de pollution (plage Joinoville, Port d'Annaba et plage La Caroube) au moyen de la transplantation des moules brunes *Perna perna* (Linnaeus, 1758) pendant une période de 12 semaines (Juin 2017 - Août 2017). Le matériel biologique (*P. perna*), a été prélevé de la plage Lahnaya, une station supposée être éloignée de toute source de pollution directe.

L'évaluation de la qualité des eaux côtières du golfe a été basée, d'une part, sur l'estimation des teneurs de quatre éléments traces métalliques (cuivre, zinc, plomb et cadmium), et d'autre part, sur le dosage d'une batterie de biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques (glutathion, glutathion S-transférase, catalase, malondialdéhyde et acétylcholinestérase) dans les tissus des moules avant (t_0) et après (t_1) la période de transplantation.

Parallèlement, une caractérisation des conditions environnementales des stations d'étude a été effectuée par un suivi mensuel des paramètres physico-chimiques des eaux de surface, une étude granulométrique et des analyses chimiques des métaux traces dans la couche superficielle du sédiment, afin de rechercher d'éventuelles relations entre les trois matrices étudiées (eau-sédiment-biote).

In toto, le suivi des variations des éléments traces métalliques par rapport aux concentrations initiales a montré une augmentation significative ($p < 0.05$) des concentrations du Cu et du Pb dans les tissus des moules après la période de transplantation. Par contre, aucune différence significative n'a été enregistrée pour le Cd et le Zn.

D'autre part, l'ordre des stations de contrôle selon les concentrations moyennes des métaux traces dans les organismes après la transplantation était similaire à celui apporté selon leur biodisponibilité dans les sédiments indiquant ainsi une relation entre la bioaccumulation des métaux et leur biodisponibilité spatiale.

Bien que les caractéristiques de l'eau n'ont montré aucune différence entre les quatre stations, les réponses biologiques des moules ont révélé des différences de sensibilité du système antioxydant et neurotoxique des moules transplantées. Ces réponses sont traduites principalement par la diminution des concentrations de la GSH, l'augmentation de MDA et l'inhibition de l'AChE dans les moules transplantées dans les stations 1 et 2. Aucune différence significative n'a été observée pour le GST et la CAT après transplantation.

Enfin, les résultats des réponses biologiques des moules étaient complémentaires à ceux des variations des concentrations des métaux traces et des indices d'accumulation dans les moules transplantés, ce qui nous a permis d'identifier les sources ponctuelles de pollution les plus importantes dans la région.

Mots clés : biosurveillance, *Perna perna*, golfe d'Annaba, transplantation, éléments traces métalliques, biomarqueurs.

ABSTRACT

As part of the Biomonitoring program for the Gulf of Annaba (North-East of Algeria), the main objective of this study was to assess the state of health of the shallow coastal areas of the Annaba coastline subject to various sources of pollution (Joinoville, Port d'Annaba and La Caroube beaches) by transplanting the brown mussels *Perna perna* (Linnaeus, 1758) for a period of 12 weeks (June 2017 - August 2017). The biological material (*P. perna*) was collected from Lahnaya beach, a site supposed to be far from any source of direct pollution.

The evaluation of the quality of the coastal waters of the Gulf was based, on the one hand, on the estimation of the contents of four metallic trace elements (copper, zinc, lead and cadmium), and on the other hand, on the assay a battery of enzymatic and non-enzymatic biomarkers (glutathione, glutathione S-transferase, catalase, malondialdehyde and acetylcholinesterase) in the tissues of mussels before (t_0) and after (t_1) the transplantation period.

At the same time, a characterization of the environmental conditions of the study sites was carried out by monthly monitoring of the physicochemical parameters of the surface water, a particle size study and chemical analyzes of trace metals in the surface layer of the sediment, in order to search for possible relationships between the three matrices studied (water-sediment-biota).

In toto, the follow-up of the variations of the metallic trace elements compared to the initial concentrations showed a significant increase ($p < 0.05$) of the Cu and Pb concentrations in the tissues of the mussels after the transplantation period. On the other hand, no significant difference was recorded for Cd and Zn.

On the other hand, the order of the control sites according to the average concentrations of trace metals in the organisms after transplantation was similar to that provided according to their bioavailability in the sediments, thus indicating a relationship between the bioaccumulation of metals and their spatial bioavailability.

Although the water characteristics showed no difference between the four sites, the biological responses of the mussels revealed differences in the sensitivity of the antioxidant and neurotoxic system of the transplanted mussels. These responses are mainly reflected by decreased GSH concentrations, increased MDA and inhibition of AChE in mussels transplanted into sites 1 and 2. No significant difference was observed for GST and CAT after transplantation.

Finally, the results of the biological responses of the mussels were complementary to those of the variations in the concentrations of trace metals and the indices of accumulation in the transplanted mussels, which allowed us to identify the most important point sources of pollution in the region.

Key words: biomonitoring, *Perna perna*, Gulf of Annaba, transplantation, metallic trace elements, biomarkers.

ملخص

كجزء من برنامج الرصد الحيوي لخليج عنابة (شمال شرق الجزائر) ، كان الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم الحالة الصحية للمناطق الساحلية لخليج عنابة المعرض لمختلف مصادر التلوث (شاطئ جوانوفيل، ميناء عنابة، شاطئ خروبة) عن طريق زرع بلح البحر البني *Perna perna* (لينوس 1758) لمدة 12 أسبوعاً (ماي 2017 - أوت. 2017) تم جمع بلح البحر المخصص لهاته الدراسة من شاطئ الحنايا ، و هو موقع يعتقد انه معزول عن أي مصدر مباشر للتلوث.

استند تقييم جودة المياه الساحلية للخليج ، من جهة ، على تقدير محتويات أربعة عناصر معدنية نادرة (النحاس والزنك والرصاص والكاديوم) ، ومن جهة أخرى على الفحص. مجموعة من المؤشرات الحيوية الأنزيمية وغير الأنزيمية (الجلوتاثيون ، الجلوتاثيون-S-ترانسفيراز ، الكاتالاز ، مالونديالدهيد وأسيثيل كولينسترانز) في أنسجة بلح البحر قبل (t_0) وبعد (t_1) فترة الزرع.

في الوقت نفسه ، تم إجراء توصيف للظروف البيئية لمواقع الدراسة من خلال المراقبة الشهرية للمعلمات الفيزيوكيميائية للمياه السطحية ، ودراسة حجم الجسيمات والتحليلات الكيميائية للمعادن النزرة في الطبقة السطحية للرواسب ، بالترتيب للبحث عن العلاقات الممكنة بين المصفوفات الثلاث المدروسة (الماء - الرواسب - الكائنات الحية).

إجمالاً ، أظهرت متابعة تغيرات العناصر النزرة المعدنية مقارنة بالتركيزات الأولية زيادة بارزة ($p < 0.05$) في تركيزات النحاس والرصاص في أنسجة بلح البحر بعد فترة الزرع. من ناحية أخرى . بينما لم يتم تسجيل أي فرق بارز للكاديوم و الزنك.

من ناحية أخرى ، كان ترتيب مواقع الضبط وفقاً لمتوسط تركيزات المعادن النزرة في الكائنات الحية بعد الزرع متوافقاً مع ترتيب هاته العناصر وفقاً لتوافرها الحيوي في الرواسب ، مما يشير إلى وجود علاقة بين التراكم الحيوي للمعادن وتوافرها الحيوي المكاني .

على الرغم من عدم وجود اختلاف في خصائص الماء بين المحطات الأربع ، إلا أن الاستجابات البيولوجية لبلح البحر كشفت عن تباين في حساسيات أنظمة مضادات الأكسدة والسوموم العصبية لبلح البحر المزروع. تنعكس هذه الاستجابات بشكل رئيسي من خلال انخفاض تركيزات GSH وزيادة MDA وتنشيط AChE في بلح البحر المزروع في المحطتين 1 و 2. بينما لم تلاحظ أي فروق ذات دلالة إحصائية بارزة لكل من CAT و GST بعد الزرع.

أخيراً ، كانت نتائج الاستجابات البيولوجية لبلح البحر مكتملة لتلك الخاصة بالاختلافات في تركيزات المعادن النزرة ومؤشرات التراكم في بلح البحر المزروع ، مما سمح لنا بتحديد أهم مصادر التلوث في المنطقة.

الكلمات المفتاحية: الرصد الحيوي ، *Perna perna* ، خليج عنابة ، الزرع ، العناصر النزرة المعدنية ، المؤشرات الحيوية.

Liste des figures

Figure 1. Principales sources de la pollution marine.....	5
Figure 2. Illustration du processus de la bioamplification.....	16
Figure 3. Effets des contaminants chimiques sur les différents niveaux d'organisation biologique.....	16
Figure 4. Différentes voies de contamination humaines par les ETMs.....	18
Figure 5. Fonction antioxydante du GSH	35
Figure 6. Morphologie externe de la moule <i>Perna perna</i>	39
Figure 7. Aspect interne de la moule <i>Perna perna</i>	39
Figure 8. Carte géo-référenciée de la localisation des stations de contrôle dans le golfe d'Annaba.....	45
Figure 9. Lieu de prélèvement de la moule <i>Perna perna</i> dans la station Lahnaya. A- coté Est de la plage, B- coté Ouest de la plage.....	46
Figure 10. Lieu de transplantation des moules <i>Perna perna</i> au niveau de la station 1 Joinoville.....	46
Figure 11. Lieu de transplantation des moules <i>Perna perna</i> au niveau de la station 2 port d'Annaba.....	47
Figure 12. Lieu de transplantation des moules <i>Perna perna</i> au niveau de la station 3 La Caroube.....	48
Figure 13. Lieu de transplantation des moules <i>Perna perna</i> au niveau de la station 4 Cap de Garde.....	48
Figure 14. Photo de <i>Perna perna</i>	49
Figure 15. Condition d'acclimatation de <i>Perna perna</i> au laboratoire avant la transplantation.....	51
Figure 16. Photos des cages de transplantation.....	51
Figure 17. Installation de la cage au niveau de la station 2 Joinoville. A- mise en cage des moules, B- récupération de la cage du quai de l'oued Meboudja.....	52
Figure 18. Installation de la cage à l'intérieur de la grande darse du port d'Annaba.....	52
Figure 19. Installation de la cage au niveau de la station 3 La Caroube. A- mise en cage des moules, B- installation de la cage.....	53
Figure 20. Mesure des paramètres physico-chimiques des eaux de surface.....	53
Figure 21. Isolation des moules vivantes à partir des cages dans chaque station A- Port, B- La Caroube, C- Joinoville.....	54

Figure 22. Echantillons de sédiment avant séchage A- sédiment de la plage Lahnaya B- sédiment du port d'Annaba.....	55
Figure 23. Variations spatiales des concentrations en Cu dans les tissus de <i>Perna perna</i>	60
Figure 24. Variations spatiales des concentrations en Zn dans les tissus de <i>Perna perna</i>	60
Figure 25. Variations spatiales des concentrations en Pb dans les tissus de <i>Perna perna</i>	61
Figure 26. Variations spatiales des concentrations en Cd dans les tissus de <i>Perna perna</i>	62
Figure 27. Variations spatiales des teneurs en Cu dans les sédiments des stations d'étude....	63
Figure 28. Variations spatiales des teneurs en Zn dans les sédiments des stations d'étude....	63
Figure 29. Variations spatiales des teneurs en Pb dans les sédiments des stations d'étude....	64
Figure 30. Variations spatiales des teneurs en Cd dans les sédiments des stations d'étude...64	
Figure 31. Etude comparative des variations de l'indices Cu moyen ($\mu\text{g.g}^{-1}$ p.s) mesuré chez <i>Perna perna</i> provenant des différentes stations d'étude.....	66
Figure 32. Etude comparative des variations de l'indice Zn moyen ($\mu\text{g.g}^{-1}$ p.s) mesuré chez <i>Perna perna</i> provenant des différentes stations d'étude	67
Figure 33 Etude comparative des variations de l'indice Pb moyen ($\mu\text{g.g}^{-1}$ p.s) mesuré chez <i>Perna perna</i> provenant des différentes stations d'étude.....	68
Figure 34. Etude comparative des variations de l'indice Cd moyen ($\mu\text{g.g}^{-1}$ p.s) mesuré chez les moules <i>Perna perna</i> provenant des différentes stations d'étude.....	86
Figure 35. Variations inter-stations et inter-organes de l'activité de GSH.....	86
Figure 36. Variations inter-stations et inter-organes de l'activité de GST.....	87
Figure 37. Variations inter-stations et inter-organes de l'activité de CAT.....	88
Figure 38. Variations inter-stations et inter-organes de l'activité de MDA.....	89
Figure 39. Variations inter-stations et inter-organes de l'activité de AChE.....	90
Figure 40. Analyse en composantes principales A- corrélation entre les différents paramètres étudiés B- corrélation entre les différents stations d'étude.....	91

Liste des tableaux

Tableau 1. Classes des micropolluants potentiellement retrouvés dans le milieu marin.....	9
Tableau 2. Avantages et limites de la biosurveillance passive et active	22
Tableau 3. Exemples de biomarqueurs utilisés pour évaluer les contaminants aquatiques.....	33
Tableau 4. Variation des paramètres physio-chimiques de l'eau de mer dans les quatre stations étudiées.....	59
Tableau 5. Représentation (en %) de la fraction sédimentaire fine ($\leq 63 \mu\text{m}$) dans les stations d'étude.....	65
Tableau 6. Indice de contamination (IC) de chaque métal lourd dans le sédiment des stations d'étude.....	65
Tableau 7. Concentrations limites de métaux lourds dans les sédiments de différents écosystèmes côtiers dans la Méditerranée ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s) sont données en moyennes et/ou en gammes (min–max).....	72

Liste des abréviations

ABM : Active Biomonitoring.

AChE : Acétylcholinestérase.

AIEA : Agence Internationale de l'Energie Atomique.

ANOVA: Analysis Of Variance.

BBC : Bleu Brillant de Commassie.

[C] : Concentration.

CAF : Composés Aromatiques Fluorescents.

CAT : Catalase.

Cd : Cadmium.

CDNB: 1-Chloro2, 4-di nitrobenzene.

DDT : Dichlorodiphényl-trichloroéthane.

DO : Densité Optique.

DTNB : Acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque.

Cu : Cuivre.

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique.

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.

ETM : Élément Trace Métallique.

GSH : Glutathion réduit.

GSSG : Glutathion oxydé.

GST : Glutathion-S-transférase.

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

HCH : Hexachlorocyclohexanes

IFREMER: Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer.

MDA : Malondialdéhyde.

Mg : Milligramme.

MT : Métallothionéine.

Nmol : Nanomole.

OD : Oxygène Dissout.

OMS : Organisation Mondiale de Santé.

P : Seuil de signification.

Pb : Plomb.

PCB : Polychlorobiphényles.

PEC : Concentrations prévisibles dans l'environnement.

pH: Potentiel Hydrogène.

PNUE : Programme des Nations Unis pour l'Environnement.

PS : Poids Sec.

RINBIO : Réseau Intégrateurs Biologiques.

RNB : Réseau National de Bassin.

RNO : Réseau National de l'Observation du milieu marin.

ROCCH : Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du littoral.

ROS: Reactive Oxygen Species.

SSA: Acide sulfosalicylique.

T ° : Température.

TBA : Acide thiobarbiturique.

TBT : Tributylétain

TCA : Acide trichloracétique.

µg : Microgramme.

USEPA : United States Environmental Protection Agency's.

Vtg : Vitellogénine

Zn : Zinc.

° : Degré.

° C : Celsius (degrés).

% : Pour Cent.

‰ : Pour mille.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis des années, une dégradation de plus en plus importante de la qualité de nos écosystèmes est constatée. Cette dégradation est due à la pollution qui est l'un des graves problèmes aux quels est confronté notre monde moderne. On entend par pollution, la présence dans l'environnement de grandes quantités de produits chimiques dangereux, généralement créés par l'homme, dont les effets nuisibles peuvent se faire durant de longues périodes sur toute la planète. Cette pollution peut affecter l'eau, l'air et la terre.

Croyant aux propriétés purificatrices sans limite de l'environnement aquatique, l'homme l'a utilisé sans crainte comme poubelle ou déchetterie du monde, déversant dans les eaux littorales tous les rejets, toxiques ou non, radioactifs ou pétroliers, aussi bien dans les estuaires qu'à proximité des côtes. Mais la vérité, c'est que l'océan lui même n'est plus considéré officiellement comme un réservoir infini (**Lacaze et Ramade, 1993**).

La Méditerranée est une mer semi fermée qui couvre 0,8 % de l'hydrosphère, et pourtant elle constitue un pôle économique mondial. En effet, une soixantaine de plates-formes côtières d'exploitation pétrolières sont installées en méditerranée, 30 % des navires marchands du monde y circulent, s'ajoutant à ceci toutes les perturbations d'origine terrigène tels que la forte croissance de l'urbanisme littoral, les rejets domestiques et industriels contenant tous les types de polluants (PCBs, POP, HAPs, métaux lourds, détergents...) (**Kamel, 2014**).

La pollution métallique est l'une des formes de pollution les plus importantes et dangereuses au monde, car les éléments traces métalliques (ETMs) ne subissent pas de dégradation biologique ou chimique. De ce fait, ils peuvent s'accumuler à différents niveaux du réseau trophique à des concentrations toxiques. Vu la solubilité des ETMs, l'analyse chimique de l'eau de mer ne peut être considérée comme un moyen fiable pour déterminer le degré de pollution du milieu marin. Tandis que, l'étude de la bioaccumulation des ETMs dans les organismes vivants constitue un moyen très important pour l'évaluation de ce type de pollution (**Belhaouari et al., 2011**).

Certains métaux sont souvent indispensables au déroulement des processus biologiques (oligo-éléments) : le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le nickel (Ni), le cobalt (Co), le vanadium (V), le sélénium (Se), le molybdène (Mo), le manganèse (Mn), le chrome (Cr), l'arsenic (As) et le titane (Ti) (**Miquel, 2001**), mais ils peuvent aussi s'avérer contaminants au-delà d'un certain seuil. D'autres éléments ne sont pas nécessaires à la vie et

peuvent être même préjudiciables comme le mercure (Hg), le plomb (Pb), le cadmium (Cd) et l'antimoine (Sb) (**Chiffolleau et al., 2001**).

La contamination métallique des écosystèmes aquatiques est l'une des aspects de pollution les plus menaçantes pour ces milieux. Ainsi, elle aiguise de plus en plus la curiosité de la communauté scientifique. L'impact de ces éléments sur l'environnement est complexe, tant leurs actions toxiques peuvent être directes ou indirectes sur les individus, les populations ou les écosystèmes, autant que les phénomènes de synergie et le déclenchement des effets complexes sont possibles (**Devauchelles, 2002**). Cette situation a conduit à diversifier les approches permettant d'appréhender l'état de la pollution des milieux côtiers. Diverses stratégies ont été développées et mises en œuvre depuis la fin des années 70 (**Goldberg, 1986**).

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. D'une manière générale la surveillance environnementale ou écotoxicologique dans un écosystème marin est fondée sur deux approches complémentaires qui sont les bioindicateurs et les biomarqueurs (**Valavanidis et al., 2006**).

Un bioindicateur peut être un individu ou une communauté d'individus renfermant de l'information sur la qualité du milieu. **Goldberg (1975)** a proposé de suivre, à l'échelle internationale, les concentrations des contaminants dans les organismes vivants pour surveiller le milieu. C'est le principe des «bioindicateurs quantitatifs» basé sur le fait que les organismes marins concentrent les contaminants, en particulier les métaux lourds en relation avec les concentrations présentes dans le milieu (**Goldberg, 1975; Philips, 1977; Goldberg et al., 1978; Phillips, 1980; Philips et Segar, 1986**).

Les biomarqueurs ont fait leur apparition en écotoxicologie au cours des années 1980. Initialement décrit comme la réponse d'une structure ou d'une fonction biochimique ou physiologique « normale » à la présence d'un xénobiotique, la multiplication des investigations autour de cette thématique a engendré de nombreuses définitions de la notion de biomarqueur (**National Research Council, 1987; Huggett et al., 1992; Timbrell et al., 1994**). Nous retiendrons ici celle énoncée par **Lagadic et al. (1997)**. Les biomarqueurs présentent l'avantage d'une évaluation intégrée dans le temps, de l'exposition ou de l'effet des polluants environnementaux biodisponibles, qu'ils s'agissent de molécules mères ou de produits de dégradation, seuls ou en mélanges. Ils restituent, à un instant donné, une image intégrative des variations qualitatives et quantitatives de la contamination. Ils sont aussi susceptibles de refléter l'exposition des organismes à des polluants rapidement métabolisables

et peu cumulables (**Stegeman et al., 1992; Lagadic et al., 1997**). Un diagnostic complet de la qualité de l'environnement ne peut reposer sur une seule variable biologique. Les informations fournies par différents biomarqueurs sont ainsi complémentaires et l'approche « multi-marqueurs » est dorénavant préconisée et employée par tous les spécialistes de l'écotoxicologie pour la biosurveillance des milieux (**Amiard et Amiard-Triquet, 2008**).

La concentration et l'accumulation des métaux chez les organismes aquatiques sont des processus assez complexes. Les degrés d'assimilation et de rétention des métaux traces varient entre les différents genres et espèces (**Eisler, 1981**) et dépendent des propriétés biochimiques de chaque élément (**Bowen, 1966**). Pour constituer un bon « bioindicateur quantitatif », l'espèce animale utilisée doit avoir, selon **Butler et al. (1971)** et **Philips et Rainbow (1994)** des qualités bien précises.

Parmi les différents organismes aquatiques, les mollusques bivalves sont reconnus pour être d'excellentes espèces sentinelles du milieu, compte tenu notamment de leur sédentarité et/ou sessilité, leur large distribution géographique, leur facilité d'échantillonnage et de maintien au laboratoire ainsi que leur capacités de bioaccumulation des xénobiotiques (**Cajaraville et al., 2000; Viarengo et al., 2007; Berthet, 2008**).

L'utilisation des moules a été proposée à l'échelle mondiale par Goldberg dès 1975, sous le vocable « Mussel Watch ». Cette proposition a été mise en place avec succès sous deux stratégies: celles qui utilisent des populations indigènes ou cultivées des moules (biomonitorage passif, cas du RNO) (**Thibaud et Boutier, 1988; Claisse et al., 1992; Amiard-Triquet et al., 1999; Claisse, 2001**), et celles qui ont recours aux transplants des individus provenant d'un site de référence (biomonitorage actif, cas de RINBIO), sur un site d'étude pour un séjour de plusieurs semaines ou mois.

L'approche passive est utilisée depuis plusieurs décennies en raison de sa simplicité et de la possibilité de fixer des mesures à long terme, tandis que l'approche active a été introduite plus récemment pour compenser les limites de la première approche (**Sericano et al., 1995; Besse et al., 2012**). Bien que la procédure de mise en cages puisse affecter les organismes (**Pampanin et al., 2005**), elle permet (i) une réduction de la variabilité génétique et physiologique en utilisant une seule population, (ii) un contrôle du temps d'exposition, (iii) une comparaison inter-site indépendamment des conditions physico-chimiques et trophiques et (iv) une compensation pour l'absence d'organismes indigènes et a été appliquée avec succès dans de multiples études de biosurveillance (**Andral et al., 2004; Khan et al., 2011; Besse et al., 2012; Dabrowska et al., 2013; Turja et al., 2013, 2014**).

Le golfe d'Annaba est l'un des plus importants pôles touristiques et économiques le long du littoral Est Algérien. En effet, sa biodiversité est menacée par une pollution liée à une activité économique en plein essor. Cette portion maritime est le réceptacle de tous les résidus toxiques ou non produits par les différentes unités industrielles implantées le long de la côte (**PNAE-DD, 2002**). En outre, des travaux antérieurs ont montré que cette zone est influencée par des effluents riches en ETMs, viennent principalement des activités agricoles, industriels, urbaines ainsi qu'au développement touristique (**Abdenour et al., 2000; Beldi et al., 2006**). Par conséquent, le golfe subit depuis quelques années, l'impact de nombreux produits chimiques et de facteurs stressants, ce qui rend l'évaluation de la qualité de ses écosystèmes indispensable.

Dans le cadre de la biosurveillance permanente du golfe d'Annaba, cette thèse a pour objectif, le suivi et l'évaluation de la qualité de ces eaux, en utilisant l'approche active pour la première fois dans le golfe d'Annaba.

Le présent document est organisé de la manière suivante :

Le chapitre 1 comporte des généralités relatives à la pollution marine, les approches de surveillance de l'environnement et l'utilisation des bioindicateurs et des biomarqueurs ainsi qu'une description de la biologie de l'espèce *Perna perna* et du golfe d'Annaba.

Le chapitre 2 est consacré à la détermination de la qualité écotoxicologique par le dosage de quatre éléments traces métalliques : le cuivre, le zinc, le plomb et le cadmium dans les tissus de la moule *P. perna* et dans le sédiment des stations d'étude.

Le chapitre 3 est une estimation du niveau de la pollution à l'aide de marqueurs biochimiques, basée sur le dosage d'une batterie de biomarqueurs à savoir : GSH, GST, CAT, MDA et AChE.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale et des perspectives.

Chapitre I : GÉNÉRALITÉS

Chapitre I : Généralités

1. Pollution marine

Les polluants marins comprennent une grande diversité d'agents physiques, chimiques et biologiques qui induisent des effets négatifs sur les systèmes écologiques chaque fois que leur ampleur est supérieure à un certain seuil. Il y a plusieurs milliers de ces agents qui ont été ajoutés ou créés par des processus humains, et pour la plupart d'entre eux, les connaissances disponibles sont très rares, en particulier sur leurs impacts environnementaux et écosystémiques (UN, 2016). L'agriculture, le tourisme côtier et les loisirs, les activités portuaires, le développement urbain et industriel, l'exploitation minière, la pêche et l'aquaculture sont autant de sources de pollution marine (Fig.1) qui menacent les habitats côtiers et marins (GESAMP, 2009; UN, 2016). Les polluants, qu'ils soient physiques, chimiques ou biologiques, peuvent être d'origine océanique ou atteindre les écosystèmes marins par le drainage des rivières, des sources ponctuelles et des transferts atmosphériques. Malgré l'origine multiple des polluants, le drainage des bassins fluviaux et les sources ponctuelles directes sont souvent les principales voies de communication des sources terrestres, qui représentent environ 80 % de la pollution marine dans le monde (GESAMP, 2009; UN, 2016).

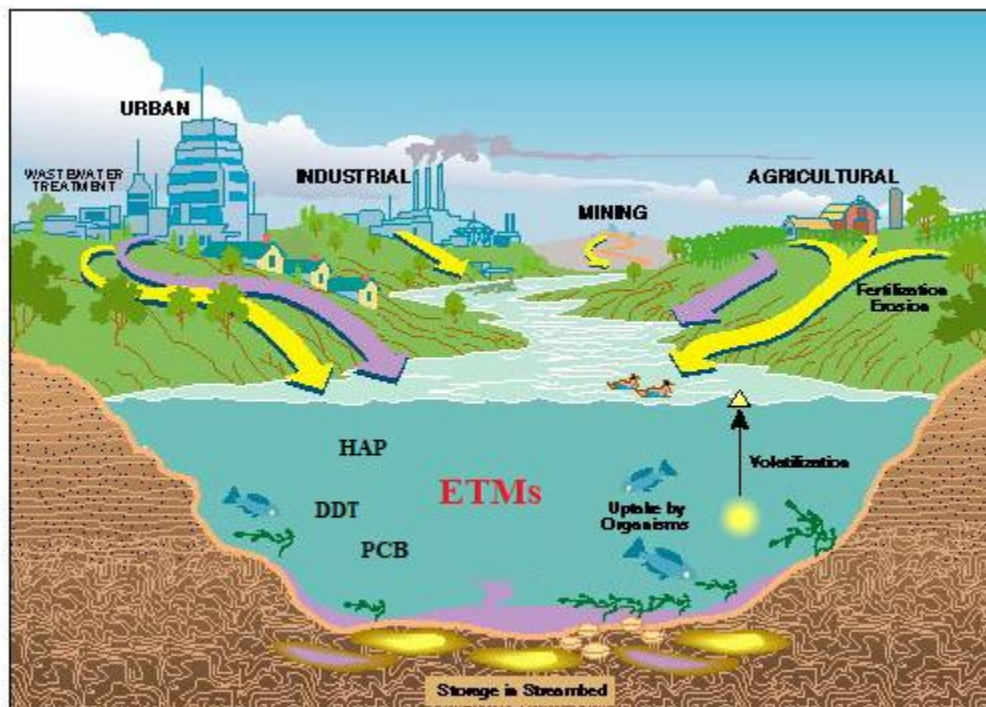


Figure 1. Principales sources de la pollution marine (Garbarino *et al.*, 1995, modifiée).

Le terme de pollution marine fait l'objet d'une définition, de la part du **GESAMP (1989)**, comme étant "l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, de substances ou d'énergie dans le milieu marin (y compris les estuaires) occasionnant des effets néfastes tels que des nuisances envers les ressources biologiques, des risques pour la santé de l'homme, des entraves aux activités maritimes (y compris la pêche), une altération de la qualité de l'eau de mer du point de vue de son utilisation et une dégradation des valeurs d'agrément".

Les environnements côtiers sont considérés comme des lieux à haut risque écologique en raison des processus biogéochimiques complexes et des activités humaines intensives, qui augmentent considérablement la présence de polluants organiques et inorganiques dans l'environnement (**Li et al., 2014**).

Afin d'estimer l'impact des pressions anthropiques sur les écosystèmes marins côtiers, il est nécessaire de mener des programmes de surveillance continue de la qualité et de l'état de santé de ces habitats d'importance écologique et économique (**Cohen et al., 2001; Zulfa et al., 2016**).

1.1 Types de pollutions

La plupart du temps, un rejet n'est jamais une source unique et les différents types de pollution sont mélangés et agissent les uns sur les autres (effets de synergie). Ainsi, un égout rejette des déchets organiques, des détergents dont certains s'accompagnent de métaux lourds (pollution chimique), des microorganismes (pollution biologique), le tout dans de l'eau douce (pollution physique) (**Gravez et Bernard, 2006**). Ainsi, nous distinguons :

1.1.1 Pollution biologique

Il peut s'agir de pollution par des micro-organismes (bactéries, virus, champignons) provenant d'égouts qui peuvent proliférer à leur arrivée dans le milieu récepteur, même s'il est vrai qu'il s'agit d'un milieu qui ne favorise pas la vie de la plupart des agents pathogènes (**Gravez et Bernard, 2006**).

Cette pollution peut résulter du rejet dans les eaux continentales ou littorales d'une grande variété de substances organiques fermentes cibles d'origines diverses (effluents urbains, matières fécales, industries, élevages,...) et se traduit par une forte contamination bactériologique. Elle soulève, dans bien des cas, de redoutables problèmes d'hygiène publique: qualité des eaux potables, salubrité des plages, qui ne sont pas limités aux seuls pays du tiers monde. Cette extension incessante de la pollution microbiologique des eaux

continentales et littorales a pour conséquence une recrudescence d'affections pathogènes (colibacilles, hépatites, virus entériques,...) (**Vincent, 2006**).

Il peut également s'agir de l'introduction d'une espèce marine exotique et envahissante (ex : la caulerpe : *Caulerpa taxifolia*) (**Gravez et Bernard, 2006**).

1.1.2 Pollution physique

On parle de pollution physique lorsque le milieu marin est modifié dans sa structure physique par divers facteurs. Il peut s'agir d'un rejet d'eau douce qui fera baisser la salinité d'un lieu (par une centrale hydroélectrique), d'un rejet d'eau réchauffée ou refroidie (par une centrale électrique ou une usine de regazéification de gaz liquide), d'un rejet liquide ou solide de substances modifiant la turbidité du milieu (boue, limon, macrodéchets...), d'une source de radioactivité (**GIS, 1996; Gravez et Bernard, 2006**).

Cependant, le rejet de chaleur dans l'environnement constituant de nos jours une forme de pollution physique du milieu naturel capable de provoquer de vrais bouleversements, car d'un point de vue écologique, il existe un paramètre incontournable qui est la température du milieu. Or, dans certains pays industrialisés, l'augmentation de température en aval des centrales électriques peut atteindre 7 à 8 ° C, ce qui engendre une modification totale des communautés aquatiques et de leurs modes de fonctionnement (**Vincent, 2006**).

1.1.3 Pollution chimique

C'est une pollution due au déversement de substances chimiques telles que les hydrocarbures, les détergents, les biocides, les pesticides (DTT, Lindane,...), les métaux lourds (Pb, Cd, Hg...) (**GIS, 1996**).

De nombreuses substances de synthèse issues du génie humain ont la capacité d'engendrer des sous produits (métabolites) encore plus dangereux comme le DDE, les dioxines.

Ainsi, l'Océan mondial est systématiquement pollué par des substances toxiques, même dans ses régions les plus reculées, à titre d'exemple les morues de la mer Baltique présentent des teneurs record en PCB (**Vincent, 2006**).

1.2 Types de polluants

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

Le comportement dans l'environnement d'une substance est difficile à appréhender, car il dépend de ses propriétés et de la nature du milieu récepteur. Par exemple, sa capacité à se retrouver dans l'atmosphère dépend à la fois de son degré de volatilité et de sa solubilité dans l'eau (RNB, 1999).

Selon Mouchel et Thévenot (2003) on distingue :

- **Les macropolluants :** Ce sont des molécules naturelles qui se trouvent dans l'environnement à des concentrations différentes de celles habituellement observées, ce qui entraîne une augmentation de la cinétique des réactions biochimiques (Tab. 1).
- **Les micropolluants :** Ce sont des produits actifs minéral ou organique susceptible d'avoir une action toxique à des concentrations infimes (de l'ordre du µg/l ou moins).

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

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

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

Ces polluants, en raison même de leur impact sur le milieu, font de plus en plus l'objet d'un suivi régulier. Cependant, leur détection dans les cours d'eau est difficile, en raison de la multiplicité des substances, la variabilité des contaminations et leur très faible concentration (RNB, 1999).

Tableau 1. Classes des micropolluants potentiellement retrouvés dans le milieu marin (Krishna Das, 2006).

Micropolluants minéraux	-Métaux traces -Silices et silicates -Amiante -Fluorocarbones
Micropolluants organique non pesticides	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques et hétéroaromatiques (PAH) Benzo (a) anthracène/ B(a)A et Benzo(a)pyrène/ B(a)P 2. Parafines chlorées : CH₃Cl, CHCl₃, 3. Aromatique halogénés : polychlorobiphényles (PCB), polychloroterphényles (PCT), polychloronaphtalènes (PCN) 4. Aromatique halogénés avec oxygène : Polychlorophénols (PCP) Polychlorodibenzo-para-dioxines (PCDD) Polychlorodibenzofurannes (PCDF) 5. Aromatiques volatils : benzène, toluène, xylène 6. Amines aromatiques (AA), Ester phtaliques, colorants, pigments, surfactants, produits pharmaceutiques...
Pesticides et biocides	<ol style="list-style-type: none"> 1. Organo-halogénés aliphatiques 2. Acides phénoxyacétiques 3. Diphényls (DDT) 4. Cyclodiènes 5. Triazines 6. Carbamates 7. Organophosphorés 8. Organomercuriels

2 Éléments traces métalliques (ETMs)

Dans les systèmes naturels, les métaux potentiellement toxiques peuvent provenir des roches, des minerais, des volcans et des intempéries rejets de métaux lors de la formation du sol transportés vers les eaux de surface et/ou aquifères (Szyczewski *et al.*, 2009). Il est qualifié de "lourd" si sa masse volumique est supérieure à 5 g/cm³ et s'il présente des risques de toxicité chez les organismes vivants. Dans les dernières décennies, la pression des activités des populations a été intense et des émissions anthropiques des métaux traces potentiellement toxiques se sont considérablement accélérées. Les impacts anthropiques des métaux toxiques sont principalement liés à les étapes de l'exploitation minière, de l'extraction et du raffinage et peut être cause d'une importante pollution de l'air, de l'eau et du sol (Norgate *et al.*, 2007). Les métaux lourds une fois rejetés dans l'environnement (air, eau, sol) ne disparaissent pas, mais s'accumulent dans les sols, les sédiments et le biote.

Les métaux classés comme métaux lourds sont: Cu, Co, Cr, Cd, Fe, Zn, Pb, Sn, Hg, Mn, Ni, Mo, V et W (Szyczewski *et al.*, 2009). Au sein du groupe des métaux lourds, on peut

distinguer à la fois les éléments essentiels pour les organismes vivants (micronutriments) et les éléments non essentiels.

Les métaux essentiels ou les micronutriments sont nécessaires pour le fonctionnement optimal des produits biologiques et biochimiques processus dans les organismes, tels que Cu, Zn, Fe, Mn, Co, Mo, Cr, et Se, sont nécessaires aux humains en petites quantités, quelques milligramme ou microgramme par jour, et Ca, Mg, Na, P et S, sont également nécessaires, mais en plus grandes quantités, 100 mg ou plus par jour, pour le fonctionnement optimal des processus biochimiques chez l'homme (**Stankovic et Stankovic, 2013**), alors que les éléments non essentiels n'ont pas de fonctions biologiques connues et exercent leur toxicité en concurrence avec les métaux essentiels pour l'enzyme active ou sites protéiques membranaires (**Torres et al., 2008**). Les métaux qui sont biologiquement essentiels ont le potentiel d'être nocifs pour humains et autres organismes vivants à des niveaux élevés d'exposition (**Stankovic et al., 2011; Stankovic et Jovic, 2012**).

2.1 Éléments Traces Métalliques (ETMs) en milieu marin

Les métaux lourds sont l'un des polluants les plus graves dans l'environnement naturel en raison de leurs problèmes de toxicité, de persistance et de bioaccumulation (**Pekey, 2006; Nouri et al., 2006**). La plupart des métaux lourds sont présents dans l'eau de mer à l'état de traces, alors qu'une concentration efficace peut affecter le biote marin et présenter un risque pour les consommateurs des espèces marines (**Turner, 1996**). L'impact des perturbations anthropogéniques est le plus fortement ressenti par les environnements estuariens et côtiers adjacents aux zones urbaines (**Nouri et al., 2008**). Dans les environnements côtiers et les estuaires, souvent caractérisés par de grandes implantations industrielles et des zones urbaines, l'impact des rejets d'effluents conduit à l'accumulation de métaux lourds (**Ridgway et Shimmiel, 2002**). Le rejet de plus grandes quantités de polluants dans le milieu aquatique peut entraîner une détérioration du déséquilibre écologique, modifier la nature physique et chimique de l'eau et du biote aquatique (**Mitra et al., 1996**). Les eaux côtières agissent comme une zone de transition dans laquelle le matériel d'altération continental est piégé et à travers lequel une partie du matériel est transporté en mer ouverte. La composition et la variabilité du total des solides en suspension (TSS) à la limite de la rivière et de l'océan sont affectées par les interactions sédiments-eau, les changements dans l'équilibre d'adsorption-désorption des métaux le long du gradient de salinité ou les deux (**Edmond et al., 1985**) et processus (débit fluvial, énergie marémotrice, courants), donc souvent difficiles à interpréter (**Turner et al., 1994**). Les sédiments de la région côtière peuvent être des indicateurs

sensibles pour la surveillance des contaminants dans les milieux aquatiques (**Balls et al., 1997; Atgin et al., 2000**), agir comme un réservoir majeur des métaux (**Caccia et al., 2003**), ainsi que comme une source de contaminants (**Adams et al., 1992**) à travers plusieurs voies, y compris le dépôt d'effluents liquides, le ruissellement terrestre et les lixiviats transportant des produits chimiques provenant d'activités urbaines, industrielles et agricoles, ainsi que le dépôt atmosphérique (**Rivail Da Silva et al., 1996; Karageorgis et al., 2002; Mucha et al., 2003**). L'enrichissement en métaux lourds du fait de l'industrialisation et de l'urbanisation a été enregistré dans les sédiments des mers côtières du monde entier (**Pekey, 2006**).

2.2 Présentation des Eléments Traces Métalliques étudiés

2.2.1 Cuivre (Cu)

Le cuivre est un oligo-élément, composant essentiel des fonctions biochimiques des organismes photosynthétiques, mais à des concentrations supérieures à ce qui est physiologiquement nécessaire, il devient un métal lourd phytotoxique (**Rai et al., 1981**). Il peut produire une inhibition de la croissance, une inhibition de la photosynthèse (**Garvey et al., 1991**), une inhibition des activités enzymatiques fondamentales (**Pinto et al., 2003**) ou des changements morphologiques en réponse au composé toxique.

La contamination environnementale due au cuivre est causée par les industries minières, des circuits imprimés, de la métallurgie, de la production de fibres, de la corrosion des tuyaux et du placage de métaux (**Barrell, 1975**). Les autres grandes industries rejetant du cuivre dans leurs effluents sont le papier et la pâte à papier, le raffinage du pétrole et la préservation du bois. Les sources agricoles telles que les engrais, les sprays fongicides et les déchets animaux entraînent également une pollution de l'eau due au cuivre. Le cuivre peut être trouvé comme contaminant dans les aliments, en particulier les crustacés, le foie, les champignons, les noix et les chocolats. Tout contenant d'emballage utilisant du cuivre peut contaminer le produit tel que les aliments, l'eau et les boissons (**Pendias et Kabata-Pendias, 1992**). Il a été rapporté que le cuivre provoque une neurotoxicité communément appelée «maladie de Wilson» en raison du dépôt de cuivre dans le noyau lenticulaire du cerveau et d'une insuffisance rénale (**Banum, 1982**). Dans certains cas, l'exposition au cuivre a entraîné une jaunisse et une hypertrophie du foie. Il est soupçonné d'être responsable d'une forme de fièvre des métaux (**Wagoner et Soffiotti, 1976**). Les sprays contenant du cuivre sont liés à une augmentation du cancer du poumon chez les travailleurs exposés (**Onundi et al., 2010**).

2.2.2 Zinc (Zn)

Le zinc est le 23^{ème} élément le plus abondant de la croûte terrestre et ses concentrations augmentent de façon anormale, en raison de l'ajout de zinc par les activités humaines (**Nasernejad et al., 2005**). Le zinc est un métal blanc bleuâtre brillant et se trouve dans le groupe IIB du tableau périodique. Il est cassant et cristallin aux températures ordinaires, mais il devient ductile et malléable lorsqu'il est chauffé entre 110 ° C et 150 ° C. C'est un métal assez réactif qui se combinera avec l'oxygène et d'autres non-métaux, et réagira avec les acides dilués pour libérer de l'hydrogène. La plupart du zinc est ajouté au cours d'activités industrielles, telles que l'exploitation minière, la combustion du charbon et des déchets et la transformation de l'acier (**Raut et al., 2012**). Le zinc est largement utilisé dans des industries telles que la galvanisation, la peinture, les batteries, la fonte, les engrais et les pesticides, la combustion de combustibles fossiles, les pigments, les stabilisants polymères, etc., et les eaux usées de ces industries sont polluées par le zinc, en raison de sa présence en grandes quantités (**Holdren et al., 1991**).

2.2.3 Plomb (Pb)

Le plomb est un métal mou gris bleuâtre ou argenté de numéro atomique 82; poids atomique 207,19; gravité spécifique 11,34, point de fusion 327,5 ° C et point d'ébullition 1740 ° C. C'est le métal industriel le plus courant qui s'est répandu dans l'air, l'eau, le sol et les aliments. Le plomb est légèrement soluble dans l'eau et est transporté principalement dans l'atmosphère. Il se comporte comme le calcium dans le corps et s'accumule dans les os, le foie, les reins, le cerveau et d'autres tissus (**Raikwar et al., 2008**).

Le plomb est rejeté dans l'atmosphère par des sources naturelles et anthropiques. Les émissions naturelles de plomb proviennent de volcans, incendies de forêt et sources biogéniques. Les sources anthropiques majeures d'émission de Pb comprennent la combustion des combustibles fossiles provenant du trafic, de la production de métaux non ferreux et production de fer et d'acier (**OMS, 2007**). Les niveaux de Pb dans l'environnement varie entre 4 et 20 mg / g de poussières; les eaux non contaminées contiennent du Pb à des concentrations allant de 0,001 à 0,06 mg / L, tandis que l'eau de mer contient jusqu'à 0,03 µg / L (**Bardi, 2010**). Dans les sols supérieurs, les concentrations de Pb sont spatialement hétérogène et varient de moins de 10 mg / kg à 70 mg / kg. La valeur médiane est estimée à 22,6 mg / kg dans le sol européen.

En général, l'ingestion de Pb par les aliments et l'eau est la voie d'exposition majeure au plomb chez l'homme. Les individus absorbent plus de Pb dans leur alimentation si leur alimentation est déficiente en Ca, Fe ou Zn (**Hu, 2002**). La directive européenne sur la qualité de l'air ambiant pour Pb est de $0,5 \mu\text{g} / \text{m}^3$ et à proximité immédiate de sources industrielles, la valeur était de $1 \mu\text{g} / \text{m}^3$ jusqu'en 2010 (**OMS, 2007**). Les niveaux de Pb dans les sols varient de 5 à 30 mg / kg. En plus des dépôts atmosphériques, les pratiques sont une source d'apport de plomb dans les sols à partir de minéraux et les engrais organiques (**OMS, 2007**). Selon **Krystofova et al. (2009)**, les niveaux de Pb dans l'environnement ne sont pas stables et varient selon la production industrielle, l'urbanisation, le changement de climat et de nombreux autres facteurs.

2.2.4 Cadmium (Cd)

Le cadmium pur est un métal doux et blanc argenté. La propriété physique du cadmium est le numéro atomique 48, le poids atomique 112.411, l'électronégativité 1,5, le rayon cristallin ionique (état de valence principal) 0,97, le potentiel d'ionisation 8,993, l'état d'oxydation +2, l'électronconfiguration Kr 4d1 5S2 Densité $8,64 \text{ g} / \text{cm}^3$, point de fusion $320,9^\circ \text{C}$ et point d'ébullition 765°C à 100 kPa. On le trouve généralement sous forme de minéral combiné à d'autres éléments tels que l'oxygène (oxyde de cadmium), le chlore (chlorure de cadmium) ou le soufre (sulfate de cadmium, sulfure de cadmium). Le cadmium est toxique pour pratiquement tous les systèmes du corps animal (**Raikwar et al., 2008**).

Le Cd est rejeté dans la biosphère à la fois par sources anthropiques aussi. L'émission totale de Cd dans l'air provenant des sources naturelles est estimée à environ 150-2,600 t (**OMS, 2007**). La production mondiale de Cd a augmenté avec un facteur de 4 de 1950 à 1990 et au cours de la dernière décennie la production a légèrement diminué. Emission globale de Cd dans l'air jusqu'à la fermeture de l'an 2000 à 3,000 t/an et en Europe 257 t en 2003. Les émissions de Cd dans les pays de l'UE ont diminué de 50 % et les sources dominantes de Cd sont les dépôts atmosphériques et les engrais phosphatés commerciaux (**OCDE, 1994**).

Sur la base de la teneur en Cd des sols de surface dans de nombreuses régions du monde, la valeur moyenne se situe entre 0.07 et 1.1 mg/kg. Les valeurs supérieures à 0.5 mg/kg généralement reflètent les apports anthropiques de Cd (**OMS, 2007**). Il y a trois principales sources anthropiques de Cd terrestre: dépôt atmosphérique, application agricole de phosphate engrais et utilisation des boues d'épuration municipales comme engrais sur les sols agricoles. Il a été rapporté que 90 % du Cd dans le sol restent dans les 15 premiers centimètres

(OMS, 2007). Des niveaux de Cd allant jusqu'à 5 mg / kg ont été signalés dans les sédiments des rivières et des lacs, et de 0,03 à 1 mg/kg dans les sédiments des mers. La teneur moyenne en Cd est d'environ 5 à 20 ng/L en pleine mer (OSPAR, 2002). Les eaux potables contiennent de très faibles concentrations en Cd, généralement entre 0,01 et 1 µg/L (OMS, 2007).

2.3 Transferts des contaminants dans l'environnement marin

Différents termes sont employés pour désigner les processus qui définissent le devenir des contaminants dans les différents compartiments de l'environnement (physique ou biologique), on distingue :

2.3.1 Bioconcentration

La bioconcentration décrit l'accumulation d'un produit chimique en suspension dans l'eau par un organisme aquatique (généralement dans des conditions de laboratoire). Le facteur de bioconcentration (FBC) d'un composé chimique est défini comme le rapport entre la concentration de ce produit chimique dans un organisme (ou dans la graisse, ou dans un certain tissu de l'organisme) et la concentration du produit chimique dans l'environnement aqueux (Davies et Donas, 1984 ; Meylan *et al.*, 1999):

$$BCF = C_{org} / C_m$$

Où C_{org} est la concentration du produit chimique dans l'organisme (ou tissu), C_m est la concentration du produit chimique dans l'environnement aqueux dans lequel vit l'organisme respectif, et les deux concentrations sont mesurées après une exposition à long terme jusqu'à ce que l'état d'équilibre soit atteint. Le calcul des BCF peut être basé sur le poids humide, BCF_w , ou sur la teneur en lipides, BCF_L , de l'organisme aquatique ou de ses tissus. Les BCF sont généralement déterminés pour diverses espèces de poissons, mais d'autres organismes aquatiques peuvent être utilisés, comme les algues ou les moules.

2.3.2 Bioaccumulation

Les organismes aquatiques peuvent accumuler des composés chimiques à la fois directement de l'environnement (via la peau ou la surface respiratoire) et indirectement (en collectant et en concentrant un composé chimique dans les aliments). Ce processus est appelé bioaccumulation et est mesuré avec le facteur de bioaccumulation (FBA) qui est défini comme le rapport de la concentration d'un produit chimique accumulé à l'intérieur d'un organisme (provenant de la nourriture et de l'exposition directe) à la concentration dans le milieu environnant (Mackay et Fraser, 2000):

$$FBA = C_{org} / C_m$$

Le niveau de bioaccumulation dépend de la nature du composé chimique, de l'espèce, de la durée de l'exposition, de la concentration dans l'eau et de son niveau d'accumulation dans les aliments. Le FBA peut être particulièrement élevé pour les composés lipophiles hautement solubles dans la fraction lipidique de l'organisme, et avec un taux de métabolisme faible ou négligeable dans l'organisme (ce qui les rend très persistants). Même lorsque la concentration dans l'eau de ces produits chimiques est trop faible pour causer des problèmes de santé en buvant de l'eau, leur forte bioaccumulation peut présenter des risques pour ceux qui mangent du poisson ou des crustacés.

2.3.3 Bioamplification

La bioamplification est l'accumulation d'un produit chimique par un organisme à partir d'une exposition à l'eau et à des aliments qui se traduit par une concentration supérieure à celle qui aurait résulté de l'exposition à l'eau uniquement et donc supérieure à celle attendue à l'équilibre.

Elle fait aussi référence à la condition où la concentration chimique dans un organisme dépasse la concentration de sa nourriture lorsque la principale voie d'exposition provient du régime alimentaire de l'organisme. Le terme de bioamplification du réseau trophique est utilisé pour décrire l'enrichissement trophique des contaminants dans les réseaux trophiques et fait référence à l'augmentation progressive des concentrations chimiques avec l'augmentation du statut trophique animal.

Un facteur de bioamplification (BMF) peut être défini comme le rapport de la concentration de produit chimique dans l'organisme CB à celle du régime alimentaire de l'organisme CA et peut être exprimé comme suit:

$$BMF = C_B / C_A$$

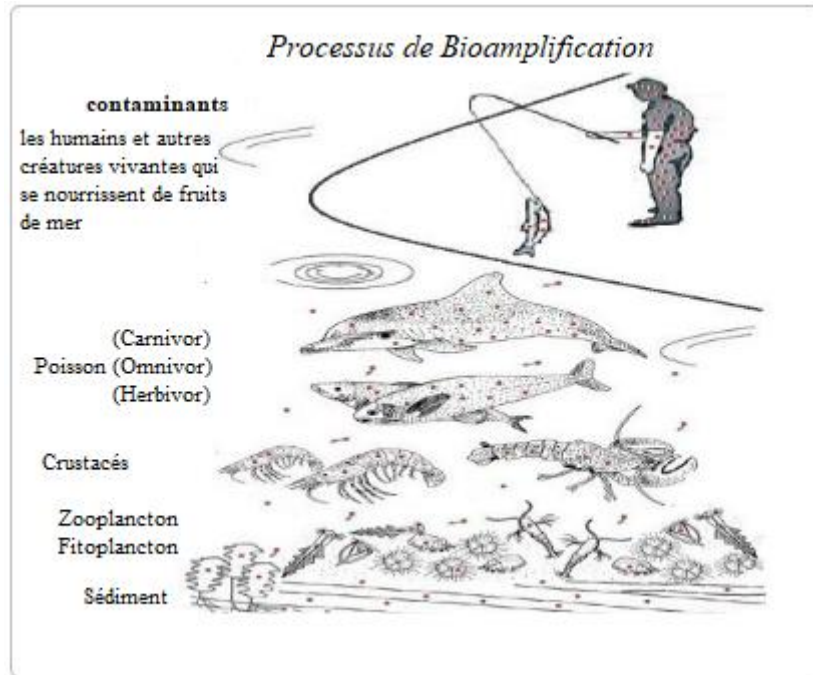


Figure 2. Illustration du processus de la bioamplification (Vural, 2005, modifiée)

2.4 Effets écotoxicologiques des contaminants chimiques

L'étude des effets des contaminants chimiques sur la faune et la flore marine constitue un enjeu complexe qui se décline schématiquement à deux niveaux, celui des organismes, celui des peuplements (Fig. 3).

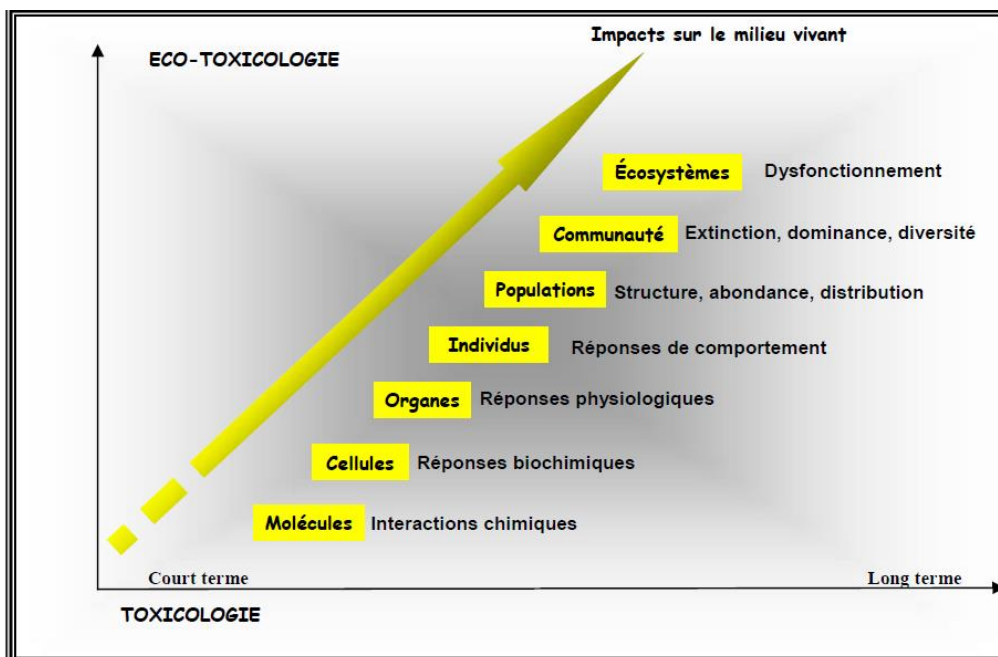


Figure 3. Effets des contaminants chimiques sur les différents niveaux d'organisation biologique (Marchand, 2002 ; IFREMER, 2006).

A l'échelle de l'organisme, l'approche physiologique permet de comprendre l'action d'un contaminant chimique en terme essentiellement de survie, de reproduction ou de croissance.

A l'échelle du peuplement, l'approche écologique, infiniment plus complexe, porte sur l'étude de la structure et la dynamique des unités fonctionnelles d'un écosystème. Il existe une diversité des approches pour évaluer les effets des contaminants chimiques sur le milieu vivant, depuis les réponses biochimiques au niveau cellulaire, les réponses physiologiques ou comportementales au niveau des individus, au dysfonctionnement à l'échelle complexe de l'écosystème. Cette diversité d'approche s'inscrit dans les champs disciplinaires de l'écotoxicologie et de l'écologie, et dans une échelle de temps, du court terme au long terme (**Marchand, 2002**).

2.5 Effets des métaux lourds sur la santé humaine

Les métaux lourds existent naturellement dans la croûte terrestre (**Al-Samman, 2015**), mais peuvent causer de graves problèmes à tous les êtres vivants et sont des polluants toxiques pour l'environnement naturel (**Fu et Wang, 2011**). En raison de la croissance exponentielle de l'utilisation de divers produits et industries, l'exposition humaine aux métaux lourds a considérablement augmenté au cours des 50 dernières années (**Bedrin et al., 2003**). Les métaux lourds peuvent interférer avec la fonction métabolique du corps par divers moyens. Certains métaux, comme le manganèse, le zinc, le cuivre et le fer, sont nécessaires au corps humain (**Lane et Morel, 2000**), mais peuvent devenir toxiques à des doses élevées (**Asubiojo et al., 1997**). D'autres métaux lourds, tels que le mercure et le plomb, n'ont aucun effet sur la santé mais sont préjudiciables à la santé humaine lorsqu'ils s'accumulent dans le corps humain (**Asubiojo et al., 1997**).

Les métaux lourds peuvent interférer avec les fonctions métaboliques de l'homme de différentes manières. De plus, ils peuvent s'accumuler dans des organes importants du corps humain, tels que le cerveau, le cœur, le foie et les reins, ruinant les fonctions biologiques normales. Les métaux lourds peuvent pénétrer dans le corps humain en empruntant divers voies (Fig. 4), tels que la consommation d'aliments et d'eau potable contaminés, et par l'air, ce qui peut entraîner une série d'effets néfastes sur la santé humaine (**Al-Samman, 2015**).

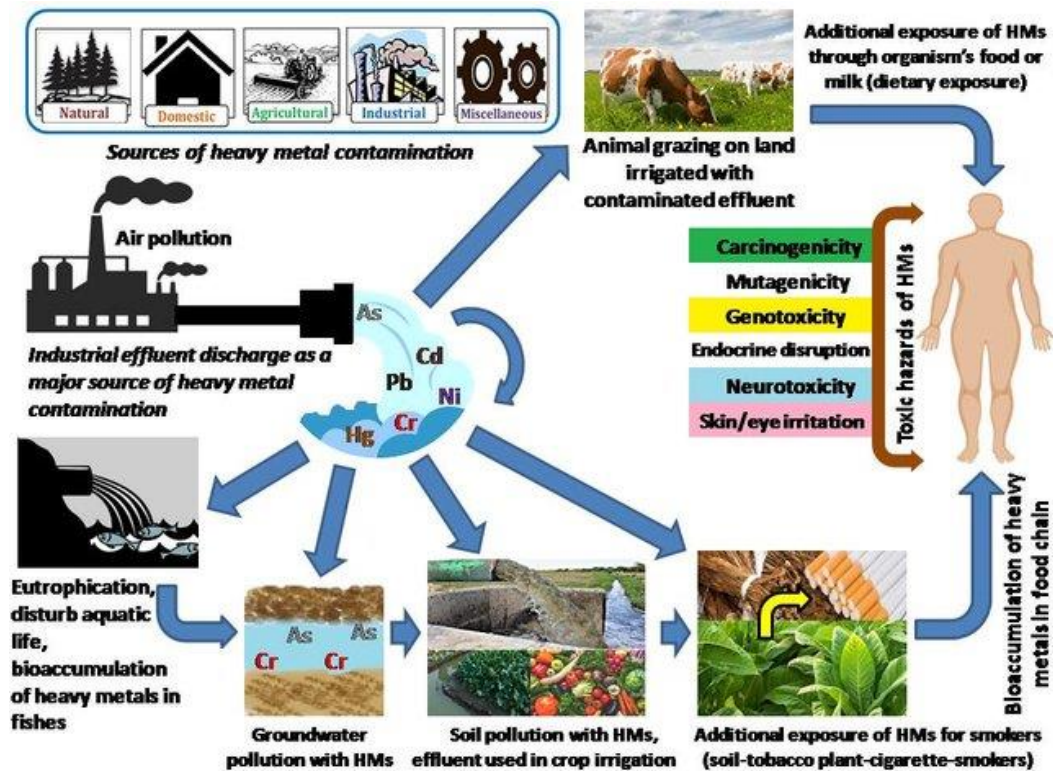


Figure 4. Différentes voies de contamination humaines par les ETMs (Saxena *et al.*, 2019).

Les principaux métaux lourds qui causent cet effet comprennent le cadmium, l'arsenic, l'aluminium, le mercure et le fer. En raison de l'industrialisation accrue de la société et de l'exposition accrue aux métaux lourds dans le monde, les effets nocifs sur la santé humaine associés à l'exposition aux métaux lourds ont augmenté ces dernières années (Rusyniak *et al.*, 2010) par l'exposition aux métaux lourds. De nombreuses études ont montré que la cancérogénicité et la mutagénicité des métaux lourds sont associées à l'induction du stress oxydatif. À cet égard, certaines études ont montré que les réactions redox dans les systèmes biologiques sont réalisées par des ions métalliques cancérogènes, tels que le nickel, le chrome, le cobalt et l'arsenic. Par conséquent, les radicaux libres produits par ces réactions provoquent des dommages oxydatifs aux protéines et à l'ADN. Malgré les dommages directs de l'ADN, les espèces produites par ces réactions redox ont également deux autres fonctions importantes qui causent le cancer chez l'homme. L'un est l'activation de facteurs de transcription sensibles à l'oxydoréduction, tandis que les autres fonctions impliquent son rôle de signal mitotique (Genestra, 2007). Les métaux lourds stockés détruisent les principaux processus métaboliques de l'organisme et provoquent un déséquilibre des antioxydants. De même, l'activité de diverses hormones et la fonction d'enzymes indispensables sont également affectées (Jayawardena *et al.*, 2017). Avec des changements dans le métabolisme des

glucides, des protéines et des lipides, la sensibilité du corps aux infections est susceptible d'augmenter ; modifier la synthèse et l'application des neurotransmetteurs dans le corps, qui à leur tour modifient une gamme de fonctions du système nerveux central (SNC) (**Qayyum, Ara et Usmani 2012**). Les voies moléculaires qui sont affectées par les métaux lourds, ils produisent finalement des espèces réactives de l'oxygène qui peuvent provoquer un stress oxydatif, un processus qui peut conduire à différents types de cancers, une insuffisance rénale, des maladies neurologiques et d'autres maladies endocriniennes (**Qayyum, Ara et Usmani 2012**).

3 Biosurveillance environnementale

La surveillance des niveaux de polluants dans l'environnement peut être effectuée de plusieurs manières, en fonction de l'objectif spécifique d'une étude. La mesure de la concentration de polluants inorganiques (par exemple, métaux lourds, radionucléides, éléments de terres rares) et organiques (dichlorodiphényl-trichloroéthane ; DDT, hexachlorocyclohexanes ; HCH, biphényles polychlorés ; PCB, hydrocarbures aromatiques polycycliques ; HAP, etc.) dans l'environnement peut être réalisé par analyse chimique directe de l'eau et des sédiments (**Superville et al., 2014**). Cependant, ces données fournissent peu d'informations sur la concentration de toxines biodisponibles, qui sont celles disponibles pour l'absorption et l'accumulation par les organismes vivants. Les contaminants biodisponibles sont la partie la plus pertinente d'un point de vue écotoxicologique (**Soto et al., 1995**), car ils posent en fin de compte un risque potentiel pour la santé des humains et des sources alimentaires dont ils dépendent. Ainsi, la surveillance des niveaux de polluants biodisponibles était l'objectif initial de l'initiative Mussel Watch (**Vieweg et al., 2012**).

Le "Mussel Watch" était, et est toujours, une stratégie de biosurveillance réussie en raison de plusieurs avantages dans l'utilisation des bivalves comme sentinelles, par opposition à d'autres organismes ou même des mesures directes des polluants dans l'eau ou les sédiments (**Goldberg, 1986**). Premièrement, les parties molles et les coquilles des bivalves contiennent des enregistrements de polluants qui ont été moyennés sur un certain intervalle d'accumulation. Ces intervalles d'accumulation sont définis par divers processus métaboliques mais varient selon les espèces, les environnements et les saisons de l'année. Ceci est avantageux par rapport aux mesures directes des polluants dans l'environnement qui ne fourniraient que des instantanés temporels et spatiaux des réseaux instrumentaux peu coûteux ont été installés pour surveiller les polluants en continu sur de longues périodes de temps et à différentes localités. Un signal environnemental provenant d'une seule localité, plutôt qu'une

moyenne spatiale qui serait produite par un organisme mobile. Les bivalves ont également la capacité de bioaccumuler des polluants dans leurs tissus à plusieurs fois la concentration dans l'environnement ambiant, ce qui facilite les analyses chimiques. Enfin, les bivalves ont une distribution biogéographique très large et peuvent être très abondants dans de nombreux environnements, ce qui permet d'analyser de nombreux spécimens dans à peu près n'importe quel milieu aquatique.

3.1 Développement d'approches de biosurveillance en milieu aquatique

Il existe actuellement deux stratégies différentes pour la biosurveillance chimique (c'est-à-dire la surveillance de la contamination dans le biote) qui peuvent être adoptées: passive ou active. Les approches passives reposent sur des organismes indigènes (**Goldberg, 1975**), tandis que les approches actives reposent sur des individus transplantés (ou en cage) à partir d'un site de référence (**Andral et al., 2004**).

3.1.1 Biosurveillance passive

Les approches passives ont été les premières à émerger, en grande partie grâce à des projets mis en œuvre pour surveiller les tendances de la contamination dans les milieux marins. Ces approches peuvent s'appuyer sur un historique étendu, issu de plusieurs programmes. Les approches de biosurveillance passive les plus courantes sont celles basées sur les moules marines dans le cadre du modèle «Mussel Watch» (**Goldberg, 1975; Borja et al., 2008**).

Dans les eaux marines, le «Mussel Watch» de la NOAA représente le plus ancien programme de surveillance continue des contaminants dans les eaux côtières et des Grands Lacs des États-Unis. Ce projet est en cours depuis 1986, mais le programme original " US Mussel Watch " a été lancé en 1976 (**Goldberg, 1980**). Le programme couvre 300 sites côtiers et surveille plus de 100 contaminants organiques et inorganiques (HAP, PCB, DDT, TBT, pesticides chlorés et les éléments traces toxiques) dans les sédiments et les tissus du biote. Il est basé sur la collecte annuelle et l'analyse des huîtres et des moules. Comme il n'y a pas une seule espèce de moules ou d'huîtres commune à toutes les régions côtières, une variété d'espèces sont collectées (les espèces de *Mytilus*, *Crassostrea virginica* et les espèces de *Dreissena*) à afin d'acquérir une perspective nationale.

En France, l'Ifremer (institut de recherche français pour l'exploration de la mer) gère depuis 1974 le réseau " RNO " (Réseau national d'observatoires de la qualité de l'environnement marin) et depuis rebaptisé " ROCCH " - Réseau national de contamination

chimique (Claisse *et al.*, 1992 ; Amiard-Triquet *et al.*, 1999). Cette approche repose sur le suivi des populations naturelles de trois bivalve mollusques ; une espèce d'huître (*Crassostrea gigas*) et deux espèces de moules (*Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*), afin d'assurer une couverture à l'échelle nationale.

3.1.2 Biosurveillance active en milieu marin

Même si les approches passives se sont révélées utiles pour surveiller les tendances de contamination des métaux et de plusieurs contaminants organiques, elles sont reconnues comme souffrant de deux inconvénients majeurs :

1. elles dépendent de la présence effective de l'organisme natif sur les sites échantillonnés;
2. plusieurs facteurs (par exemple, la variabilité de la durée d'exposition, de l'âge et de la taille des organismes échantillonnés) peuvent nuire à l'interprétation précise des résultats (Tab. 2)

Des approches actives, basées sur des organismes transplantés, ont été développées plus récemment dans le but de résoudre ces limitations. En effet, (i) elles peuvent être appliquées même si les sites d'étude sont dépourvus d'organismes natifs, (ii) elles peuvent minimiser la variabilité biologique en utilisant des organismes prélevés dans la même population, et (iii) elles permettent de contrôler totalement le temps d'exposition (Tab. 2) (Bervoets *et al.*, 2005; Bourgeault *et al.*, 2010).

Tableau 2. Avantages et limites de la biosurveillance passive et active.

Biosurveillance passive	Biosurveillance active
<p>Avantages :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Échantillonnage aisé. • Mesure à long terme • Largement utilisé, s'appuyant sur les programmes existants • Lignes directrices existantes (en particulier pour les eaux marines) <p>Limites :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dépend de la répartition géographique des espèces. • Mobilité des espèces. • Abondance et distribution du matériel biologique variables d'un site à l'autre. • Temps d'exposition inconnu. • Variabilité saisonnière de la bioaccumulation des contaminants • Les effets des facteurs biotiques (sexe, âge, longueur) peuvent confondre l'interprétation 	<ul style="list-style-type: none"> • Limité à quelques espèces. • Nécessite le choix des sites d'exposition. • Exige la durée d'exposition. • Nécessité de contrôler/mesurer les paramètres biotiques (poids, sexe, âge, etc.). • Impose le choix du stock ou de l'origine du matériel biologique. • Reproductibilité de l'expérience. • Coût et durée de l'expérimentation prévisibles. <ul style="list-style-type: none"> • Ne convient pas à toutes les espèces. • Possibilité d'influence des systèmes de mise en cage sur l'exposition du matériel biologique et/ou des réponses biologiques • Aléas d'accessibilité à la nourriture pour le matériel biologique mis en cage. • Absence de méthodologie standardisée/normalisée pour les écosystèmes continentaux. • Actuellement non utilisé à grande échelle pour les écosystèmes continentaux.

En 1996, l'Ifremer a développé RINBIO («Réseau Intégrateurs Biologiques») comme une

méthodologie développée autour de la mise en cage des moules marines (*Mytilus galloprovincialis*) (Andral *et al.*, 2004). En effet, l'utilisation d'organismes transplantés a permis de compenser la rareté des colonies de moules sauvages dans certaines régions de la côte méditerranéenne française. Afin de proposer une méthodologie permettant une comparaison inter-sites fiable, l'approche a intégré plusieurs facteurs connus pour introduire des biais et potentiellement fausser l'interprétation des résultats:

1. variabilité liée à la physiologie de l'organisme (par exemple, taille, âge et cycle de reproduction);
2. disponibilité des sources alimentaires entre les différents sites d'étude.

En outre, la stratégie méthodologique a également ajusté les concentrations de contaminants «bruts» à un individu de référence «standard» pour permettre des comparaisons de données robustes à l'échelle du réseau. Ce programme a surveillé le même ensemble de contaminants que ceux surveillés dans le cadre du système de réseau ROCCH. La surveillance des contaminants chimiques le long de la côte méditerranéenne est actuellement basée sur une immersion de 3 mois de cages à moules, dans une cinquantaine de stations d'étude, une fois par an.

La récente initiative «Projet Mytilos», basée sur le même principe structurel que RINBIO, a été développée pour étudier la contamination par les métaux lourds (Hg, Cd, Pb et Ni) des moules encagées (*M. galloprovincialis*) sur plus de 120 sites couvrant tout le bassin méditerranéen.

3.2 Indicateurs biologiques de pollution

La notion d'indicateur biologique a évolué au fil du temps. Au départ, le terme de bioindicateur désignait tout organisme ou système biologique qui, par sa présence ou son absence, était caractéristique d'un milieu précis ou alors révélait l'incidence d'un facteur particulier. Ce terme désigne alors des espèces biologiques ou animales qui, du fait de leurs particularités écologiques, réagissent à un polluant par une modification nette et spécifique de leurs fonctions vitales (Ulmer, 1997). Et plus précisément, un indicateur biologique est un organisme ou un ensemble d'organismes qui par référence à des variables biochimiques, cytologiques, éthologiques ou écologiques permet de façon pratique et sûre de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées (Blaudin, 1986).

La surveillance biologique de la qualité des ressources vivantes côtières d'intérêt économique exposées aux diverses pollutions employant les bioindicateurs vise finalement la surveillance de la santé publique de l'homme, qui est le maillon final dans la chaîne alimentaire.

En raison de leur forte capacité de bioconcentration des polluants, les organismes marins consistent un excellent matériel biologique pour prévoir et détecter les éventuelles distributions spatiale et temporelle de ces polluants. Pour cette raison, ils sont utilisés régulièrement dans les programmes de surveillance. En résumé, les propriétés d'un bioindicateur (ou espèce sentinelle), doivent être les suivantes (**Cabane, 2007**) :

- Représentative de son milieu d'origine et en même temps pouvoir comparer plusieurs stations de la côte pour la même espèce indicatrice ;
- Présenter des variations qualitatives et quantitatives représentatives des changements du milieu d'origine ;
- Représentative des espèces d'intérêt économique à large consommation.

Une connaissance préalable de la bioécologie (distribution, stratégie alimentaire, sexualité, développement et croissance, longévité, etc.) de l'espèce cible est une condition essentielle avant sa sélection comme bioindicatrice. L'étude des cinétiques d'accumulation permet d'obtenir des informations sur la durée d'intégration de la contamination. Plusieurs espèces déjà utilisées dans la surveillance du milieu marin ont échoué de satisfaire les conditions requises (**Nakhle, 2003**). Les stratégies d'accumulation propres à chaque bioindicateur surtout pour les métaux traces doivent être bien établies et appuyées par l'expérimentation (**Phillips et Rainbow, 1993**).

En tant qu'organismes filtreurs, les moules ont d'intéressantes capacités à concentrer certains contaminants tels que les métaux lourds et matières organiques persistants à l'endroit précis où elles se développent (**Thomas, 1990**).

Les chercheurs sont unanimes sur le principe de l'utilisation de la moule comme bioindicateur quantitatif et qualitatif (**Fisher et al., 1987**). Le choix de cette espèce dans le cadre du suivi biologique des effets de la pollution côtière sur les organismes marins n'est pas strictement scientifique puisque la moule reste un produit largement consommé, et donc la salubrité de cette espèce concerne la santé publique (**Bocquene, 2002**).

3.3 Intérêt d'utilisation des moules en biosurveillance

L'utilisation des moules comme organismes de biosurveillance a été introduite pour la première fois au milieu des années 70 avec les premières étapes de la mise en place du

programme de surveillance «Mussel Watch» pour évaluer les tendances spatiales et temporelles de la contamination chimique dans les environnements estuariens et côtiers (**Goldberg, 1975**). Depuis lors, l'importance des moules pour la surveillance de la pollution s'est accrue rapidement (**Chase et al., 2001**). **Rainbow (1995)** a fait allusion à l'attrait des moules en tant que biomoniteurs en raison de leur distribution cosmopolite. Le genre *Mytilus* est un organisme de biosurveillance fréquemment utilisé, principalement en raison de sa distribution le long de la plupart des zones côtières du monde. L'espèce *M. edulis* est répandue dans l'hémisphère nord tempéré et dans les régions les plus méridionales d'Amérique du Sud tandis que *M. galloprovincialis* a une plus large distribution (Méditerranée, États-Unis, Afrique du Sud, Asie de l'Est, Australie, Nouvelle-Zélande) (**Gosling, 1992**). Par contre, les moules du genre *Perna* ont un potentiel de biomoniteurs de contamination, en particulier dans les eaux tropicales pour les espèces *P. perna* et *P. viridus* (**Bainy et al., 2000**). Globalement, les moules présentent de nombreux avantages par rapport à d'autres organismes aquatiques, d'où leur intérêt en biosurveillance (**Metcalf-Smith, 1994**).

- Bien que la manipulation ultérieure des organismes ait un effet négatif démontrable sur la croissance des bivalves (**Salazar et Salazar, 1996**), les situations stressantes comme la gestion du stress et le surpeuplement sont moins importantes chez les bivalves alors qu'elles peuvent être une source sérieuse de stress chez d'autres organismes aquatiques. Un avantage supplémentaire est l'utilisation de cages plus petites car les exigences en matière d'espace vital pour les moules sont minimales;
- Les moules sont relativement résistantes à la pollution, bien que cette caractéristique soit évidemment dépendante des espèces. Les espèces expérimentales les plus couramment utilisées pour les études de surveillance tant en mer qu'en eau douce ont une tolérance à la pollution relativement élevée, bien que cela ne signifie pas nécessairement qu'elles y sont insensibles; En tant que filtreurs, les moules sont exposées à l'eau, à la nourriture et aux matières en suspension comme sources potentielles de pollution. Cela fournit une mesure intégrée de l'exposition à la pollution, ce qui n'est généralement pas le cas avec d'autres espèces testées ;
- Les moules ont une bioaccumulation très élevée et un faible potentiel de biotransformation pour les contaminants organiques et inorganiques. Cela signifie qu'il n'y aura pas ou peu de transformation, des micropolluants organiques, par exemple et que les moules peuvent être utilisées comme bioaccumulateurs à long terme. Cet avantage peut être illustré par le bon accord de bioaccumulation entre les moules et les dispositifs à

membrane semi-perméable (SPMD) tant pour le milieu d'eau douce (**Sabaliunas et al., 1998**) que marin (**Baussant et al., 2001**);

- Les moules marines sont des organismes sessiles et sont souvent facilement récoltées. La plupart du temps, ils sont fixés sur des substrats rocheux ou ligneux à haute densité, ce qui facilite la collecte d'un grand nombre d'organismes au même endroit (de référence) à une certaine période de l'année. Les moules d'eau douce, à part *Dreissena polymorpha*, ne partagent pas cet avantage.

Cependant, il existe un certain nombre de caractéristiques négatives liées à l'utilisation des moules comme outil de biosurveillance:

- **La reproduction** en tant que paramètre écotoxicologique à très haute pertinence écologique est relativement difficile à mesurer chez les moules et dépend fortement de la saisonnalité (**Seed et Suchanek, 1992**) ;
- Il n'existe **pas de populations de référence claires**, alors que d'autres organismes aquatiques (comme, par exemple, les daphnies) ont des réponses clairement définies dans des situations «sans stress» ou en laboratoire. Cela pourrait rendre les comparaisons entre différentes études relativement difficiles lorsque les moules destinées à la transplantation ont été prélevées sur des sites de collecte géographiquement différents, car il n'y a généralement pas ou seulement peu d'informations sur l'histoire des organismes ;
- Les moules ont un **potentiel de biotransformation nul ou relativement faible** des contaminants organiques. Bien que cette caractéristique puisse également être considérée comme un avantage, le manque d'enzymes de biotransformation limite l'utilisation de certains biomarqueurs comme paramètres rapides et sensibles de l'exposition aux polluants (**Daubenschmidt et al., 1997**).

3.4 Biomarqueurs : définitions, avantages et limites

Les biomarqueurs peuvent être considérés comme des outils complémentaires aux analyses chimiques et écologiques classiquement utilisées pour la surveillance de terrain (**Sanchez et al., 2008**). Développés pour la première fois en biologie humaine pour permettre un diagnostic précoce des pathologies, les biomarqueurs ont ensuite été utilisés en écotoxicologie pour évaluer les effets de la pollution sur les organismes sauvages. Dans ce contexte, un biomarqueur a été défini comme "une variation biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale qui peut être mesurée dans des échantillons de tissu ou de

fluide corporel ou au niveau d'organismes entiers qui fournit la preuve d'une exposition et / ou des effets d'un ou plusieurs polluant chimique (et / ou rayonnement)" (**Fossi et Leonzio, 1993**). Pour compléter cette définition, **Van der Oost, (2003)** a proposé plusieurs critères pour évaluer la force et la faiblesse des biomarqueurs candidats (**Stegeman et al., 1992**):

- Les analyses de biomarqueurs doivent être fiables, relativement bon marché et faciles à réaliser. En outre, les méthodes non invasives ou non destructrices devraient être choisies de préférence pour faciliter la biosurveillance environnementale des espèces protégées ou menacées d'extinction (**Fossi et Marsili, 1997**) ;
- La réponse des biomarqueurs doit être sensible à l'exposition et / ou aux effets du xénobiotique pour servir de paramètre d'alerte précoce. De plus, les profils de réponse temporelle des biomarqueurs après exposition à des produits chimiques devraient également être connus pour une meilleure compréhension des résultats des biomarqueurs (**Wu et al., 2005**) ;
- Les impacts des facteurs de confusion sur les données de base et les réponses des biomarqueurs doivent être bien établis afin de faire la distinction entre la variabilité naturelle et le stress induit par la pollution. À cette fin, la biologie et la physiologie d'organismes sélectionnés devraient être connues pour minimiser les sources de variation (par exemple, l'âge, le sexe et l'état de reproduction) ;
- Les mécanismes soutenant les relations entre les réponses biologiques utilisées comme biomarqueurs et l'exposition aux polluants devraient être définis, et les relations entre les réponses des biomarqueurs et les impacts sur les organismes devraient être clarifiées.

Plusieurs biomarqueurs de base sont décrits dans la littérature scientifique (**Pampanin et al., 2005**) et certains d'entre eux peuvent être utilisés pour évaluer la qualité du milieu aquatique. Cependant, en raison du grand nombre de polluants rencontrés dans le milieu aquatique et des divers effets de ces polluants, aucun biomarqueur ne peut déterminer de manière équivoque la dégradation de l'environnement. Par conséquent, l'application d'un ensemble de biomarqueurs basés sur des mesures de paramètres complémentaires semble être un moyen précieux de différencier les sites propres des sites pollués ou de décrire avec précision les effets de la contamination sur les organismes (**Sanchez et al., 2007**).

3.4.1 Classes de biomarqueurs et leur application aux écosystèmes aquatiques

Les biomarqueurs ont été classés selon la mesure dans laquelle ils reflètent une exposition à des facteurs de stress environnementaux ou des effets néfastes sur la santé résultant d'expositions à des contaminants. Certains biomarqueurs peuvent également indiquer une sensibilité aux effets indésirables des contaminants environnementaux, bien que ceux-ci n'aient pas été développés ou incorporés dans les cadres d'évaluation écologique en raison du fait qu'ils reposent largement sur des bases de données génétiques bien définies et l'incorporation d'études épidémiologiques, c'est dans les perspectives d'avenir que ces branches seront développées dans le domaine de la toxicologie aquatique. Cependant, les biomarqueurs qui reflètent à la fois l'exposition et l'effet biologique du rasage ont été largement incorporés dans les études sur le terrain et en laboratoire (Tab. 3), bien que les exemples soient peu nombreux (**Taylor et Maher, 2010**).

3.4.1.1 Biomarqueurs d'exposition

Les biomarqueurs d'exposition à des contaminants uniques ou multiples avec des modes d'action similaires (Tab. 3) peuvent montrer une réponse précoce aux contaminants et sont typiquement d'une classe spécifique, comme c'est le cas des composés biliaires fluorescents aromatiques (CFA) pour l'exposition à l'huile, ou l'induction du précurseur du jaune d'œuf, protéine vitellogénine (vtg) pour les œstrogènes environnementaux (**Broeg et al., 2005**).

L'un des biomarqueurs les plus courants dans cette catégorie est la mesure de l'induction d'un cytochrome P450 1A (c.-à-d., CYP1A) aux niveaux de l'ARN messager, des protéines ou de l'activité catalytique, en tant que biomarqueurs de l'exposition aux composants du pétrole (**Lee et Anderson, 2005**). De plus, la présence de certains métabolites d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) excrétés dans la bile des poissons (par exemple, les CFA biliaires) a également été utilisée avec succès pour suivre les effets spatiaux temporels de la pollution par les hydrocarbures (**Aas et al., 2000**). Les biomarqueurs pétroliers sont particulièrement importants car certains composants du pétrole peuvent être rapidement métabolisés dans les organismes aquatiques (**Whyte et al., 2000**) ou subir une dégradation environnementale. Cependant, les élévations des indices d'exposition aux hydrocarbures tels que l'activité CYP1A n'ont pas été liées à des effets biologiques de plus haut niveau (**Lee et Anderson, 2005**). Par conséquent, les mesures de CYP1A ainsi que les CFA biliaires auraient le pouvoir le plus prédictif dans un contexte réglementaire lorsqu'elles

sont utilisées dans le cadre d'une série de biomarqueurs, y compris ceux discutés ci-dessous qui sont plus étroitement liés aux effets physiologiques et de niveau supérieur.

L'induction de la vtg chez les poissons mâles ou juvéniles est un biomarqueur couramment utilisé de l'exposition aux œstrogènes environnementaux (**Denslow et al., 2004**). Cette induction peut être mesurée à la fois au niveau de la protéine (**Johnson et al., 2008**) et au niveau de l'ARNm (**Roy et al., 2003**). L'augmentation des niveaux de vtg a été liée aux produits pharmaceutiques dans les eaux usées (**Roy et al., 2003**), à l'impact anthropique global (**Johnson et al., 2008**), ainsi qu'aux phytoestrogènes dans effluents des usines de pâtes et papiers (**Denslow et al., 2004**)

La métallothionéine (MT) joue un rôle connu dans les processus physiologiques de routine impliquant les métaux essentiels et dans la détoxification des métaux non essentiels tels que le Cd (**Amiard et al., 2006**). Différentes isoformes de MT peuvent également être sensibles au stress oxydatif (**Hook et al., 2006**). Il a été démontré que les niveaux d'ARNm de MT chez les poissons varient le long d'un gradient de contamination (**Tom et al., 1998**) et sont également en corrélation avec les métaux biodisponibles dans les poissons en cage le long des gradients de contamination (**Chesman et al., 2007**).

L'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) a longtemps été utilisée comme biomarqueur pour l'exposition aux pesticides carbamates et organophosphorés, ainsi que pour les effets de ces pesticides chez les poissons et les invertébrés (**Klumpp et al., 2002**), bien qu'elle ne soit pas toujours aussi efficace un biomarqueur pour les mollusques en raison de comportements d'évitement (**Cooper et Bidwell, 2006**). L'inhibition AChE est un biomarqueur rare et à certains égards idéal car il indique à la fois l'exposition et les effets. L'inhibition peut être liée à la fois à une diminution de l'endurance à la nage et de la survie, bien que les relations exactes entre ces liens tendent à être spécifiques à l'espèce (**Fulton et Key, 2001**).

3.4.1.2 Biomarqueurs d'effets

Des exemples de biomarqueurs d'effets, c'est-à-dire des indicateurs de changements physiologiques ou biochimiques à la suite d'une exposition, sont énumérés dans le tableau 3. Ces indices peuvent être des mesures directes (p. ex. Dommages à l'ADN, inhibition de l'AChE) ou des mesures indirectes telles que l'impact sur les cellules subcellulaires. Théoriquement, un organisme avec un changement quantitatif d'un biomarqueur d'effet subira

une certaine perte de forme. Cependant, ces associations peuvent être difficiles à démontrer quantitativement.

Malgré leurs avantages, un inconvénient majeur des biomarqueurs d'effets est que très peu d'entre eux peuvent être directement liés à des expositions à des classes spécifiques de produits chimiques. Cependant, il existe quelques exceptions notables, notamment l'activité AChE, ainsi que la présence d'adduits HAP-ADN (Tab. 3). Cependant, les biomarqueurs d'effets peuvent être efficacement incorporés avec d'autres marqueurs diagnostiques de la santé des espèces aquatiques et aussi avec des approches de chimie analytique pour fournir des preuves des contributions des expositions chimiques.

Les biomarqueurs du stress oxydatif représentent une sous-classe unique de biomarqueurs d'effets qui ont été appliqués de manière incohérente dans les études aquatiques. Le stress oxydatif fait partie du processus de vieillissement et se produit chez tous les organismes vivants lorsque les espèces réactives à l'oxygène (ou leurs sous-produits) causent des lésions cellulaires et tissulaires (**Kelly et al., 1998**). Il est bien admis que l'exposition à une large gamme de produits chimiques environnementaux, y compris les pesticides, les métaux et les HAP, augmente le niveau de stress oxydatif cellulaire chez les organismes aquatiques (**Taylor et Maher, 2010**). Les organismes aquatiques contiennent un complément complet d'enzymes antioxydantes qui comprennent des défenses antioxydantes, y compris des composants enzymatiques (par exemple, la superoxyde dismutase [SOD], la catalase et les peroxydases de glutathion) ainsi que des antioxydants à petites molécules (par exemple, le glutathion). Parce que les défenses antioxydantes peuvent être quantitativement modifiées lors de l'exposition aux contaminants, cela a conduit à leur exploitation comme biomarqueurs sur le terrain (**Farombi et al., 2007**). Une rupture des procédures de désintoxication des antioxydants avec des effets potentiels d'ordre supérieur a également été observée pour les métaux chez les bivalves (**Taylor et Maher, 2010**).

Étant donné que la réponse de l'organisme peut être à la fois spécifique au xénobiotique et aussi aux tissus, il est également important d'examiner plusieurs paramètres liés au stress oxydatif dans différents tissus.

Les enzymes antioxydantes protectrices et leurs cofacteurs non enzymatiques (par exemple, le GSH) peuvent être submergés lors de niveaux élevés de stress oxydatif tissulaire, ce qui peut conduire à l'accumulation de sous-produits métaboliques reflétant des dommages oxydatifs. Ces sous-produits métaboliques comprennent des pigments oxydés tels que la lipofuscine, les membranes cellulaires peroxydées et les produits de dégradation de la membrane qui en résultent (c'est-à-dire les peroxydes lipidiques, le malondialdéhyde) ainsi

que l'ADN oxydatif et les dommages aux protéines. Ces produits secondaires des dommages oxydatifs peuvent initialement compromettre la capacité de l'organisme à maintenir des processus métaboliques normaux, et sous stress oxydatif chronique, aux états pathologiques mentionnés ci-dessus. La peroxydation lipidique, en particulier, a été régulièrement mesurée dans des études sur le terrain pour refléter les dommages oxydatifs induits par les produits chimiques.

Il est important de noter qu'il existe des différences quantitatives dans les niveaux normaux de ces antioxydants, ainsi que dans leurs capacités d'induction parmi les diverses espèces aquatiques (**Kelly et al., 1998**). Par conséquent, les biomarqueurs du stress oxydatif doivent être soigneusement validés dans des conditions de laboratoire contrôlées avant d'être expérimentés sur le terrain. De plus, ces paramètres sont significativement affectés par l'état nutritionnel, l'âge et d'autres facteurs non chimiques

Un autre biomarqueur d'effets couramment utilisé est la mesure de l'intégrité et de la stabilité des membranes lysosomales détectées par l'absorption et la rétention d'un colorant cationique, neutre. Des relations dose-réponse ont été trouvées pour une gamme de contaminants aquatiques, y compris les métaux et les matières organiques (**Moore et al., 2013**). La stabilité lysosomale a été positivement corrélée avec les possibilités de croissance, le rendement reproductif, la génotoxicité, la capacité totale de piégeage oxyradique et la synthèse des protéines et peut être considérée comme écologiquement pertinente (**Ringwood et al., 2004**).

La génotoxicité est un autre effet important qui est couramment mesuré à l'aide de biomarqueurs. Dans une lagune eutrophique de la côte italienne, (**Frenzilli et al., 2001**) ont montré chez les moules que l'intégrité de l'ADN (mesurée par les ruptures de brins avec le test Comètes) était inversement corrélée à la capacité totale de piégeage oxyradique. Un gradient spatial et temporel a été mesuré, les moules étaient affectées dans les régions où la qualité de l'eau était mauvaise, notamment en été. Les deux paramètres étaient corrélés à une perte de biodiversité dans la zone (**Frenzilli et al., 2001**). Les dommages à l'ADN (mesurés à l'aide du test des comètes) se sont également révélés corrélés aux concentrations de contaminants piégés dans les sédiments et dans les moules prélevées dans le port de San Diego (**Steinert et al., 1998**). Les dommages à l'ADN peuvent également être mesurés directement à l'aide d'adduits à l'ADN.

3.4.1.3 Biomarqueurs transcriptomiques qui intègrent l'exposition et les effets

L'incorporation de biomarqueurs transcriptomiques, ou activés par le génome, est de plus en plus reconnue comme une approche puissante qui peut fournir des informations à la fois sur l'exposition et les voies de la blessure (c'est-à-dire, les effets biologiques), et ainsi fournir un pont entre l'exposition et les effets. Les approches génomiques sont largement acceptées dans le contexte de la génération de biomarqueurs (**Hook, 2010**). Cependant, ces approches transcriptionnelles doivent être validées avec une ancre phénotypique, c'est-à-dire des effets clairement définis et mesurables aux niveaux des organes, des tissus ou physiologiques. Par exemple, chez les mammifères, le profilage du transcriptome de tissu entier a été utilisé efficacement pour dépister les effets indésirables associés à la toxicité des médicaments et des produits chimiques (**Martin et al., 2006**). Les approches par microréseau peuvent être particulièrement utiles pour déterminer les contributions de diverses classes de contaminants environnementaux à la toxicité sublétales dans des scénarios de mélange (**Hook et al., 2014**).

De plus en plus, le profilage de l'expression génique basé sur des puces à ADN, ou d'autres méthodologies qui mesurent l'expression génique globale, sont utilisés comme outils de «découverte» pour caractériser la réponse dans les études expérimentales en laboratoire et in-situ. Ces techniques de profilage ont l'avantage de pouvoir être utilisées lorsque les facteurs de stress sont inconnus et de pouvoir identifier l'agent causal du déclin de la santé de l'organisme, car tous les résultats sur le terrain peuvent être comparés aux résultats d'études contrôlées en laboratoire. Ils sont également intrinsèquement multivariés, en ce que les niveaux de transcription des biomarqueurs peuvent être évalués simultanément avec les transcriptions pour les produits géniques plus étroitement associés à la forme physique. L'inconvénient de ces techniques est que l'interprétation des données peut être difficile, d'autant plus que le niveau sans effet transcriptionnel observable est souvent bien en dessous des concentrations auxquelles les effets toxiques sont observés (**Poynton et Vulpe, 2009**), et l'annotation de nombreux génomes est incomplète. **Van Straalen et Feder (2012)** ont considéré la transcriptomique comme un «super-biomarqueur» en raison de la richesse des informations générées, mais ont noté la difficulté actuelle à relier les expressions génétiques mesurées à des effets écologiquement pertinents.

Tableau 3. Exemples de biomarqueurs utilisés pour évaluer les contaminants aquatiques

Catégorie	Mesure et indication	Les références
Biomarqueurs d'exposition		
CFA biliaires	Métabolites des aromatiques polycycliques hydrocarbures mesurés dans la bile des poissons, peut refléter une exposition à l'huile	Myers et al. (1991, 1994)
ARNm ou protéine du cytochrome P4501A	Une isoforme inductible du cytochrome p450 famille mesurée dans divers tissus de poissons et bivalves exposés à l'huile et à d'autres produits chimiques qui sont des agonistes des récepteurs Ah	Roberts et al. (2006)
EROD, arylhydrocarbon hydroxylase	Activités catalytiques de l'enzyme CYP1A décrites dessus	Martinez-Gomez et al. (2009)
Vitellogénine (vtg)	Protéine précurseur du jaune d'œuf induite surexposition à une large gamme de composés	Denslow et al. (2004)
Métallothionéines	Protéines de liaison aux métaux induites exposition à certains métaux (Cd, Hg)	Sakuragui et al. (2013); Williams et Gallagher (2013)
Biomarqueurs d'effets biologiques		
Protéines de choc thermique (exp : HSP 90)	Protéines induites dans les tissus des organismes aquatiques comme réponse généralisée à le stress, y compris l'exposition aux produits chimiques, hypoxie et température	Downs et al. (2006)
Marqueurs du stress oxydatif (hème oxygénase, superoxyde dismutase, glutathion, catalase, peroxydation lipidique)	Enzymes, cofacteurs des produits métaboliques qui peut être quantitativement modifié lors de l'exposition aux polluants. Le stress oxydatif est une réponse au niveau cellulaire et tissulaire à une variété des contaminants et des facteurs de stress non chimiques	Patil et David (2013); Pereira et al. (2013); Williams et Gallagher (2013)
Marqueurs de la stabilité de la membrane lysosomale	Organites subcellulaires contenant de l'hydrolytique enzymes sensibles à la toxicité entraînant à la rupture et aux fuites de membrane (métaux)	Ringwood et al. (2004); Edge et al. (2012)
Indices de condition (indice hépatosomatique, indices gonadiques)	Diminution du poids de l'organe par rapport à l'ensemble le poids corporel peut refléter la toxicité des organes ou maladie	Johnson et al. (2008); Blazer et al. (2012)
Niveaux d'hormones circulantes	Les niveaux d'hormones circulantes peuvent être utilisés pour mesurer la sexualité et le comportement de la reproduction	Blazer et al. (2012)
Mesures des dommages à l'ADN (induction d'ADN réparation des enzymes, présence de HAP- adduits à l'ADN)	Les dommages à l'ADN sont le reflet de l'exposition et effets génotoxiques	Balk et al. (2011)
Niveaux de triglycérides, IGF1	Les taux de lipides (tels que les triglycérides) et des hormones de croissance (telles que l'IGF1) peuvent être utilisées en tant que métrique des réserves énergétiques des animaux	Balk et al. (2011)
Biomarqueurs qui intègrent à la fois les expositions chimiques et les effets biologiques		
AChE	Une enzyme qui hydrolyse les neurotransmetteurs qui est inhibée par l'exposition au carbamate et pesticides organophosphorés	Laetz et al. (2009)
Transcriptome tissulaire	Microarray et séquençage d'ARN de transcriptome tissulaire peut identifier les voies cellulaires perturbé par les produits chimiques et les facteurs environnementaux de stress	Connon et al. (2012); Uren Webster et al. (2013)

AChE = acétylcholinestérase; EROD = éthoxyrésorufin-o-déséthylase; CAF = composés aromatiques fluorescents; vtg = vitellogénine.

3.5 Approche multi-biomarqueurs

Aucun biomarqueur ne peut à lui seul prendre en compte la diversité des contaminants et à la multiplicité de leurs effets sur les organismes. Ainsi, la mise en œuvre d'un ensemble cohérent de biomarqueurs s'est rapidement imposée afin d'établir un diagnostic exhaustif de l'état de perturbation des organismes au sein de leur environnement (**Galloway et al., 2004**). Chaque biomarqueur constitutif de la batterie apporte dans une information en lien avec sa spécificité. Une sélection à priori des biomarqueurs doit être opérée afin d'éviter la redondance entre les biomarqueurs mis en œuvre et par la même, de diminuer les coûts des études. Ce travail de sélection doit alors s'appuyer sur la connaissance des réponses des biomarqueurs. De plus, en fonction des objectifs des études, une sélection basée sur la spécificité des biomarqueurs doit être opérée (**Sanchez, 2007**).

3.6 Choix des biomarqueurs

3.6.1 Glutathion réduit (GSH)

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 qui grâce à son groupement thiol de la cystéine joue un rôle capital 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**).

Le GSH a la capacité de réduction et constitue 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 (**Pierce et 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 (**Addams et al., 1983**).

La fonction antioxydante du GSH est illustrée par la figure 5. Le peroxyde d'hydrogène, résultant d'un métabolisme aérobie, peut être métabolisé par la GSH-peroxydase dans le cytosol et la mitochondrie et par la catalase dans le peroxysome. Le GSSG formé est réduit en GSH par la GSSG réductase aux dépens du NADPH, formant ainsi un

cycle redox. Les peroxydes organiques (ROOH) peuvent être réduits par la GSH peroxydase ou la GSH S-transférase. En cas de stress oxydatif grave, la capacité de la cellule à réduire le GSSG en GSH peut être dépassée, entraînant une accumulation de GSSG. Pour éviter une modification de l'équilibre redox, le GSSG peut soit être activement transporté hors de la cellule, soit réagir avec une protéine sulfhydryle (PSH) pour former un disulfure mixte (PSSG) (Shelly et Lu, 2009).

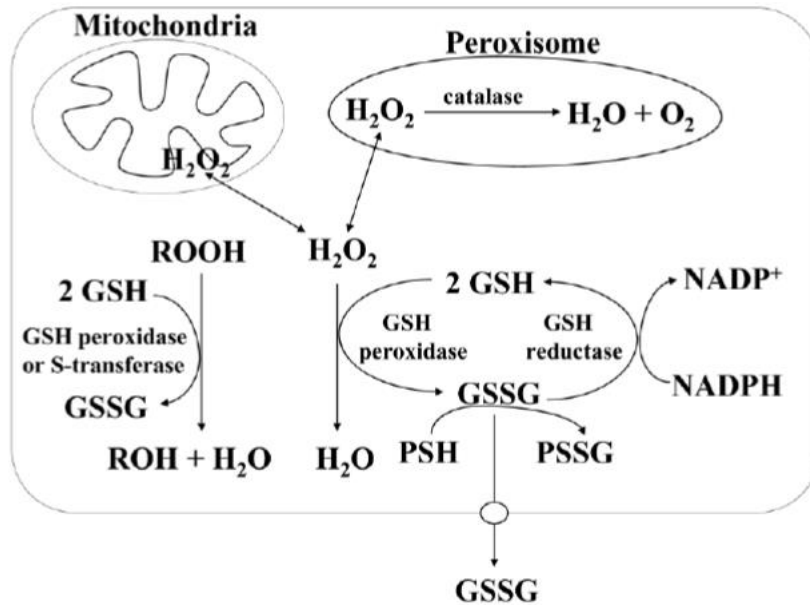


Figure 5. Fonction antioxydante du GSH (Shelly et Lu, 2009).

3.6.2 Glutathion S-transférase (GST)

Les glutathion-S transférases (GST) représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques, impliquées dans des opérations diverses de transport et de biosynthèse intracellulaires (George, 1990). Toutefois, la fonction des GST la plus étudiée, concernant les programmes de suivi environnementaux, demeure leur activité de catalyse des réactions de conjugaison entre des groupements hydrophiles endogènes (glutathion), et des molécules réactives comportant des sites électrophiles, capables de réagir avec des macromolécules comme les acides nucléiques (ARN, ADN). A ce titre, les GST font partie des mécanismes de défense des cellules contre des stress chimiques et sont qualifiées d'enzymes de phase II parce qu'elles interviennent généralement à la suite des enzymes de phase I (cytochrome P450) qui oxydent les xénobiotiques les rendant parfois plus actif biologiquement (ex HAPs). La phase de conjugaison concerne aussi bien des molécules endogènes que des xénobiotiques comme les PCBs, les HAPs et les pesticides (Aarab, 2004).

Les GST ont été mises en évidence chez la plupart des êtres vivants tels que la levure (Foley et Sheehan, 1998), les mollusques (Blanchette et Singh, 1999), les crustacés (Le Blanc et Cochrane, 1987), les poissons (Martinez- Lara *et al.*, 1997; Perez-Lopez *et al.*, 2000), les mammifères (Habig *et al.*, 1974; Kamisaka *et al.*, 1975) et les plantes (Hong *et al.*, 1999). Leur intérêt est alors exploité en écotoxicologie environnementale dans de nombreuses études, tant qu'enzyme témoin d'un stress oxydant ou de présence de contamination organique dans le milieu de vie, notamment chez les organismes aquatiques.

3.6.3 Catalase (CAT)

La catalase est une enzyme tétramérique, chaque unité portant un groupement prosthétique (hème) et une molécule de NADPH. Cette enzyme est présente chez tous les organismes aérobies. Chez les Eucaryotes, elle est principalement située dans le cytosol et dans les peroxysomes où elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Cossu *et al.*, 1997). Le H₂O₂ est un précurseur du radical hydroxyle, et est une espèce réactive à l'oxygène (ROS) qui induit des dommages d'ADN (Baumard *et al.*, 1999; Halliwell et Gutteridge, 1999). Au regard de son mode d'action et de sa localisation peroxysomale, la catalase est décrite comme complémentaire de la GPx dans l'élimination du H₂O₂ et la protection contre la peroxydation lipidique. La catalase est sensible à certains contaminants inducteurs de stress oxydatif au niveau des membranes cellulaires, comme les HAPs, les PCBs et certains pesticides (Solé *et al.*, 1995). L'activité catalase est largement étudiée chez les différents taxons zoologiques (mollusques, insectes, mammifères...) comme un marqueur de stress oxydatif. Elle varie selon l'espèce, les saisons, les conditions abiotiques et la présence de xénobiotiques (Labrot *et al.*, 1996; Dellali *et al.*, 2001).

3.6.4 Acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholinestérase est une enzyme impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux. Elle catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique (Matozzo *et al.*, 2005). Dans les jonctions neuromusculaires et interneurales, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui va permettre la transmission de l'influx nerveux. Lors d'une stimulation nerveuse, l'acétylcholine libérée des terminaisons nerveuses dans l'espace synaptique, active les récepteurs cholinergiques post synaptiques.

L'interaction de l'acétylcholine avec le récepteur provoque une dépolarisation de la membrane post-synaptique, générant ainsi un potentiel d'action qui assure la transmission du signal nerveux. L'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase, permet au système de revenir à son état de repos (Bocquené *et al.*, 1997). L'inhibition de l'AChE par de

nombreux neurotoxiques entraîne l'accumulation de l'acétylcholine 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 de l'organisme (**Matozzo et al., 2005**). La mesure de l'inhibition de cette activité enzymatique constitue un marqueur dont l'expression traduit spécifiquement l'exposition des organismes à différents contaminants et notamment certains produits phytosanitaires. L'AChE constitue en effet la cible privilégiée de certains insecticides (organophosphorés, carbamates), herbicides (triazines, paraquat) et autres molécules neurotoxiques (incluant les métaux lourds). Surtout utilisée en milieu marin (**Galgani et Bocquené, 1990**), l'inhibition de l'activité de l'AChE s'est également révélée intéressante dans le cadre d'étude de la qualité des milieux aquatiques continentaux (**Payne et al., 1996**).

L'activité de l'AChE peut également être modulée par la température du milieu, et certains facteurs intrinsèques, tels que la taille des organismes (**Flammarion et al., 2002**). Enfin, l'inhibition de l'AChE peut être réversible (particulièrement pour les AChE cérébrales affectées par les carbamates) et dans ces conditions, seules les diminutions importantes d'activité acétylcholinestérasique peuvent être décelées. Sur le terrain, les échantillons doivent être obtenus de manière synchrone sur une période de temps n'excédant pas quelques jours et dans des conditions climatiques comparables afin de garantir la représentativité des mesures des activités cholinestérasiques effectuées (**Bocquené et al., 1997**).

3.6.5 Malonedialdéhyde (MDA)

Le MDA est une expression de la lipoperoxydation (**Pompella et al., 1987**). L'utilisation de ce composé comme biomarqueur de stress oxydatif en général, et en peroxydation lipidique en particulier, est largement répandu. Le MDA est un produit des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés (de la famille n-6) par des espèces réactives de l'oxygène générées dans certaines conditions de stress, en particulier avec des contaminants organiques (HAP, PCB, pesticides) et inorganiques (métaux de transition). Les hydroperoxydes ainsi formés se décomposent en intermédiaires radicalaires et en aldéhydes dont un des représentants les plus réactifs est le malonedialdéhyde (MDA). Le MDA est un agent alkylant puissant capable de réagir avec les macromolécules biologiques. Le dosage de ce composé présente donc un intérêt certain chez les animaux soumis à des contaminations multiples (**Pellerin- Massicotte, 1994**), comme c'est le cas chez les moules *M. galloprovincialis* et *M. edulis* après une semaine d'exposition au cuivre (**Viarengo et al., 1989**).

4 Présentation du modèle biologique : *Perna perna*

Les moules brunes des eaux chaudes, du genre *Perna*, ont suscité un grand intérêt tant pour la culture et la consommation que pour la recherche. Ces moules, ayant une vitesse de croissance rapide, se développent rapidement dans leur habitat naturel et atteignent la taille commerciale de 60-80 mm en 6-7 mois. De plus, les œufs et les larves de ces moules sont relativement résistants et bien adaptés aux conditions des régions tropicales et subtropicales.

4.1 Position systématique

- Embranchement : Mollusques
- Classe : Bivalves
- Sous-classe : Ptériomorphia (Beurlen, 1944)
- Ordre : Mytiloida (Ferussac, 1822)
- Famille : Mytilidae (Rafinesque, 1815)
- Genre : *Perna* (Philipsson, 1788)
- Espèce : *Perna perna* (Linnaeus, 1758).

4.2 Synonymie

Plusieurs autres noms scientifiques sont attribués à cette espèce, comme : *Perna mya*, *Mytilus pictus* (1780), *Mytilus africanus* (Chemnitz, 1785), *Mytilus afer* (Gmelin, 1791), *Mytilus elongatus* (Lamarck, 1817), *Mytilus perna*, *Chloromya perna*, *Mytilus venezolanus* (Andreu, 1965), *Perna picta* (Born, 1780), *Kuriakose indicata* et *Perna nair*.

4.3 Critères de diagnose

Perna perna est un bivalve relativement allongé qui se développe normalement dans les régions tropicales et subtropicales. Le meilleur caractère de diagnose de cette espèce est la cicatrice divisée du muscle rétracteur postérieur. Elle est également souvent reconnaissable extérieurement grâce à sa couleur brune (Schurink et Griffiths, 1990). La coquille de *P. perna* est mince autour des bords et s'épaissit postérieurement (Salaya, 1973).

Chez les individus adultes, la coquille de forme oblongue, trigone et solide mesure 80 à 150 mm de largeur et 35 à 45 mm de hauteur. Son sommet antérieur est pointu et sa région postérieure est arrondie. Le bord dorsal de la coquille est très légèrement arqué alors que le

bord ventral est long et droit. On note la présence de stries d'accroissement sur la coquille (Fig. 6 et 7).



Figure 6. Morphologie externe de la moule *Perna perna*.

L'intérieur de la coquille est d'une coloration blanche nacré plus ou moins violacée. Le périostracum y est brun-fauve avec, souvent, des lignes onduleuses vertes. Les muscles rétracteurs du pied et ceux du byssus forment une empreinte médio-dorsale sur la coquille. Le muscle rétracteur postérieur du byssus a une empreinte plus visible que celle du muscle adducteur postérieur. La charnière est formée par trois ou quatre petites dents. On note également l'absence d'un muscle adducteur antérieur (**Pasteur-Humbert, 1962**).



Figure 7. Aspect interne de la moule *Perna perna*.

4.4 Répartition géographique

La moule brune est largement distribuée en Méditerranée (côtes de l'Afrique du Nord, de Gibraltar au golfe de Tunis) et dans les régions tropicales et subtropicales de l'océan Atlantique (Siddall, 1980), en Afrique de l'Ouest (Maroc, Mauritanie, Sénégal...) et le long des côtes Est de l'Amérique du Sud.

En Afrique, *P. perna* est présente du Mozambique au Cap. Elle est rare le long de la côte occidentale du Cap, puis réapparaît dans le Nord de Namibia-Dido (Schurink et Griffiths, 1991). Des nombreux moulières de cette espèce sont signalées sur les côtes méditerranéennes d'Algérie (Abada, 1983), du Maroc (Chraïbi, 2000) et de la Tunisie (Zaouali, 1973).

Des espèces de moules brunes non indigènes se présentent sur une grande partie des côtes du Texas, dans le golfe du Mexique (Hicks *et al.*, 1993). Dans cette dernière, ces moules brunes ont colonisé jusqu'à une profondeur de 9 m, les plates-formes pétrolières (Hicks et Tunnell, 1995). La dispersion au sud, de cette espèce envahissante, est probablement liée aux courants côtiers, ce qui pourrait expliquer la présence de colonies de moules brunes dans le canal de Brazos Santiago (Davenport, 1993).

4.5 Cycle de reproduction

Le cycle de reproduction de *P. perna* est étendu sur toute l'année avec trois périodes caractéristiques de ponte : deux facultatives (hivernale et estivale) et une principale (printanière). Les séquences de son cycle sexuel sont synchrones avec ceux des moules *Mytilus* d'une même station. L'effort de reproduction augmente avec la taille indépendamment de la station et de la saison. Le recrutement a lieu durant toute l'année avec une intensité plus forte juste après les périodes de ponte. Dans les sites pollués, le cycle de reproduction des moules connaît un déphasage des activités génitales et l'effort de reproduction est plus important (Idhalla *et al.*, 1997).

Le cycle sexuel comporte 7 stades (classification de Lubet, (1959) reprise par Wilson et Seed, (1974)) :

- *Stade 0* : Repos sexuel.
- *Stade I* : Reprise de l'activité génitale.
- *Stade II* : Gamétogenèse.
- *Stade IIIA* : Maturité génitale.
- *Stade IIIB* : Emission des gamètes.
- *Stade IIIC* : Restauration de la gonade.

- *Stade III* : Arrêt de l'activité génitale et reconstitution des réserves.

4.6 Régime alimentaire

Les mytilidés appartenant aux genres *Perna* et *Mytilus* font partie de l'Ordre des Filibranches c'est à dire des Bivalves caractérisés par des branchies constituées de filaments réfléchis et unis par des touffes de cils. Ce sont des organismes filtreurs, très bons «bioindicateurs», la filtration de l'eau de mer se faisant à une vitesse définie comme étant le volume d'eau exprimé en litre « épuré » à 100 % par heure. Cependant, le volume d'eau filtré varie en fonction de son état physiologique (âge) et des facteurs environnementaux (température de l'eau, salinité, éclaircissement, matières en suspensions, etc.). On estime néanmoins que le volume filtré par une moule serait de l'ordre de 1,8 litre/heure. Ce pouvoir de filtration fait que ces organismes absorbent régulièrement de grandes quantités de polluants chimiques particulièrement des métaux lourds et des hydrocarbures. Cette capacité de bio-accumulation fait des moules d'excellents indicateurs de pollution (bio-indicateurs) et le suivi annuel de moulières naturelles entre dans le cadre d'études de « monitoring ».

4.7 Rôle écotoxicologique

Les mollusques bivalves constituent un matériel biologique idéal pour diagnostiquer, par analyse des métaux lourds, toute forme de pollution des eaux côtières (PNUE / FAO / COI- AIEA, 1994). De ce fait, les Mytilidés sont considérés, du fait de leur mode de vie fixé et sédentaire, comme des espèces « sentinelles » fiables dans les études de monitoring. Selon **Serbanescu et al. (1980)**, les mollusques possèdent un mécanisme de filtration très perfectionné leur permettant de filtrer quotidiennement de grandes quantités d'eau de mer en retenant les particules en suspension et donc d'accumuler les ions métalliques. Pour **Regoli et Orlando (1994)**, les moules sont capables de tolérer des concentrations très élevées en métaux lourds toxiques.

D'après certains auteurs (**Phillips, 1976; Ozdemir et al., 1998; Sabhi, 1997**), la bio-accumulation en métaux dépend du métabolisme, du cycle de reproduction et des relations avec les paramètres environnementaux tels que la salinité, la température, le mouvement des marées, le courant marin et la pollution qui diffèrent sur les côtes atlantiques et méditerranéennes.

5 Présentation du golfe d'Annaba

Le golfe d'Annaba se situe à l'extrême Est des côtes Algériennes, limité à l'Est par le cap Rosa (8° 15' Est et 36° 58' Nord) et à l'Ouest par le cap de Garde (7° 47' Est et 36° 58' Nord), soit un linéaire à vol d'oiseau d'environ 65 km (**Derbal, 2007**). Selon **Vaissière et**

Fredj (1963), le plateau continental est généralement étroit avec un fond accidenté. Il est nettement restreint au Nord du cap de Garde, puis s'élargit dans le golfe jusqu'à 27 km pour se rétrécit ensuite légèrement au voisinage du cap Rosa. Globalement, le fond débute à l'Ouest par du sable fin auquel succède une ceinture d'herbiers à *Posidonia oceanica* installée généralement sur un substrat dur et souvent entrecoupé par des zones sableuses (**Pergent et al., 1993**).

Le golfe est battu par des vents Nord à Nord-Ouest de la fin de l'automne jusqu'à la fin du printemps et par un vent d'Est en été. Le côté Sud-Ouest particulièrement exposé aux vents du Nord, est sujet à d'intenses transports et d'accumulations sédimentaires générés par l'action hydrodynamique. Selon l'étude du **LCHF (1976) cité par Derbal (2007)**, le mouvement hydrodynamique est généralement de faible amplitude, à l'entrée de la baie d'Annaba on retrouve un mouvement hydrodynamique permanent d'orientation 100° - 120°. Au Sud du cap de Garde, le courant se dirige vers l'Est aux environs de l'oued El-Mafrag en diminuant d'intensité. Entre les deux caps limitant le golfe d'Annaba, les isobathes -10, - 20, - 30, - 40 et - 50 mètres sont assez éloignés les uns des autres au Sud du golfe et se rapprochent ensuite vers le Nord du cap de Garde. Ceux de - 50 et - 100 mètres sont très rapprochés et parallèles à la ligne du rivage (**Vaissière et Fredj, 1963**).

Le golfe reçoit les eaux douces par le biais de deux oueds : la Mafrag à l'Est et la Seybouse au Sud-Est, dont le débit est très irrégulier suivant les saisons (**Ounissi et al., 2014 ; Ziouch et al., 2020**). Ces oueds constituent une source importante d'ETMs dans le golfe d'Annaba (**Belabed et al., 2013 ; Boutabia-Trea et al., 2017**) en véhiculant des matières minérales et organiques de différentes origines terrigène, agricole, domestique et industrielle (**Khélifi-Touhami et al., 2006**). De plus la zone reçoit des eaux usées non traitées (**Abdenmour et al., 2000**) ainsi que d'autres rejets des effluents urbains (**Khammar, 2007**) et industriels de plusieurs usines installées sur la côte, en particulier les produits phytosanitaires de FERTIAL prêt de la rive au Sud du golfe (**Saker, 2007**). En outre, des rejets d'industries tels que ceux d'Arcelor Mittal (El Hadjar), et d'autres grands complexes industriels (site de production mécanique, cimenterie, sites de recyclage de batteries et usines de matériel métallique) déversent leur déchets dans le golfe (**Belabed et al., 2013**).

Chapitre II : Eléments Traces Métalliques

Chapitre II : Eléments Traces Métalliques

1 INTRODUCTION

Le milieu marin est généralement le réceptacle final de toute source de pollution d'origine industrielle (hydrocarbures, éléments traces métalliques, substances chimiques, etc.), agricole (nutriments, pesticides, etc.) et domestique (**Valavanidis et al., 2006**). Au cours des dernière décennies, les métaux traces étaient considérés comme les éléments les plus étudiés dans l'environnement marin (**Islam et al., 2015; Wang et al., 2015**) étant donné leur impact négatif ou positif sur les différents écosystèmes (**Bouzahouane et al., 2018**).

En effet, nombreux d'entre eux sont considérés essentiels (par exemple Fe, Cu, Zn) pour la composition biochimique des organismes vivants (**Martin F Soto-Jiménez, 2011**), bien qu'ils puissent être toxiques à des concentrations élevées (**USEPA, 2002**). En revanche, d'autres éléments, comme le Pb, Cd et le Hg sont extrêmement toxiques pour les organismes (**Vlahogianni et al., 2007; Martin F Soto-Jiménez, 2011**) puisqu'ils peuvent générer des dysfonctionnements physiologiques même à faible dose (**Jović et Stanković, 2014; EC, 2015**). Ces contaminants inorganiques persistants qui proviennent principalement des rejets de déchets industriels (**Tsangaris et al., 2012**) sont constamment insérés dans le milieu marin, créant ainsi une menace pour la stabilité des écosystèmes (**Gao et Chen, 2012; Maanan et al., 2015**). De plus, la bioamplification de ces contaminants à travers la chaîne trophique implique indirectement la santé humaine (**Rabaoui et al., 2014; Bastami et al., 2015**). À cet égard, l'évaluation de la pollution du milieu marin est désormais basée principalement sur des organismes marins appelés bioindicateurs.

Les bivalves, en particulier les moules sont les organismes les plus utilisées pour les études écotoxicologiques des milieux marins côtiers et estuariens à travers le monde (**Ciacci et al., 2012; Bolognesi et Cirillo, 2014**). Ces filtreurs sessiles cosmopolites sont devenus très populaires dans les programmes de surveillance depuis leur première utilisation officielle dans le fameux programme « Mussel Watch » proposé par Goldberg, E.D dans les années 70's (**Goldberg, 1980; Farrington et al., 2016**). Leur capacité à accumuler différents types de contaminants organiques et inorganiques dans leurs tissus, est l'un des principaux avantages qu'ils offrent en tant que bioindicateurs de pollution (**Benali et al., 2017; Beyer et al., 2017**). De plus, leur tolérance les rend des outils biologiques très appropriés pour différentes expériences sur le terrain (**Tsangaris et al., 2010; Fasulo et al., 2012**).

Plusieurs études ont démontré que les expériences biosurveillance active (ABM) sont parmi les approches modernes d'évaluation de la pollution les plus efficaces, dans lesquelles de nombreuses stations contaminées peuvent toutes être surveillées simultanément en utilisant des moules déployées provenant d'une seule population qui n'est exposée à aucune source directe de pollution (**Tsangaris et al., 2011; Schøyen et al., 2017**). Les données sur la bioaccumulation devraient être alors plus fiables, dont la plupart des facteurs biotiques confondants (sexe, âge, statut reproductif) et abiotiques (profondeur, saison, période) peuvent être contrôlés (**Capello et al., 2013**).

Le milieu marin peut être considéré comme l'un des plus fragiles et par conséquent, l'extension des activités urbaines le long des côtes Est Algériennes a accru la pollution marine, en particulier sur les côtes d'Annaba. Cette ville est l'une des villes les plus industrialisées. En effet, les principales industries en exploitation, telles que celles de production de fertilisants d'Algérie (FERTIAL) et le complexe sidérurgique d'Arcelor Mittal (ex. El Hadjar) et d'autres génèrent collectivement de nombreux déchets liquides et solides souvent chargés en polluants minéraux et organiques qui sont libérés dans le golfe sans traitement préalable (**Belabed et al., 2017**).

Contrairement à d'autres études sur les métaux traces (**Bensafia et Khati, 2018; Bouzahouane et al., 2018**), cette étude vise à évaluer la contamination du golfe d'Annaba par l'évaluation de quatre éléments traces métalliques (Cu, Zn, Pb et Cd) en utilisant pour la première fois la biosurveillance active ou l'ABM.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Choix et localisation des stations de transplantation

L'étude a été réalisée dans le golfe d'Annaba, une zone littorale, comprise entre le cap Rosa ($8^{\circ}15' E - 36^{\circ}38' N$) à l'Est et le cap de Garde à l'Ouest ($7^{\circ}16' E - 36^{\circ}68' N$). Ce secteur est considéré à vocation économique (activités industrielle, halieutique et tourisme).

La zone de transplantation a été délimitée en fonction des paramètres suivants : accessibilité aisée à la station, exposition à une source de pollution particulière et présence d'un support physique fixe pour l'installation des cages (Fig.8).

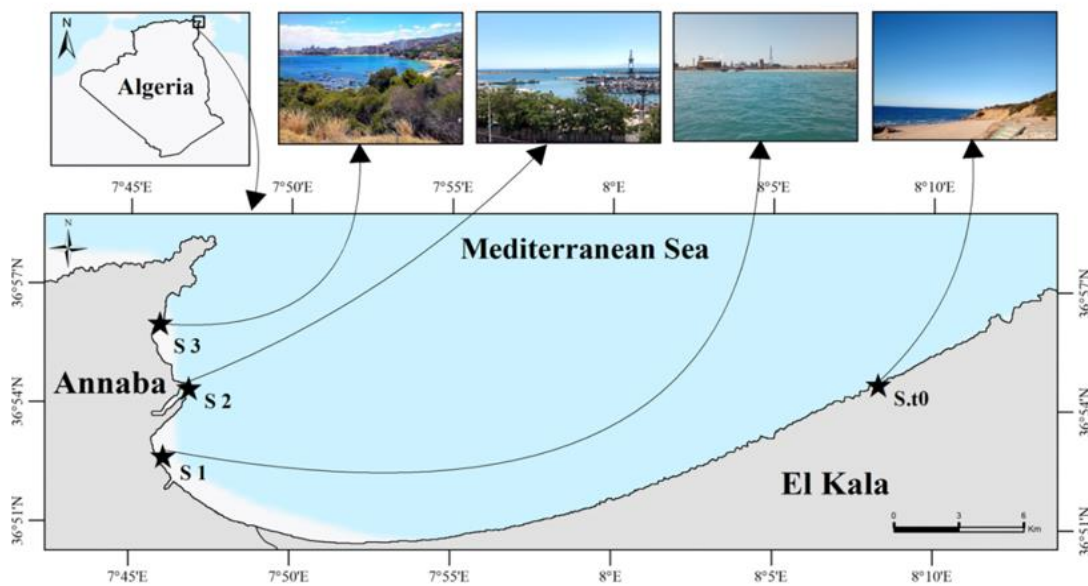


Figure 8. Carte géo-référenciée de la localisation des stations de contrôle dans le golfe d'Annaba.

En fonction de la proximité des sources de pollution (domestique et/ou industrielle), nous avons choisi les stations suivantes pour cette étude :

- **Station de prélèvement (S.t0) :** Plage Lahnaya ($36^{\circ} 54.615'N - 8^{\circ} 8.215'E$) est située à environ 30 km à l'Est d'Annaba entre le village de Berrihane et de Kantra El-Hamra et à 18 km à l'Est de l'oued El Mafragh. Elle est en périphérie du Parc National d'El Kala où les activités anthropiques sont interdites. De ce fait, la station est supposée éloignée de toute forme de pollution directe. De plus, elle est marquée par la présence d'une des plus grandes populations sauvages de moule *Perna perna* dans tout le golfe

d'Annaba. Par conséquent, elle a été choisie comme station de collecte des moules pour la transplantation. (Fig.9)



Figure 9. Lieu de prélèvement des échantillons de la moule *Perna perna* au niveau de la station Lahnaya. A- coté Est de la plage, B- coté Ouest de la plage (cliché : Laouati, 2017).

- **Station de contrôle 1 (S1) :** Joinoville ($36^{\circ} 52.659'N -7^{\circ} 46.054'E$) est la plage la plus large de toute la baie. Elle est située à 500 m à l'Ouest du port d'Annaba, et à 50 m du complexe FERTIAL. C'est également par cette plage que le fleuve Oued Seybouse rejoint la Méditerranée. Cette dernière reçoit donc, en permanence des quantités énormes d'eaux usées chargées de différents types de polluants, rejetée par voie directe du complexe industriel dans la plage, ou indirectement à travers l'Oued (Fig.10).



Figure 10. Lieu de transplantation des moules *Perna perna* au niveau de la station 1 Joinoville (cliché : Laouati, 2017).

- **Station de contrôle 2 (S2) :** Le port d'Annaba ($36^{\circ} 54.377'N - 7^{\circ} 46.842'E$) est une infrastructure multifonctionnelle composée de deux bassins principaux : le premier bassin (le plus grand) est destiné à l'accostage des navires de commerce et de transport, et tout navire de plus de 24 mètres. Le second bassin est en principe un port de pêche, mais vu l'absence d'un port de plaisance, il est utilisé par les bateaux de plaisance et de pêche artisanal, il est également utilisé par des clubs sportifs et aussi par les forces navales. Par conséquent, le port d'Annaba compte parmi les ports les plus pollués d'Algérie (Fig.11).

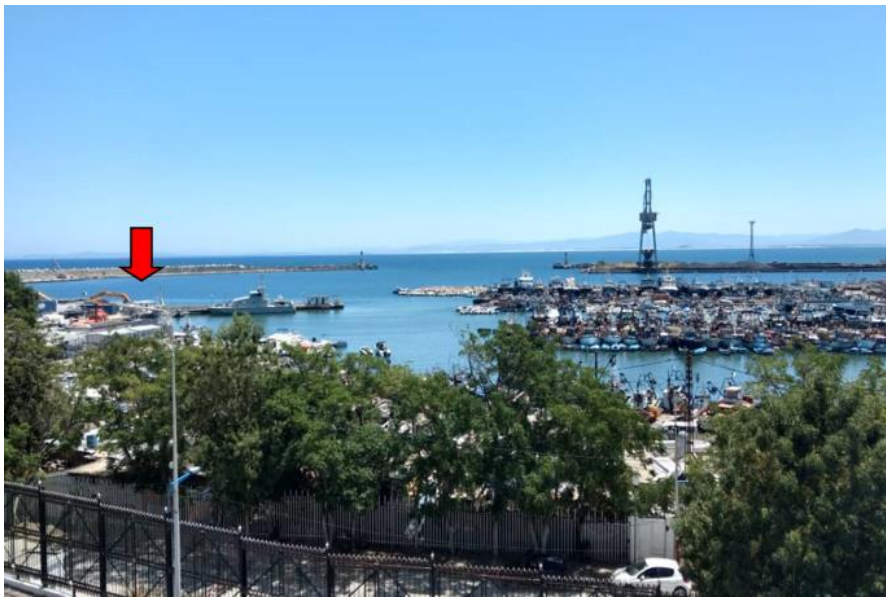


Figure 11. Lieu de transplantation des moules *Perna perna* au niveau de la station 2 port d'Annaba (cliché : Laouati, 2017).

- **Station de contrôle 3 (S3) :** La Caroube ($36^{\circ} 56.009'N - 7^{\circ} 45.928'E$) est une petite plage fortement urbanisée. Parmi toutes les plages qui longent la ville d'Annaba, c'est celle qui abrite une biodiversité particulière, notamment un herbier à posidonie dense qui remonte jusqu'à la surface pour créer une large barrière naturelle. Malheureusement, cet herbier est soumis à l'action clandestine d'une cinquantaine de bateaux de plaisance qui amarre tout le long de l'année, notamment en période estivale où le nombre d'embarcation peut atteindre une centaine. De ce fait, la plage est exposée aujourd'hui à deux sources de pollution : domestique et chimique (Fig. 12).



Figure 12. Lieu de transplantation des moules *Perna perna* au niveau de la station 3 La Caroube (cliché : Laouati, 2017).

Une 4^{ème} cage a été également installé au Cap de Garde (38° 58'3.25'N - 07° 47'28.33'E) qui a été considéré comme une 4^{ème} station de contrôle pour cette étude. Malheureusement, cette cage a été perdue lors les deux dernières semaines de la période de transplantation (Fig.13).



Figure 13. Lieu de transplantation des moules *Perna perna* au niveau de la station 4 Cap de Garde (cliché : Laouati, 2017).

2.2 Matériel biologique

La moule africaine *P. perna* (Linnaeus, 1758) est un mollusque bivalve de forme allongée qui possède une charnière munie d'une ou deux dents; une dans la valve gauche et 2 dans la valve droite (Fig.14). Les muscles rétracteurs du pied et les muscles rétracteurs du byssus forment une empreinte médiodorsale sur la coquille, le muscle rétracteur postérieur du byssus a une empreinte bien visible et adjacente à celle de l'adducteur postérieur, l'intérieur des valves est nacré, de couleur blanc rosé. En méditerranée la taille maximale des moules est de 90 mm, avec une taille moyenne de 50 à 60 mm (Fisher *et al.*, 1987). La valve peut atteindre exceptionnellement une longueur maximale de 180 mm. La couleur du manteau permet de distinguer les deux sexes, blanchâtre chez les mâles et rose saumon à orange chez les femelles.



Figure 14. Photo de *Perna perna* (cliché : Laouati, 2017).

2.3 Stratégie d'échantillonnage

2.3.1 Choix du matériel biologique

L'espèce *P. perna* a été choisie en raison de son abondance naturellement et de sa facilité d'approvisionnement durant la période d'échantillonnage. La moule est une espèce modèle en écophysiologie puisqu'elle a la faculté de résister plus de 12 jours à la dessiccation et est capable de résister à des modifications du métabolisme, à l'anoxie et l'hypercapnie.

Considérant plusieurs critères biologiques et écotoxicologiques, comme leur mode de vie sessile et leur mode de nutrition par filtration, les moules sont des espèces sentinelles des écosystèmes côtiers anthropisés. En effet, elles sont largement utilisées comme indicateurs biologiques dans des programmes de biosurveillance, afin de mesurer le degré de pollution environnementale vue leur capacité de concentrer dans leurs tissus de fortes teneurs en polluants chimiques, métaux lourds et contaminants organiques par filtration de l'eau. De plus, leur mode de vie sessile les expose directement à une pollution chronique ou fugitive. Les principaux programmes de biosurveillance utilisant des moules sont le « Mussel Watch » (**Goldberg et al., 1978 ; Goldberg et al., 2000**) et le Réseau National d'Observation (RNO) (**Claisse et al., 1992**), développés pour surveiller la qualité des eaux côtières.

2.3.2 Collecte des échantillons références

Toutes les moules destinées à la transplantation ont été collectées d'une même population au niveau de la plage Lahnaya (Fig. 9) à une profondeur de 1.5 m où elles adhéraient à un substrat rocheux. Ensuite, elles ont été transportées au laboratoire dans des glacières étanche et hermétique remplie d'eau de mer propre à l'emplacement de la station d'étude.

Pour garantir l'homogénéité des lots, nous avons sélectionné des moules d'une taille de 50 – 60 mm, correspondant à une même cohorte : jeunes adultes d'environ 18 à 24 mois (**Andral et Alzieu, 2004**) ; période pendant laquelle le métabolisme est stable (**RNO, 2006**).

2.3.3 Mise en stabulation des moules

Arrivées au laboratoire, les moules ont été immédiatement placées dans des aquariums remplis d'eau de mer et équipés par des filtres et pompes d'aération pour une période de stabulation de 15 jours (Fig. 15). Afin de minimiser l'effet du stress du transport, les conditions artificielles ont été contrôlées en permanence (25°C ; 35‰) pour assurer la meilleure acclimatation possible avant la transplantation.



Figure 15. Conditions d'acclimatation de *Perna perna* au laboratoire avant transplantation (cliché : Laouati, 2017).

2.3.4 Préparation des cages

Les cages (Lxl : 70 x 40 cm, capacité : 200 individus) ont été manuellement fabriquées au laboratoire à base de matériaux synthétiques dont un grillage en plastique (vide de maille 20 mm) monté en forme de portefeuille et équipé de trois flotteurs linéaires (tube polychlorure de vinyle 35 mm rembourés de mousse polyuréthane) pour assurer la suspension du dispositif une fois immergé (Fig.16). Ces matériaux utilisés ont été choisis pour les avantages suivants : résistance contre les prédateurs, stabilité de la matière (non dégradable) et indésirable pour les épiphytes.

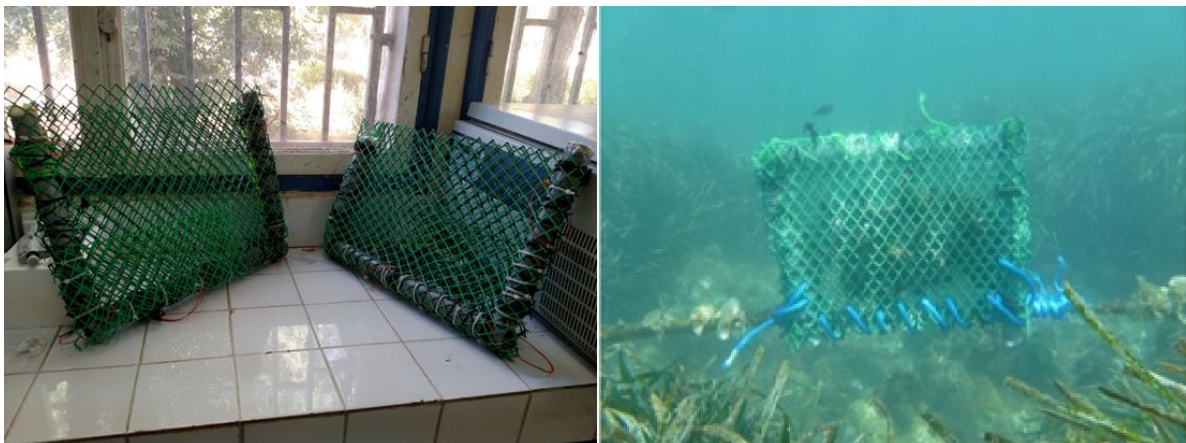


Figure 16. Photos des cages de transplantation (cliché : Laouati, 2017).

2.3.5 Opération de transplantation

Après avoir obtenu une autorisation spécifique des garde-côtes, chaque cage a été installée dans la station prévue en utilisant la plongée avec scaphandre autonome.

- **Station 1 :** A Joinoville, la cage a été fixée au bord du quai de l'oued Meboudja à une profondeur de 2 m (Fig.17).

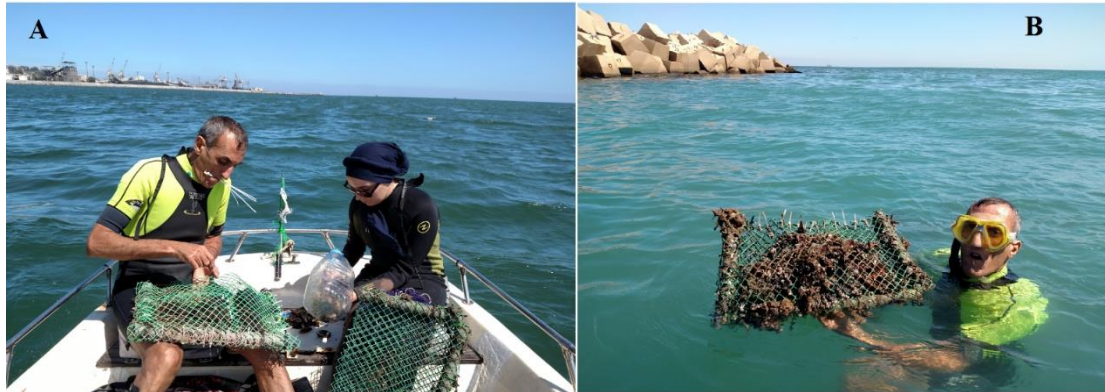


Figure 17. Installation de la cage au niveau de la station 1 Joinoville. A- mise en cage des moules, B- récupération de la cage du quai de l'oued Meboudja (cliché : Laouati, 2017).

- **Station 2 :** A l'intérieur du port (grande darse), la cage a été fixée contre un ancien tube métallique cylindrique à une profondeur de 2,5 mètres (Fig. 18).

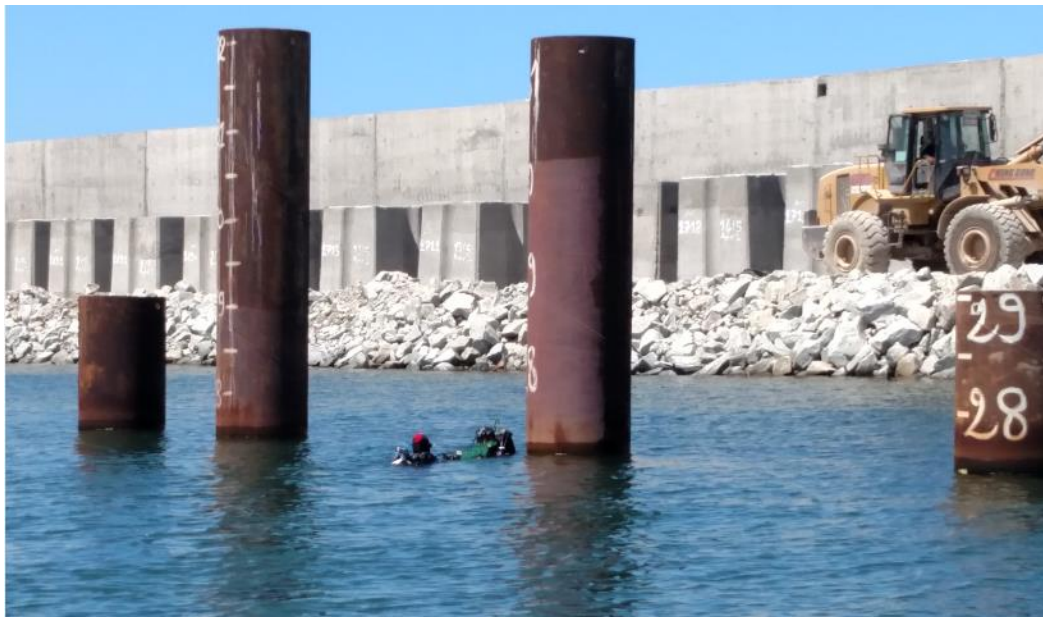


Figure 18. Installation de la cage à l'intérieur de la grande darse du port d'Annaba (cliché : Laouati, 2017).

- **Station 3 :** A La Caroube, la cage a été fixée à deux corps mort construits en béton armé que nous avons mis à la plage à une profondeur de 2,5 mètres (Fig. 19).



Figure 19. Installation de la cage au niveau de la station La Caroube. A- mise en cage des moules, B- installation de la cage (cliché : Laouati, 2017).

2.4 Mesure des paramètres physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques de l'eau (température, pH, salinité et oxygène dissous) ont été mensuellement mesurés in situ dans chaque station de contrôle pendant la période de transplantation à l'aide d'un multi-paramètre HANNA – HI9829 à une profondeur de 50 - 60 cm (Fig. 20).



Figure 20. Mesure des paramètres physico-chimiques des eaux de surface (cliché : Laouati, 2017).

2.5 Prélèvement de sédiment

Pendant la période de transplantation, des échantillons de sédiment meuble ont été prélevés pour étudier la biodisponibilité des éléments traces métalliques dans chaque station.

Une quantité de 1000 g de sédiment superficiel (couche de 5cm) a été prélevé dans chaque station en utilisant des pots en polyéthylène. Les échantillons ont été transportés en glacière et conservés dans un réfrigérateur à une température de 4 ° C jusqu'à leur traitement.

2.6 Récupération des cages

Après une période de trois mois (Juin – Août), les cages ont été récupérées. Sur place, nous avons observé un taux de mortalité estimé à environ entre 20 et 50 % (coquilles vides) dans chaque groupe (Fig.21). Les moules vivantes destinées au traitement ont été isolées puis transportées séparément au laboratoire dans des glacières.



Figure 21. Isolation des moules vivantes à partir des cages dans chaque station A- Port, B- La Caroube, C- Joinoville (cliché : Laouati, 2017).

2.7 Traitement des échantillons

2.7.1 Analyse granulométrique des sédiments

Après séchage (Fig. 22) des échantillons de sédiments dans l'étuve à 75 ° C pour 24 heures, une masse de 1000 grammes de sédiments secs de chaque échantillon a été tamisée, et seuls les grains $\leq 63 \mu\text{m}$ ont été récupérés de chaque échantillon. La quantité de sédiments fins ($\leq 63 \mu\text{m}$) obtenue à partir de chaque échantillon a été mesurée (g) pour classer les stations d'étude en fonction de la granulométrie.



Figure 22. Echantillons de sédiment avant séchage A- sédiment de la plage Lahnaya B- sédiment du port d'Annaba (cliché : Laouati, 2017).

2.7.2 Préparation des sédiments pour les dosages des ETMs

Les échantillons de sédiment meubles, après séchage, broyage et tamisage devront subir une minéralisation en respectant la méthode de **Grumiaux et al. (1997)**. Un gramme (1g) de sédiment sec (fraction $< 63 \mu\text{m}$, **Förstner, 1982; Robbe, 1984; Cosson, 1987; Claisse, 1995**) a été minéralisé dans 4 ml d'HCl (Suprapur 37 %) et 10 ml d' HNO_3 (Suprapur 65 %) pendant 12 h à froid dans un bêcher recouvert d'un verre de montre. Après deux heures de chauffage à reflux à 150 ° C, le résidu a été amené à sec (à 150 ° C) puis repris deux fois par 10 ml d'HCl 1 N, puis filtré sur papier Whatman 540 et complété avec de l'eau déminéralisée jusqu'à un volume final de 50 ml. Les filtrats obtenus ont été hermétiquement fermés et conservés en vue des dosages ultérieurs.

La minéralisation des échantillons a été accompagnée, d'une part, par celle des blancs, constitués de solutions contenant le réactif de minéralisation (acide chlorhydrique et acide nitrique) et subissant les mêmes conditions expérimentales que l'échantillon, et d'autre part,

par des échantillons standards (sédiment marin), fournis par l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (A.I.E.A) sous le code SRM 158.

2.7.3 Préparation des tissus des moules pour les dosages des ETMs

Les moules ont été décoquillées à l'aide d'un scalpel en acier inoxydable, puis l'ensemble du corps mou des moules a été regroupé en quatre pools (chaque pool correspond à cinq individus de même taille) et séché à 60 ° C pendant 48h. Les coquilles ont été aussi séchées afin de calculer l'indice métallique.

La minéralisation (**André, 1988**) consiste à prélever 0,5 g de poids sec d'échantillon provenant de l'homogénat de toute la partie molle des moules. Cet échantillon est placé dans un creuset auquel nous avons ajouté de l'acide nitrique. L'ensemble a été porté à une température de 95 ° C; et après refroidissement, nous avons ajusté le contenu avec de l'eau bidistillée. Cette minéralisation des échantillons a été accompagnée, d'une part, par celle des blancs, constitués de solutions contenant le réactif de minéralisation (acide nitrique) et subissant les mêmes conditions expérimentales de l'échantillon, et d'autre part, par des échantillons standards (moule de Méditerranée *M.galloprovincialis*), fournis par l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (A.I.E.A) sous le code SRM 2976.

2.7.4 Dosage des métaux lourds par la SAA

Le dosage des moules et des sédiments a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique Shimadzu, type AA6500 assisté par ordinateur. L'opération a été conduite sous une flamme d'air acétylène oxydante sous une longueur d'onde qui correspond à chaque métal dosé. L'appareil a été préalablement étalonné avant analyse en faisant passer des solutions étalons. Pour s'assurer de la linéarité de la courbe d'étalonnage, 10 étalons ont été préparés dans la gamme prévue par le constructeur. L'exploitation de cette courbe d'étalonnage tracée en portant l'absorbance en fonction de la concentration a été assurée par l'ordinateur. Cette exploitation a servi pour déterminer la concentration en chaque métal (cuivre, zinc, plomb et cadmium).

2.8 Détermination des indices métalliques

La biodisponibilité des métaux lourds par le calcul de l'indice métallique (**Soto et al., 1997**) a été motivée par le fait que nous n'avons pas pu techniquement doser les métaux lourds (Zn, Cu, Pb et Cd) dans les quatre échantillons d'eaux marines. En effet, la mesure directe de ces contaminants dans l'eau fait appel à des techniques analytiques sophistiquées et coûteuses, difficilement applicables à notre réseau de surveillance.

En plus, la variabilité temporelle des eaux côtières ne confère que peu de signification lors d'une mesure ponctuelle (à raison d'un échantillonnage mensuel), ce qui nous oblige à effectuer un échantillonnage répété et étalé sur une longue période, qui dans notre cas était impossible à réaliser. Pour ces raisons, nous avons évalué la biodisponibilité par le calcul de l'indice métallique, une méthode largement utilisée dans les études de monitoring.

2.8.1 Calcul des indices métalliques

Les indices métalliques (IM) représentés par le rapport métal/poids sec de la coquille ont été calculés pour déterminer la biodisponibilité des métaux (**Fisher, 1984; Soto et al., 1997**):

$$IM = \frac{CMTM \times PCMA}{PC}$$

IM : Indice métallique (μg métal/g poids sec de la coquille);

CMTM : Concentration métallique dans le tissu mou (μg métal/g poids sec de tissu);

PCMA : Poids du corps mou analysé (g poids sec de tissu);

PC : Poids de la coquille (g poids sec).

2.9 Evaluation de l'Indice de Contamination (IC)

Selon les normes françaises, l'évaluation des valeurs de l'indice de contamination (IC) utilisées dans cette étude pour les sédiments de surface sont celles de l'Agence du Bassin Rhône Méditerranée Corse (**ABRMC, 1991**). L'indice de contamination (IC) représente le rapport entre la valeur guide de l'élément trace considéré (en référence aux valeurs guides admises par l'Agence du bassin Rhône-Méditerranée-Corse, **ABRMC, (1991)** et sa teneur dans le sédiment étudié. Si l'IC est inférieur à 3, le sédiment est considéré de classe 1 (zone non contaminé) ; si l'IC est compris entre 3 et 10, le sédiment est de classe 2 (zone pollué) et si l' IC est supérieur à 10, le sédiment est de classe 3 (zone à risque).

$$IC = \frac{C_{\text{metal}}}{C_{\text{background}}}$$

C_{metal} : concentration de l'élément dans l'échantillon de sédiment

C_{background} : valeur de fond géochimique de l'élément.

2.10 Analyse statistique

Tous les résultats ont été exprimés en moyenne \pm erreur standard. Les données ont fait l'objet d'une analyse de variance bidirectionnelle (ANOVA) afin de comparer les concentrations moyennes des éléments traces dans les tissus des moules et dans le sédiment. Les différences significatives ($p < 0.05$) ont été déterminées en utilisant le test Tukey. L'analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée pour rechercher éventuellement des corrélations entre les différents éléments traces, biomarqueurs et les paramètres environnementaux mesurés. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel STATISTICA (StatSoft.Statistica.v10.0).

3 RESULTATS

3.1 Paramètres physico-chimiques

Les valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques sont résumées dans le tableau 4. Aucune différence significative spatio-temporelle des caractéristiques de l'eau n'a été enregistrée entre les quatre stations étudiées (S.t₀, S1, S2 et S3), tout au long de la période de transplantation.

Tableau 4. Variation des paramètres physico-chimiques de l'eau de mer dans les quatre stations étudiées.

Stations	T (°C)	pH	Sal (ppt)	O.D (mg.l ⁻¹)
S.t ₀	25.52 ± 1.00 ^{n.s}	8.13 ± 0.37 ^{n.s}	37.09 ± 0.33 ^{n.s}	8.20 ± 0.18 ^{n.s}
S1	26.16 ± 1.53 ^{n.s}	8.21 ± 0.16 ^{n.s}	37.28 ± 0.13 ^{n.s}	8.14 ± 0.05 ^{n.s}
S2	25.16 ± 1.26 ^{n.s}	8.12 ± 0.36 ^{n.s}	37.27 ± 0.31 ^{n.s}	8.23 ± 0.09 ^{n.s}
S3	25.80 ± 0.80 ^{n.s}	7.70 ± 0.17 ^{n.s}	37.58 ± 0.06 ^{n.s}	7.79 ± 0.16 ^{n.s}

n.s = variation non significative ($p > 0.05$)

3.2 Eléments traces métalliques

3.2.1 Dosage des ETMs dans la moule

Les concentrations initiales de Cu, Zn, Pb et Cd dans les tissus des moules au temps t₀ (avant transplantation) étaient de : 2,81 ± 0,51, 211,79 ± 16,72, 7,09 ± 0,79 et 0,061 ± 0,01 µg.g⁻¹ de poids sec (p.s), respectivement.

3.2.1.1 Cuivre (Cu)

Les concentrations en Cu dans les tissus de *P. perna* sont illustrées par la figure 23. Les teneurs les plus élevées ont été enregistrées dans la station S2 (7,39 ± 0,76 µg.g⁻¹ p.s) et les plus faibles dans la station S3 (5,83 ± 0,46 µg.g⁻¹ p.s). L'analyse statistique met en évidence l'existence d'une différence significative ($p < 0.05$), des concentrations en Cu dans les tissus de *P. perna*, dans les trois stations de contrôle par rapport aux valeurs initiales (S.t₀) après la période de transplantation. Par contre, aucune différence significative n'a été observée ($p > 0.05$) entre les trois stations contrôlées.

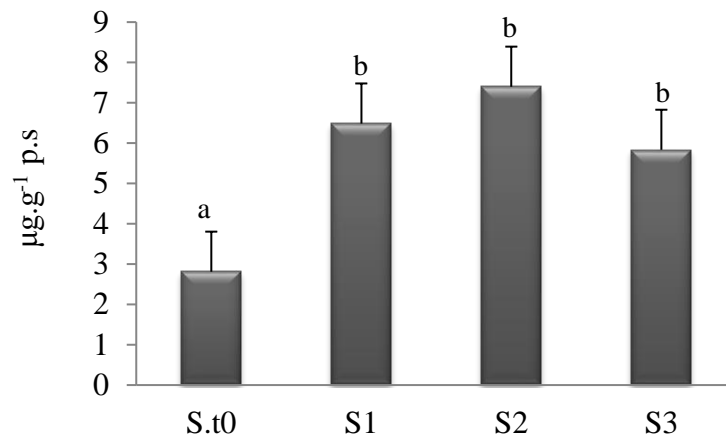


Figure 23. Variations spatiales des concentrations en Cu dans les tissus de *Perna perna*.
 Les lettres a et b indiquent que la variation inter-stations est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey.
 Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.2.1.2 Zinc (Zn)

Les concentrations de Zn dans les tissus de *P. perna* sont illustrées par la figure 24. Dans les trois stations de transplantation, les teneurs les plus élevées ont été enregistrées dans la station S2 ($287,46 \pm 16,07 \mu\text{g. g}^{-1} \text{ p.s}$) et les plus faibles dans la station S3 ($212,66 \pm 20,20 \mu\text{g. g}^{-1} \text{ p.s}$). L'analyse statistique indique aucune différence significative des teneurs en zinc dans les tissus de *P. perna* dans l'ensemble des stations d'étude ($p > 0.05$).

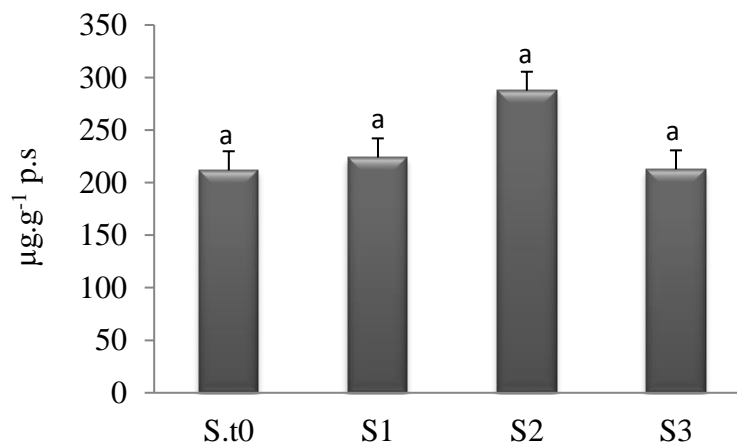


Figure 24. Variations spatiales des concentrations en Zn dans les tissus de *Perna perna*.
 Les lettres a et b indiquent que la variation inter-stations est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey.
 Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.2.1.3 Plomb (Pb)

Les concentrations en Pb dans les tissus de *P. perna* sont illustrées par la figure 25. Les teneurs les plus élevées ont été enregistrées dans la station S2 ($19,95 \pm 2,18 \mu\text{g g}^{-1} \text{ p.s}$) et les plus faibles dans la station S3 ($10,11 \pm 0,56 \mu\text{g. g}^{-1} \text{ p.s}$). L'analyse statistique a révélé une augmentation significative ($p < 0.05$), des concentrations en Pb dans les tissus de *P. perna* transplantées dans la station S2 par rapport aux valeurs initiales S.t₀. Par contre, aucune différence significative ($p > 0.05$) n'a été enregistrée pour les deux autres échantillons (S1 et S3).

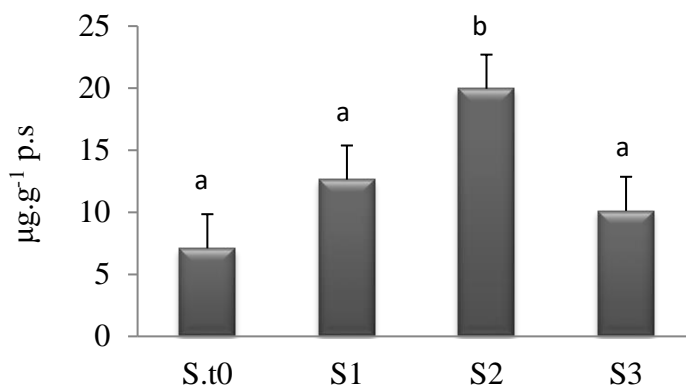


Figure 25. Variations spatiales des concentrations en Pb dans les tissus de *Perna perna*. Les lettres a et b indiquent que la variation inter-stations est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey. Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.2.1.4 Cadmium (Cd)

Les concentrations en Cd dans les tissus de la moule *P. perna* sont présentées dans la figure 26. Les teneurs les plus élevées ont été enregistrées dans la station S2 ($0,08 \pm 0,02 \mu\text{g. g}^{-1} \text{ p.s}$) et les plus faibles dans la station S3 ($0,07 \pm 0,008 \mu\text{g. g}^{-1} \text{ p.s}$). L'analyse statistique met en évidence l'absence d'une différence significative ($p > 0.05$), des concentrations en Cd dans les tissus de *P. perna*, dans les trois stations de contrôle par rapport aux valeurs initiales (S.t₀) après la période de transplantation.

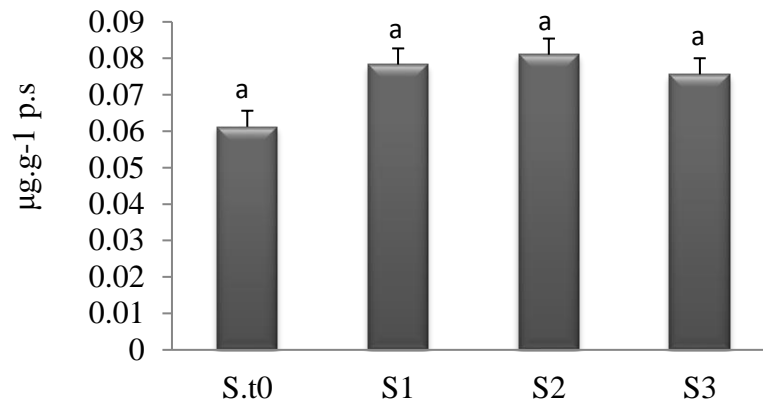


Figure 26. Variations spatiales des concentrations en Cd dans les tissus de *Perna perna*.
 Les lettres a et b indiquent que la variation inter-stations est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey.
 Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.2.2 Dosage des éléments traces métallique dans le sédiment superficiel

Les teneurs les plus faibles des éléments dosés (Cu, Zn, Pb et Cd) ont été enregistrées dans le sédiment de la station référence Lahnaya avec une concentration moyenne respective de $50,743 \pm 0,90$, $130,48 \pm 28,86$, $153,49 \pm 26,44$ et $0,101 \pm 0,09 \mu\text{g. g}^{-1} \text{ p.s}$. L'ordre d'enrichissement du sédiment en métaux était le suivant pour tous les éléments $S2 > S1 > S3 > S.t0$.

3.2.2.1 Cuivre (Cu)

Le cuivre est présent dans le sédiment des trois stations de contrôle à des teneurs comprises entre $126,89 \pm 35,52$ dans la station S2 et $85,83 \pm 8,48 \mu\text{g. g}^{-1} \text{ p.s}$ dans la station S3 (Fig. 27). L'analyse statistique des teneurs moyennes en Cu observées dans le sédiment des stations d'étude a révélée l'existence d'une différence significative ($p < 0.05$) du sédiment de la station S2 par rapport aux autres stations d'études.

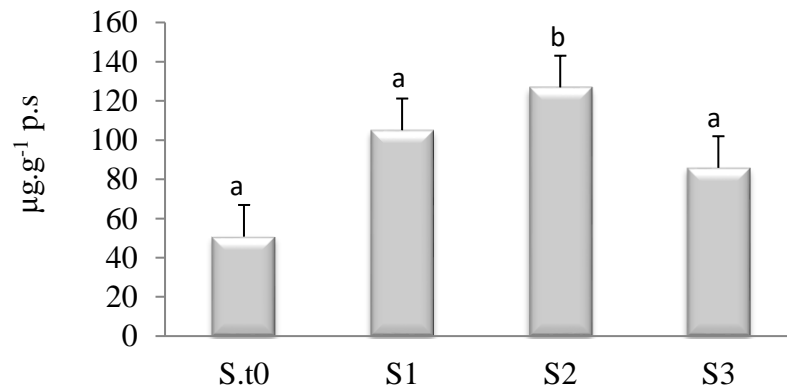


Figure 27. Variations spatiales des teneurs en Cu dans les sédiments des stations d'étude. Les lettres a et b indiquent que la variation inter-stations est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey. Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.2.2.2 Zinc (Zn)

Le zinc est présent dans les sédiments des trois stations de contrôle à des teneurs comprises entre $186,36 \pm 30,97 \mu\text{g. g}^{-1} \text{ p.s}$ (station S2) et $156,33 \pm 11,31 \mu\text{g. g}^{-1} \text{ p.s}$ (station S3) (Fig. 28). Aucune différence significative des teneurs en Zn ($p > 0.05$) n'a été enregistrée entre les trois stations de contrôle.

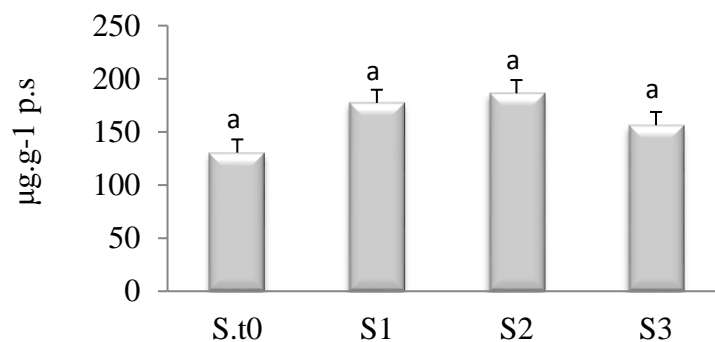


Figure 28. Variations spatiales des teneurs en Zn dans les sédiments des stations d'étude. Les lettres a et b indiquent que la variation inter-stations est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey. Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.2.2.3 Plomb (Pb)

Le plomb est présent dans les sédiments des trois stations de contrôle à des teneurs comprises entre $153,49 \pm 26,44 \mu\text{g. g}^{-1}$ de p.s (station S2) et $70,48 \pm 15,06 \mu\text{g. g}^{-1}$ de p.s (station S3) (Fig. 29). La comparaison inter-station des teneurs moyennes en Pb dans les sédiments a révélée l'existence d'une différence significative entre la station S2 ($p < 0.01$) et la station S1 ($p < 0.05$), par rapport à la station S.t₀.

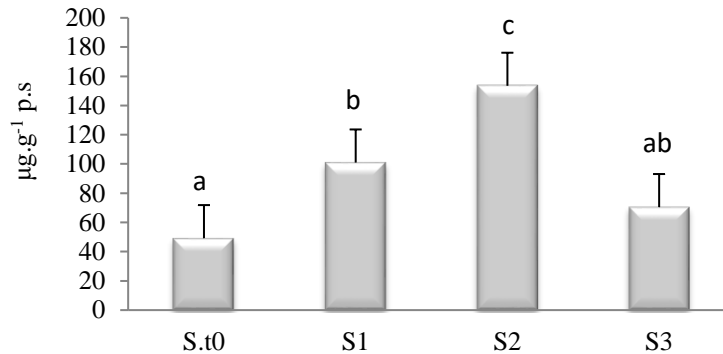


Figure 29. Variations spatiales des teneurs en Pb dans les sédiments des stations d'étude. Les lettres a et b indiquent que la variation inter-stations est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey. Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.2.2.4 Cadmium (Cd)

Le cadmium est présent dans les sédiments des trois stations de contrôle à des teneurs comprises entre $0,735 \pm 0,35 \mu\text{g. g}^{-1}$ de p.s (station S2) et $0,33 \pm 0,03 \mu\text{g. g}^{-1}$ de p.s (station S3) (Fig. 30). La comparaison inter-stations des teneurs moyennes en Cd a révélé l'existence d'une différence significative ($p < 0.05$) du sédiment de la station S2 par rapport aux autres stations d'étude.

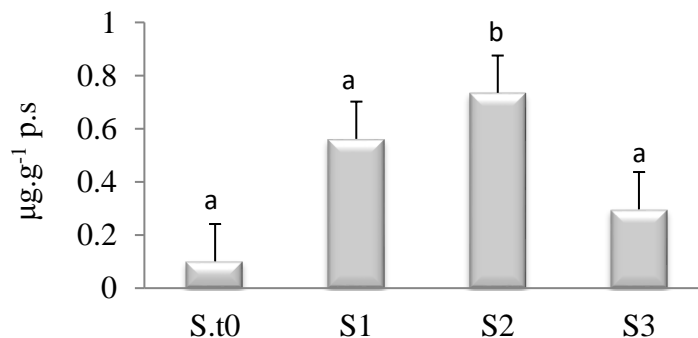


Figure 30. Variations spatiales des teneurs en Cd dans les sédiments des stations d'étude. Les lettres a et b indiquent que la variation inter-stations est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey. Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.3 Analyse granulométrique

Les résultats de l'analyse granulométrique sont résumés dans le tableau 5. Le pourcentage de la fraction sédimentaire fine ($\leq 63 \mu\text{m}$) de chaque échantillon après tamisage a permis de classer les stations d'étude en fonction de la qualité de leurs sédiments.

Tableau 5. Représentation (en %) de la fraction sédimentaire fine ($\leq 63 \mu\text{m}$) dans les stations d'étude.

	Stations			
	S.t ₀	S1	S2	S3
Masse (g)	80	630	920	370
Pourcentage	8 %	63 %	92 %	37 %

La fraction fine représentait respectivement 8 %, 63 %, 92 % et 37 % dans les stations S.t₀, S1, S2 et S3. Selon la qualité des sédiments, les stations ont été classées par l'ordre décroissant suivant : $S2 < S1 < S3 < S.t_0$. Le sédiment du port d'Annaba (S2) est le plus fin et celui de la plage Lahnaya (S.t₀) le plus gros.

3.4 Détermination du niveau de contamination du sédiment par les ETMs

Le calcul de l'indice de contamination de chaque élément dosé dans le sédiment superficiel des stations d'étude montre que le Zn et le Cd présentent des valeurs inférieures à 3, alors que le Cu et Pb représentent des valeurs supérieures à 3 dans les trois stations de contrôle (Tab. 6).

Tableau 6. Indice de contamination (IC) de chaque métal lourd dans le sédiment des stations d'étude.

Teneurs en métaux	Cu	Zn	Cd	Pb
Valeurs guides ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (ABRMC, 1991)	26	88	0,6	22
S.t ₀	1,95	1,48	0,16	2,23
S1	4,04	2,01	0,93	4,59
S2	4,88	2,11	1,21	6,97
S3	3,3	1,77	0,55	3,20

S.t₀ : Lahnaya, S1 : Joinoville, S2 : Port, S3 : La Caroube

- Dans la station Lahmaya, le sédiment superficiel semble être épargné de toute forme de contamination par les ETMs ($IC < 3$).
- A Joinoville, le sédiment est contaminé par le cuivre ($IC = 4,04$) et par le plomb ($IC = 4,59$).
- Dans le Port, le sédiment est contaminé par le plomb ($IC = 6,97$) et le cuivre ($IC = 4,88$).
- A la Caroube, les valeurs d'IC du cuivre et du plomb sont respectivement de 3,3 et de 3,20.

3.5 Indice métallique

3.5.1 Indice du cuivre

Les valeurs moyennes de l'indice Cu obtenues chez *P. perna* transplanté dans les des différentes stations de contrôle sont comprises entre $0,39 \pm 0,04$ (S1) et $0,23 \pm 0,02$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s (S3) (Fig. 31). L'analyse statistique montre que l'indice du Cu a augmenté significativement ($p < 0,05$) dans les moules transplantées à la station S1 par rapport à l'indice initiale (S.t₀). Par contre l'indice n'a montré aucune différence significative ($p > 0,05$) dans les moules transplantées dans la station S2 et S3.

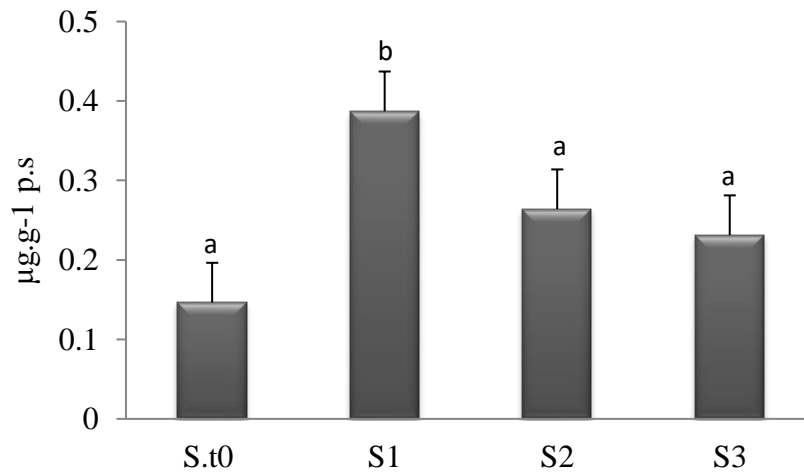


Figure 31. Etude comparative des variations de l'indice Cu moyen ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s) mesuré chez *Perna perna* provenant des différentes stations d'étude. Les lettres a et b indiquent que la variation inter-station est significative à $p < 0,05$, en utilisant le test de Tukey. Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0,05$.

3.5.2 Indice du zinc

Les valeurs moyennes de l'indice Zn obtenues chez *P. perna* transplanté dans les différentes stations de contrôle sont comprises entre $13,80 \pm 2,39$ (S1) et $8,45 \pm 0,83$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s (S3) (Fig. 32). L'analyse statistique montre que l'indice du Zn n'a montré aucune différence significative ($p > 0.05$) dans les moules transplantées dans les trois stations de contrôle.

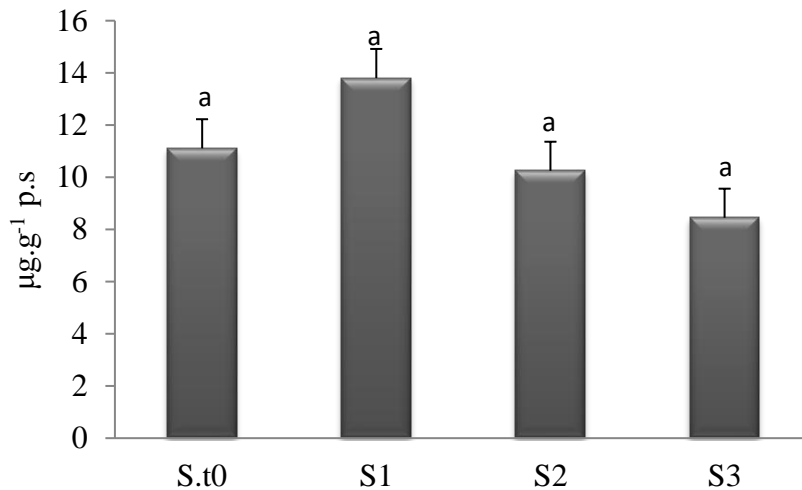


Figure 32. Etude comparative des variations de l'indice Zn moyen ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s) mesuré chez *Perna perna* provenant des différentes stations d'étude. Les lettres a et b indiquent que la variation inter-station est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey. Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.5.3 Indice du plomb

Les valeurs moyennes de l'indice Pb obtenues chez *P. perna* transplanté dans les différentes stations de contrôle présentent des valeurs comprise entre $0,40 \pm 0,03$ (S3) et $0,76 \pm 0,1$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s (S1) (Fig. 33). L'analyse statistique montre que l'indice du Pb a augmenté significativement ($p < 0.05$) dans les moules transplantées dans les stations S1 et S2 par rapport à l'indice initial (S.t0). Par contre, l'indice n'a montré aucune différence significative dans les moules transplantées dans la station S3.

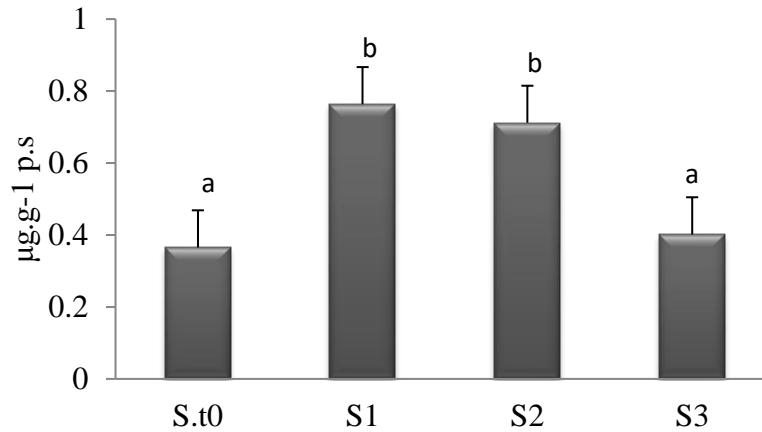


Figure 33. Etude comparative des variations de l'indice Pb moyen ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s) mesuré chez *Perna perna* provenant des différentes stations d'étude. Les lettres a et b indiquent que la variation inter-station est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey. Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.5.4 Indice du cadmium

Les valeurs moyennes de l'indice Cd obtenues chez *P. perna* transplanté dans les différentes stations de contrôle présentent des valeurs comprises entre $0,004 \pm 0,001$ (S1) et $0,003 \pm 0,0008$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s (S2) (Fig. 34). L'analyse statistique montre que l'indice du Cd n'a montré aucune différence significative ($p > 0.05$) dans les moules transplantées dans les trois stations de contrôle.

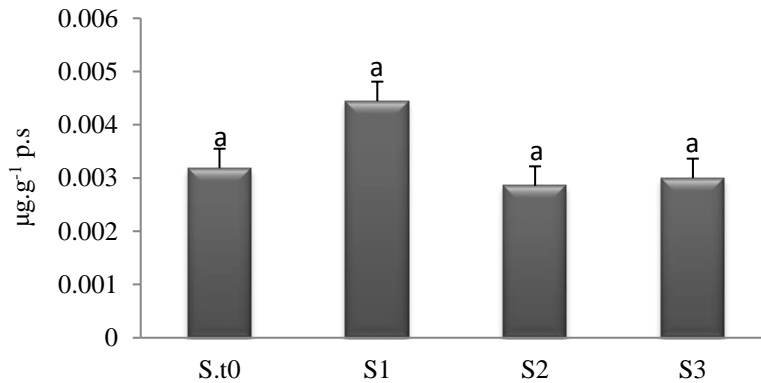


Figure 34. Etude comparative des variations de l'indice Cd moyen ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s) mesuré chez les moules *Perna perna* provenant des différentes stations d'étude. Les lettres a et b indiquent que la variation inter-station est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey. Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

4 DISCUSSION

L'évaluation de la pollution chimique dans le golfe d'Annaba a toujours été basée sur la biosurveillance passive en utilisant des organismes marins côtiers sessiles (**Belabed et al., 2013; Bensafia et Khati, 2018; Khati et al., 2018**) ou sédentaires (**Beldi et al., 2006; Merad et al., 2017; Amri et al., 2017**) comme modèles biologiques sentinelles. Ainsi, une large base de données sur la pollution par les métaux lourds dans le golfe d'Annaba est désormais disponible grâce aux différentes études réalisées sur de nombreuses taxons zoologiques bioindicateurs (mollusques : **Beldi et al., 2006; Belabed et al., 2013; Abdennour et al., 2010; Boucetta et al., 2016; Amira et al., 2018**, crustacés: **Abdennour et al., 2000**, poissons: **Ouali et al., 2018** et spongiaires : **Bensafia et Khati, 2018**). Cependant, la plupart de ces données restent incertaines notamment celles concernant les sources de pollution et les zones les plus contaminées du golfe en raison des nombreuses variables (potentialités des espèces, âge, biodisponibilité des ETMs) qui pourraient affecter les résultats obtenus (**Belabed et al., 2013**).

Pour minimiser l'effet de ces variables aussi bien intrinsèques qu'extrinsèques, nous avons donc évalué la contamination du golfe d'Annaba par une approche dite la biosurveillance active qui est basée sur la transplantation de trois groupes de moules *P. perna* de la même cohorte et de la même population pendant une période de 12 semaines.

Les fluctuations des caractéristiques physico-chimiques de l'eau (T° , pH, salinité et oxygène dissous) peuvent être considérées comme les principaux facteurs de variation du comportement biologique des organismes aquatiques (**Romeo et Gnassia-Barelli, 1988**). De nombreux auteurs ont suggéré la saisonnalité pour expliquer la variation des concentrations des ETMs dans l'eau (**Tekin-Özan, 2007; Tekin-Özan et Kir, 2008; Duman et Kar, 2012; Salem et al., 2014; Bouzahouane et al., 2018**), dans le sédiment (**Pekey, 2006; Buggy et Tobin, 2008; Belabed et al., 2017**) et dans les tissus des organismes (**Çoğun et al., 2005; Bahnasawy et al., 2009; Ibrahim et Omar, 2013; Diop et al., 2016; Bensafia et Khati, 2018; Jiang et al., 2018**). De plus, le fait de la présence d'une variation significative des conditions environnementales rend difficile l'affirmation de la vraie raison derrière d'éventuels changements physiologiques et en particulier la stimulation des biomarqueurs du stress (**Giarratano et al., 2011; Bouzahouane et al., 2018; Khati et al., 2018**).

Selon nos résultats, les conditions environnementales étaient globalement similaires dans les quatre stations tout au long de la période d'étude, ce qui nous a permis de se focaliser davantage sur l'effet des ETMs.

Dans le sédiment superficiel, nos résultats indiquent une forte pollution dans les trois stations de transplantation (S1, S2 et S3) par Pb et Cu selon les valeurs guides de **USEPA (1992)**, ainsi que les valeurs calculés de l'IC. Pour le Zn, la comparaison avec les teneurs rapportées par le **RNO (2005)** (90 µg/g P.S.) et les Guidelines de la qualité du sédiment marin (USEPA) (**Kalantzi et al., 2013**), les sédiments prélevés dans les différents stations sont modérément contaminés par le Zn (90-200 µg/g). Selon ces mêmes valeurs guides, aucune contamination par Cd ne peut être envisagée dans nos stations d'étude. La station d'échantillonnage S.t₀ montre des indices de contamination inférieurs à la valeur 3, classant ainsi leur sédiment superficiel indemne de toute forme de pollution métallique.

En comparant le degré de contamination des sédiments des différentes stations étudiées, le port d'Annaba (S2) s'est avéré le plus contaminé par le Cu, Pb et Cd alors que le Zn n'a révélé aucune différence entre les trois stations de contrôle. Globalement, l'ordre d'abondance des éléments est le suivant : Zn > Pb ≥ Cu > Cd. Le piégeage des métaux dans le sédiment est intimement lié à sa qualité et notamment sa granulométrie (**Goldberg, 1954; Hirst, 1962; Stoffers et al., 1977**).

La concentration des ETMs dans le sédiment est négativement corrélée à sa granulométrie. Les concentrations les plus élevées sont généralement associées à la fraction sédimentaire fine (< 63µm) (**Krauskopf, 1956; Romankevich, 1984**). De nombreuses études ont rapporté que l'accumulation des métaux traces est également liée à la présence de la matière organique dans les sédiments (**Goldberg, 1954; Krauskopf, 1956; Stoffers et al., 1977; Goncalves et Boaventura, 1991**). **Green et al. (2001)** précisent même que le limon et l'argile présents dans l'environnement estuarien pourraient avoir une grande affinité aux métaux traces et donc une concentration plus élevée. Toutes ces constatations de la littérature semblent conformes aux résultats de l'analyse granulométrique de nos sédiments (S2 < S1 < S3 < S.t₀). Le sédiment du port était constitué de particules fines (vase) et ceux de Lahnaya de sable grossier.

Cet enrichissement en métaux traces dans le port s'explique principalement par l'exposition permanente aux carburants (**Calamari et Naeve, 1994**) résultant du trafic maritime intensif de cette station par rapport aux autres. Il en est de même pour l'origine de l'enrichissement en ETMs de la plage de La Caroube (S3) qui a été transformée par la population locale ces dernières années en un petit port de plaisance clandestin pour l'accostage des hors-bords, notamment en période estivale.

La contamination du sédiment de la plage Joinoville (S1) par les métaux lourds peut être liée à l'écoulement continu des eaux de la rivière Seybouse alimentée par tous les déchets

industriels de la région d'Annaba en particulier ceux drainés par les complexes sidérurgiques ArcelorMittal et de production d'engrais synthétiques de Fertial.

Les faibles teneurs d'ETM dans plage Lahnaya (S.t₀) s'expliqueraient par l'éloignement de cette station des principales sources de contamination.

Des résultats similaires ont été observés dans les sédiments des ports d'Annaba (**Ouali et al., 2018**) et d'Oran (**Rouane-Hacène et al., 2012**) qui sont fortement contaminés par le Cu, Pb et Cd avec le même ordre d'abondance des ETMs.

Le tableau 7 compare les teneurs en ETMs dans les sédiments superficiels dans différentes localités de la Méditerranée anthropisées. Les résultats confirment que notre zone d'étude est un environnement contaminé et qui présente une multi-contamination conséquente en particulier par le cuivre, le plomb et le zinc; avec des valeurs maximales mesurées du même ordre de grandeur que les plus hautes valeurs retrouvées dans la littérature.

Tableau 7. Concentrations limites de métaux lourds dans les sédiments de différents écosystèmes côtiers dans la Méditerranée ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s) sont données en moyennes et/ou en gammes (min–max).

Locations (Pays)	Concentration [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]				Références
	Cuivre	Zinc	Cadmium	Plomb	
Golfe d'Annaba (Algérie)	92,13 50,74- 126,9	162,61 130,48- 186,38	0,43 0,09- 0,74	93,55 49,22- 153,49	Présente étude
	14,64- 222,69	70,47- 501,28	0,3-3,73	10,2-334,84	(Ouali, 2018)
	15,01-60,32	190,23- 301,17	0,9-2,62	10,04- 186,19	(Belabed <i>et al.</i> , 2013)
Golfe de Skikda (Algérie)	18	62,25	0	36,5	(Gueddah, 2003)
Baie de Ghazaouet (Algérie)	39,53	190,24	1,68	31,78	(Benguedda-Rahal, 2012)
Golfe de Tunis (Tunisie)	9-20	45-150	-	56-142	(Added <i>et al.</i> , 2003)
Golf de Gabes (Tunisie)	0,59-5,8	5,2-7165	0,11-0,5	3,8-13,9	(El-Zrelli <i>et al.</i> , 2016)
Côtes de l'Atlantique (Maroc)	98	378,98	3,81	159,98	(Nadem <i>et al.</i> , 2015)
Golfe de Lion (France)	9-45	51-250	0,22-0,82	20,6- 69,7	(Roussiez <i>et al.</i> , 2006)
Golfe de Taranto (Italie)	42-52	86,8-129	-	44,7- 74,8	(Buccolieri <i>et al.</i> , 2006)
Golfe d'Oristano (Italie)	-	32-243,4	0,13-10,7	14,0- 110,8	(Magni <i>et al.</i> , 2006)
Golfe de Toranto (Italie)	8,05-22,34	35-62	0,2-1,7	14,28-29,19	(Di Leo <i>et al.</i> , 2013)
Golfe de Thermaikos (Grèce)	19-165	74-358	-	10-218	(Christophoridis <i>et al.</i> , 2009)
Baie d'Izmit (Turquie)	24-102	440-1900	2,5-9,5	55,2- 172	(Pekey, 2006)
Valeurs européennes de référence	26	88	0.6	22	(Boust, 1981)

Depuis le grand succès du programme «Mussel Watch», les bivalves et en particulier les moules sont devenus l'outil de biosurveillance le plus adopté pour les écosystèmes côtiers et estuariens (Goldberg, 1980; Livingstone, 1993; Conrad *et al.*, 2014; Regoli *et al.*, 2014; Benali *et al.*, 2015; Farrington *et al.*, 2016). Leur tolérance et leur adaptabilité ont fait d'eux le meilleur choix pour différentes expériences sur le terrain (Boutiba *et al.*, 2003; Feldstein *et al.*, 2003; Viarengo *et al.*, 2007; Tsangaris *et al.*, 2010; Fasulo *et al.*, 2012; Benali *et al.*, 2017; Beyer *et al.*, 2017). De plus, les bivalves se caractérisent par une grande capacité à atteindre des niveaux de bioconcentration importants de métaux lourds sans présenter d'effets mortels (Prueli *et al.*, 1987; Livingstone, 1991), ce qui en fait d'excellentes sentinelles.

L'analyse des ETMs (Cu, Zn, Pb et Cd) dans les tissus des trois groupes de moules en cages après la période de transplantation a révélé une augmentation de leurs concentrations par rapport aux résultats initiaux de S.t₀ (avant déploiement). L'analyse statistique a montré que cette augmentation suit l'ordre de contamination par les ETMs des sédiments superficiels (groupe S2 > groupe S1 > groupe S3), ce qui indique une forte relation entre la bioaccumulation des métaux et leur biodisponibilité dans tous les stations. Ceci est appuyé par une biodisponibilité des métaux, exprimée par des valeurs d'indices métalliques significativement plus élevée au niveau des mêmes stations en comparaison à la station S.t₀. Cette biodisponibilité suit les mêmes tendances que les teneurs métalliques. Une observation similaire a été indiquée par Rouane-Hacene *et al.* (2015) après un suivi annuel des éléments traces dans la moule (*Mytilus galloprovincialis*) et les sédiments des côtes extrêmes Ouest de l'Algérie.

Nos résultats indiquent que la biodisponibilité élevée des métaux au niveau de ses stations de contrôle va de pair avec leurs accumulation dans les tissus des moules. Afin de satisfaire leurs exigences nutritionnelles et respiratoires, les moules sont capables de filtrer des volumes d'eau très importants, entre 0.2 à 5 litres/heures (Monfort, 2006). Ainsi, ces bivalves peuvent fortement concentrer dans leur tractus digestif et leurs tissus les polluants chimiques présents dans l'eau ou dans la nourriture tel que le phytoplancton. Les moules accumulent les métaux lourds avec un facteur de bioconcentration de l'ordre 10³ à 10⁵ par rapport à leur environnement, sans subir d'effets létaux (Livingstone, 1991; Prueli *et al.*, 1987).

L'augmentation significative du Cu dans les trois stations après 12 semaines de transplantation est très probablement liée à la contamination du golfe par cet élément comme rapporté dans Belabed *et al.* (2013) et Ouali *et al.* (2018). Bien que la plupart des études de biosurveillance

effectuées sur les espèces de mollusques et crustacés ont observé le pic de bioaccumulation des ETMs en hiver et le minimum en été (**Goldberg et al., 1983; Chafik et al., 2001; Odzak, 2002; Beldi et al., 2006; Belabed et al., 2008; Bouzahouane et al., 2018**), nos résultats ont révélé que ces éléments sont présent à des niveaux élevés même dans la saison où ils sont censés être le moins. En effet, le golfe d'Annaba reçoit toutes sortes de déchets urbains (en S1 et S3), industriels (en S1 et S2) et agricoles (en S1) provenant de 13 égouts rejetant sans cesse de nombreux polluants dont des carburants et des pesticides à base de Cu (**Belabed et al., 2013; Ouali et al., 2018**). Des résultats similaires indiquant des niveaux significatifs de Cu dans le golfe ont été observés par **Bouzahouane et al. (2018)** qui ont surveillé la qualité de ses eaux par rapport à la contamination métalliques.

La concentration de Pb a augmenté considérablement dans les moules transplantées dans le port (S2) par rapport aux deux autres stations. Cela peut confirmer que le risque de contamination du milieu marin par cet élément en raison de l'activité des bateaux peut être encore plus important que celui de tout autre, y compris l'industrie. Il convient de noter que la plupart des propriétaires de bateaux préfèrent utiliser du carburant normal au lieu du sans plomb pour des raisons économiques. Des résultats similaires révélant une contamination plus importante par cet élément dans les ports que dans tout autres sites d'une zone ont été observés par **Rouane-Hacene et al. (2015)** et **Ouali et al. (2018)** dans *M. galloprovincialis* prélevé dans le port d'Oran et dans *Mugil cephalus* capturé dans le port d'Annaba respectivement.

Une augmentation des concentrations de Cd et de Zn (par rapport à S.t₀) a été observée dans les trois groupes de moules après la période de transplantation. Cependant, aucun de ces deux éléments n'a pu atteindre un niveau significativement élevé dans aucun des trois stations contrôlées. En effet, de nombreux facteurs biotiques (poids, sexe et reproduction) et abiotiques (paramètres de l'eau, biodisponibilité des éléments) peuvent influencer l'accumulation des ETMs par la moule *P. perna* (**Sokolowski et al., 2004; Benomar et al., 2011**). Parmi tous les paramètres environnementaux, l'oxygène dissous pourrait être l'un des facteurs les plus directs pouvant limiter le processus de filtration dont les moules dépendent pour satisfaire leurs besoins alimentaires et ainsi absorber toutes sortes de contaminants, y compris les métaux (**Monfort, 2006**). **Ouali et al. (2018)** ont déjà signalé que les eaux de Joinoville (S1) et du port d'Annaba (S2) anoxiques, ce qui peut être dû à la pollution et / ou à la stagnation des eaux dans ces deux stations. Toutefois, ce n'est peut-être pas le cas dans notre étude dont les résultats n'ont pas montré de différence significative dans les paramètres de l'eau entre la station S.t₀ (station avant déploiement) et les trois stations de contrôle. Dans

le cas de notre étude, cette stabilité des taux de Zn et Cd après la transplantation peut être liée à leur biodisponibilité, qui n'a pas montré de variation considérable entre les quatre stations. Il est également possible que ces deux éléments nécessitent plus de temps pour atteindre des niveaux significatifs de bioaccumulation, contrairement au Cu et au Pb.

Chapitre III : Biomarqueurs

Chapitre III : Biomarqueurs

1 INTRODUCTION

Au cours des dernières décennies, les zones côtières ont subi plusieurs changements et de fortes pressions anthropiques (ports, pression urbaine / touristique, résidus villageois, déchets urbains, etc.) causant des effets directs et indirects sur les écosystèmes marins côtiers, la diversité des espèces, les habitats et la dynamique des populations (**Claudet et Frascchetti, 2010; Micheli *et al.*, 2013**). En conséquence, les espèces côtières vivant dans des écosystèmes altérés par l'homme pourraient être affectées par ces activités anthropogéniques et leur survie dépendra de leur capacité d'adaptation aux différentes conditions environnementales.

L'augmentation des polluants organiques et des métaux dans l'eau de mer entraîne une grave préoccupation pour les organismes marins causant plusieurs effets biologiques de l'ordre moléculaire à l'ordre écologique selon le moment d'exposition et les niveaux de concentration (**Jebali *et al.*, 2014**).

Le métabolisme oxydatif des cellules est une source continue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), résultant de la réduction univalente d'O₂, qui peut endommager la plupart des composants cellulaires (**Livingstone, 2001; Regoli *et al.*, 2002**). Les cellules contiennent un réseau complexe de défense antioxydante qui évite les dommages liés à la production de ERO (**Cappello *et al.*, 2016a, b**). Si l'équilibre entre prooxydants et antioxydants est rompu, un stress oxydatif peut survenir et les ERO peuvent endommager les tissus, altérer les fonctions cellulaires et les propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires et enfin, perturber les fonctions vitales (**Manduzio *et al.*, 2005**). Le système antioxydant implique des enzymes telles que la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPX) qui agissent en détoxifiant le ERO généré et la glutathion réductase (GR) qui réduit le disulfure de glutathion (GSSG) en glutathion (GSH), contribuant ainsi à l'entretien de l'état redox cellulaire. Les glutathion S-transférases (GST) contribuent à éliminer les substances xénobiotiques qui peuvent être des contaminants directs ou des produits d'oxydation. Dans les eaux côtières polluées, les organismes vivants sont exposés à des contaminants chimiques et, par conséquent, ces organismes ont développé des adaptations à la présence de ERO en augmentant l'activité des enzymes antioxydantes (**Semedo *et al.*, 2012**).

D'autres biomarqueurs sont également impliqués dans la réponse à un excès de ERO, comme l'MDA qui est un composant résultant de la peroxydation lipidique, qui fonctionne comme un indicateur des dommages causés par une agression oxydante des cellules (**Antunes**

et al., 2010) et l'acétylcholinestérase (AChE) qui est une enzyme cruciale dans le système nerveux des vertébrés et des invertébrés, est la cible fonctionnelle de plusieurs xénobiotiques (**Frasco *et al.*, 2005**).

La biosurveillance environnementale ou écotoxicologique dans un écosystème marin est fondée sur deux approches complémentaires qui sont les bioindicateurs et les biomarqueurs (**Valavanidis *et al.*, 2006**). Ces derniers ayant la faculté d'indiquer les liens entre les contaminants et les réponses écologiques peuvent être utilisés pour mettre en évidence la présence de substances nocives dans l'environnement marin (**Fernandez *et al.*, 2010**). La combinaison de l'analyse chimique et des méthodes des effets biologiques (biomarqueurs) fournit des informations essentielles pour l'établissement de liens entre les réponses au stress et les concentrations de contaminants dans les tissus. En raison des réponses au stress complexes influencées par différents produits chimiques et leurs mélanges, il est important de construire une batterie de biomarqueurs qui représente différentes fonctions et niveaux biologiques (moléculaire / biochimique, subcellulaire / cellulaire, physiologique et individuel) à des fins de surveillance et d'évaluation. Toutefois, les données obtenues sont parfois difficiles à interpréter en raison de la grande quantité de variables naturelles affectant les processus biologiques, qui pourraient agir comme facteurs de confusion sur les réponses des biomarqueurs (**Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2015**). Ainsi, l'utilisation des biomarqueurs nécessite une approche de confiance pour évaluer l'état sanitaire de l'environnement et pour augmenter la possibilité de détection des changements biologiques précoces (**Almamoori *et al.*, 2013**).

La mesure des effets biologiques dans les organismes transplantés dans des cages dans des zones cibles spécifiques a été utilisée avec succès pour évaluer le stress induit par les contaminants dans les environnements côtiers marins dans plusieurs zones d'étude (**Tsangaris *et al.*, 2010**; **Turja *et al.*, 2013**). Ainsi, la méthode de mise en cage permet la surveillance des sites où les populations naturelles des organismes cibles sont limitées, ainsi que le déploiement d'individus provenant de la même population, diminuant ainsi les biais potentiels liés, par exemple, aux différences dans l'état reproductif et nutritionnel d'origine entre les individus et les niveaux de fonds variables de contaminants dans les tissus (**Regoli *et al.*, 2004**). En outre, l'élimination des effets possibles causés par l'adaptation à long terme des populations résidentes à une contamination chronique entraînant une modification de la composition génétique et / ou une modification de la physiologie est également un avantage marqué de la méthode de mise en cage.

Dans ce contexte de biosurveillance de la qualité des eaux du golfe d'Annaba, nous nous sommes intéressés au système antioxydant et neurotoxiques dans les tissus de *P. perna* transplantées au niveau de trois stations de contrôle dans une perspective de validation du protocole expérimental de l'approche de biosurveillance active.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Choix et localisation des stations de contrôle

La description de la zone d'étude et la localisation des stations de transplantations ont été déjà décrites précédemment (chapitre II : 2.1).

2.2 Matériel biologique

Le matériel biologique a déjà été décrit précédemment (chapitre II : 2.2).

2.3 Récupération et traitement des échantillons

La récupération et le traitement des échantillons ont été déjà décrits précédemment (chapitre II : 2.7). Toutes les manipulations de dosage des différents biomarqueurs lors du broyage des tissus des moules ont été réalisées dans de la glace.

2.4 Préparation des tissus de moules pour le dosage des biomarqueurs

Dès le retour au laboratoire, les moules ($n = 5/\text{station}$) ont été disséqués afin de prélever les branchies et les glandes digestives. Ces derniers ont été ensuite conservés dans un congélateur à $- 40 \text{ }^\circ \text{C}$. Après décongélation, les échantillons ont été maintenus à $4 \text{ }^\circ \text{C}$ pendant toute la durée des dosages, puis broyés à l'aide d'un homogénéisateur dans du tampon Tris 20 mM (pH 7.6) contenant 1 mM d'EDTA, 0.5 M de saccharose, 0.15 M de KCl et 1 mM de DTT. L'homogénat a été centrifugé à 9000 g pendant 20 min à $4 \text{ }^\circ \text{C}$. Le surnageant (S9), contenant le cytosol, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les protéines cytotoxiques, a été récupéré pour le dosage biochimique.

La composition et la préparation des produits nécessaires aux dosages sont annexées à la fin du document.

2.4.1 Dosage des protéines

La concentration des biomarqueurs est toujours exprimée par rapport à une quantité de protéines. Pour cette raison, il était nécessaire de doser la quantité de protéines de nos échantillons.

Fort recommandée dans les différentes études de biosurveillance pour la détermination de la concentration en protéines au niveau des différents échantillons, nous avons utilisé la technique de **Bradford, (1976)** basée sur la coloration bleue développée lors de la fixation du bleu brillant de Coomassie (G250) sur les groupements cationiques des protéines. Pour la réalisation de ce dosage, l'albumine de sérum bovin (BSA), qui est utilisée comme protéine

standard, est nécessaire à l'élaboration d'une gamme étalon à six points de concentrations croissantes (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 et 1 mg. ml⁻¹). Nous avons suivi les étapes ci-dessous, pour le dosage des concentrations en protéines au niveau des échantillons ainsi que la gamme étalon :

- Prélever 100 µl de l'échantillon à doser ;
- Ajouter 5 ml du réactif protéique ;
- Mélanger au vortex puis laisser reposer 5 min ;
- Mesurer l'absorbance a une longueur d'onde $\lambda = 595 \text{ nm}$;
- Tracer la droite étalon : Absorbance = f (concentration en protéines) ;
- A partir des résultats obtenus sur la gamme étalon de BSA, chacun des échantillons est alors déduit en tenant compte du facteur de dilution initial ;

La quantité en protéines obtenues est exprimée mg.ml⁻¹. La représentation graphique de la courbe d'étalonnage est représentée en Annexe II.

2.4.2 Dosage du glutathion réduit (GSH)

Le taux du GSH est estimé selon la méthode de **Weckbecker et Cory, (1988)**, basée sur l'absorbance de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2 nitrobenzoïque (DTNB) par le groupement thiol (SH) du glutathion.

Nous avons suivi les étapes ci-dessous, pour le dosage des concentrations du GSH au niveau des échantillons:

- Prélever 0.8 ml de l'échantillon à doser ;
- Ajouter 0.2 ml de la solution d'acide sulfosalicylique à 4% ;
- Homogénéiser puis laisser reposer dans de la glace pendant 15 min ;
- Centrifuger à 10000 tours min⁻¹ pendant 5 min à 0 ° C ;
- Prélever 0.5 ml du surnageant ;
- Ajouter 1 ml du tampon Tris-HCl à l'EDTA ;
- Mélanger, puis ajouter 25 µl du réactif d'Ellman (DTNB) ;
- Laisser agir 5 min, puis mesurer l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 412 \text{ nm}$;
- La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec du tampon Tris-HCl à l'EDTA remplaçant le surnageant ;
- La quantité en GSH est exprimée en fonction de la concentration protéique de l'échantillon en nmol.mg de protéines⁻¹ par la formule suivante :

$$\text{GSH} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525}{13,1 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{C protéines}}$$

DO : Densité optique.

1 : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8 ml homogénat + 0.2 ml de l'acide salicylique).

1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0,5 ml surnageant+1ml Tris-EDTA + 0.025 ml DTNB).

13.1 : Coefficient d'absorbance du groupement –SH à 412 nm.

0.8 et 0.5 : Volumes respectifs de l'homogénat et du surnageant.

C protéines: Concentration des protéines (mg. L⁻¹).

2.4.3 Dosage de la glutathion S-transférase (GST)

L'activité spécifique du glutathion S-transférase a été dosée selon la méthode décrite par **Habig *et al.* (1974)**, cette méthode est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat le 1-Chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) en présence d'un cofacteur le glutathion réduit ; leur conjugaison entraîne la formation d'une nouvelle molécule le 1-(S-Glutathionyl)-2,4-dinitrobenzène qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 340 nm. Les étapes du dosage de l'activité spécifique de la GST sont comme suit :

- Incuber dans un bain-marie le tampon phosphate et les 2 solutions CDNB et GSH à une température de 37 ° C ;
- Introduire dans une cuve en quartz, 840 µl du tampon phosphate, 50 µl de la solution CDNB et 10 µl du surnageant ;
- Mélanger puis ajouter 100 µl de la solution GSH ;
- La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec du tampon Tris-HCl à l'EDTA remplaçant le surnageant, la densité optique est mesurée toutes les minutes durant 5 minutes à une longueur d'onde $\lambda = 340 \text{ nm}$;
- La quantité en GST est exprimée en fonction de la concentration protéique de l'échantillon en nmol.min⁻¹.mg de protéines⁻¹.

L'activité spécifique de la GST est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$GST = \frac{(\Delta DO|_{min}) \times V_t \times F}{\epsilon \times L \times V_s \times C \text{ protéines}}$$

$\Delta DO/min$: Différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

V_t : Volume total où est réalisée la mesure.

V_s : Volume du surnageant.

F : Facteur de dilution.

L : Longueur de la cuve utilisée ($L = 1 \text{ cm}$).

ϵ : Coefficient d'extinction molaire du CDNB ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

$C \text{ protéines}$: Concentration des protéines (mg. L^{-1}).

2.4.4 Dosage de la catalase (CAT)

Le dosage de l'activité spécifique de la catalase a été réalisé selon la méthode décrite par **Saint-Denis *et al.* (1998)**, cette enzyme permet la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène moléculaire (O_2), l'activité de la CAT est mesurée par le suivi de la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (**Baumard *et al.*, 1999**). Nous avons suivi les étapes ci-dessous :

- Remplir la cuve en quartz avec 990 μl du tampon phosphate ;
- Ajouter 500 μl d' H_2O_2 à 5 % ;
- Ajouter 10 μl du surnageant ;
- La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec du tampon Tris-HCl à l'EDTA remplaçant le surnageant, la densité optique est mesurée toutes les 15 secondes durant 1 min à une longueur d'onde $\lambda = 240 \text{ nm}$;
- L'activité spécifique de la CAT est exprimée en fonction de la concentration protéique de l'échantillon en $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg de protéines}^{-1}$.

Elle est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$CAT = \frac{(\Delta DO|_{min}) \times V_t \times F}{\epsilon \times L \times V_s \times C \text{ protéines}}$$

$\Delta DO/min$: Différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

V_t : Volume total où est réalisée la mesure.

V_s : Volume du surnageant.

F : Facteur de dilution.

\mathcal{E} : Coefficient d'extinction molaire de l' H_2O_2 ($\mathcal{E} = -0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

L : Longueur de la cuve utilisée.

2.4.5 Dosage de malondialdéhyde (MDA)

Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode d'**Esterbauer et al. (1992)** qui se base sur la condensation du malondialdéhyde (MDA) en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, (TBA) formant un produit à pigmentation rosâtre. Ce chromogène peut être ainsi mesuré à une longueur d'onde de 530 nm par spectrophotométrie d'absorption.

Le protocole utilisé pour le dosage de la concentration du MDA est le suivant :

- Prélever 0.5 ml de l'homogénat ;
- Ajouter 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) 5 %
- Ajouter 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67 %
- Le mélanger et incuber au bain marie à une température de 90 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et additionner 0.5 ml de surnageant 4 ml de *n*-butanol.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 2500 tours/min
- Récupérer le surnageant, et lire la densité optique à 532 nm contre le blanc préparé dans les mêmes conditions avec du tampon Tris-HCl à l'EDTA remplaçant le surnageant.

Le taux du MDA est déterminé selon la formule suivante :

$$MDA = \frac{DO \times 10^6}{\mathcal{E} \times L \times X \times Fd}$$

DO : Densité optique lue à 532 nm ;

\mathcal{E} : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm ;

X : Concentration de l'extrait en protéines ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) ;

Fd : Facteur de dilution = 0.2083.

2.4.6 Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE)

L'activité spécifique de l'acétylcholinestérase a été dosée selon la méthode décrite par **Ellman *et al.* (1961)**, c'est la méthode de dosage la plus courante, elle consiste à fournir à l'enzyme un substrat l'acétylméthionine (ASCh) dont l'hydrolyse catalysée libère de la thiocholine (SCh), la révélation de l'activité fait intervenir de l'acide 5, 5'- dithiobis - 2 - nitrobenzoïque qui se lie avec les groupements thiols de la SCh, provoquant l'apparition d'une couleur jaune dont l'intensité est fonction de l'activité spécifique de l'AChE (**Bocquené et Galgani, 2004**). La composition et la préparation des produits nécessaires au dosage sont représentées dans l'Annexe II.

Les étapes du dosage de l'activité spécifique de l'AChE sont comme suit :

- Remplir la cuve par 850 µl de Tris 100 mM pH 7.5;
- Ajouter 50 µl du surnageant;
- Ajouter 50 µl du réactif d'Ellman;
- Après une incubation de 5 à 10 min, introduire 50 µl l'acétylthiocholine ;
- La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec du tampon Tris-HCl à l'EDTA remplaçant le surnageant, la densité optique est mesurée toutes les 4 minutes durant 20 minutes à une longueur d'onde $\lambda = 412 \text{ nm}$;
- L'activité spécifique de l'AChE est exprimée en fonction de la concentration protéique de l'échantillon ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de protéines⁻¹).

Elle est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{AChE} = \frac{(\Delta \text{DO}/\text{min}) \times V_t \times F}{\epsilon \times L \times V_s \times C \text{ protéines}}$$

$\Delta \text{DO}/\text{min}$: Différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

V_t : Volume total où est réalisée la mesure.

V_s : Volume du surnageant.

F : Facteur de dilution.

ϵ : Coefficient d'extinction molaire du DTNB ($\epsilon = 1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

L : Longueur de la cuve utilisée ($L = 1 \text{ cm}$).

$C \text{ protéines}$: Concentration des protéines ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

2.5 Analyse statistique

Tous les résultats ont été exprimés en moyenne \pm erreur standard. Les données ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance bidirectionnelle (ANOVA) afin de comparer les

moyennes de chaque biomarqueur dans les moules provenant des quatre stations de notre étude. Des différences significatives ont été déterminées au niveau $p < 0.05$ en utilisant un test de type Tukey. Une analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée pour détecter toute éventuelle corrélation entre les différents biomarqueurs, les paramètres physico-chimiques et le reste des paramètres étudiés. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel STATISTICA (StatSoft.Statistica.v10.0).

3 RESULTATS

3.1 Glutathion réduit (GSH)

La variation des taux du glutathion dans les tissus de *P. perna* sont indiquées dans la figure 35. Avant la transplantation (S.t₀), le taux du glutathion a été estimée à $36,09 \pm 2,54$ nmol.mg de protéine⁻¹ dans la glande digestive et de $37,86 \pm 2,92$ nmol.mg de protéine⁻¹ dans les branchies.

Dans les stations de contrôle il varie entre $19,99 \pm 1,30$ et $34,58 \pm 1,90$ nmol.mg de protéine⁻¹ dans la glande digestive et entre $16,63 \pm 1,6$ et $35,12 \pm 1,78$ nmol.mg de protéine⁻¹ dans les branchies. Pour les deux organes la valeur la plus élevée était enregistrée dans la station S3 et la valeur la plus faible dans la station S2.

L'analyse statistique met en évidence un taux similaire ($p > 0.05$) du taux de glutathion dans les deux organes dans les stations d'étude. Tandis que, ce taux a diminué significativement ($p < 0.05$), après la période de transplantation dans les stations S1 et S2 par rapport aux taux initiaux (S.t₀). Autrement, ce taux n'a montré aucune différence significative après la transplantation dans la station S3.

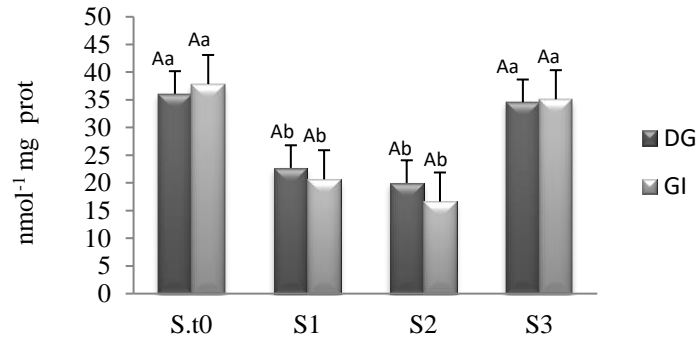


Figure 35. Variation inter-stations et inter-organes de l'activité de GSH.

Les lettres a et b indiquent que la variation inter-stations est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey.

Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

A et B indiquent que la variation inter-organes est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey. Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.2 Glutathion S-transférase (GST)

La variation de l'activité du GST dans les tissus de *P. perna* est indiquée dans la figure 36. Avant la transplantation (S.t₀), l'activité du GST était de $82,06 \pm 6,09$ nmol.mn⁻¹.mg de protéine⁻¹ dans la glande digestive et de $81,57 \pm 8,49$ nmol.mn⁻¹.mg de protéine⁻¹ dans les branchies.

Dans les stations de contrôle elle varie de $88,44 \pm 7,84$ à $84,83 \pm 8,26$ $\text{nmol.mn}^{-1}.\text{mg}$ de protéine⁻¹ dans la glande digestive et de $98,33 \pm 8,77$ à $92,17 \pm 9,93$ $\text{nmol.mn}^{-1}.\text{mg}$ de protéine⁻¹ dans les branchies. Pour les deux organes la valeur la plus élevée était enregistrée au niveau de la station S2 et la valeur la plus faible au niveau de la station S3.

L'analyse statistique met en évidence une activité similaire ($p > 0.05$) de l'activité de GST dans les deux organes dans toutes les stations d'étude. En outre, aucune différence significative ($p > 0.05$), par rapport à l'activité initiale (S.t₀), n'a été marquée dans cette activité dans les trois stations après la transplantation.

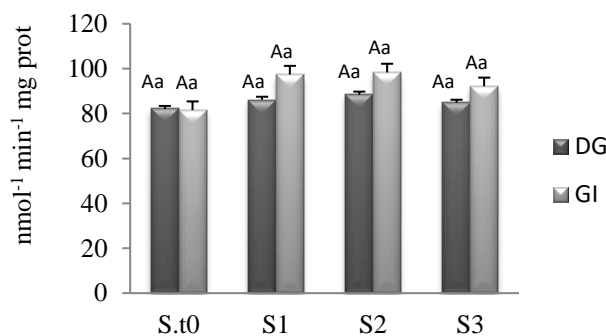


Figure 36. Variation inter-stations et inter-organes de l'activité de GST.

Les lettres a et b indiquent que la variation inter-stations est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey.

Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

A et B indiquent que la variation inter-organes est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey. Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.3 Catalase (CAT)

La variation de l'activité de la CAT dans les tissus de *P. perna* est indiquée dans la figure 37. Avant la transplantation (S.t₀), l'activité de la CAT était de $68,77 \pm 8,31$ $\mu\text{mol.mn}^{-1}.\text{mg}$ de protéine⁻¹ dans la glande digestive et de $67,88 \pm 9,19$ $\mu\text{mol.mn}^{-1}.\text{mg}$ de protéine⁻¹ dans les branchies.

Dans les stations de contrôle elle varie de $78,54 \pm 6,48$ à $72,05 \pm 3,78$ $\mu\text{mol.mn}^{-1}.\text{mg}$ de protéine⁻¹ dans la glande digestive et de $74,07 \pm 7,38$ à $69,36 \pm 10,21$ $\mu\text{mol.mn}^{-1}.\text{mg}$ de protéine⁻¹ dans les branchies. Pour les deux organes la valeur la plus élevée était enregistrée au niveau de la station S2 et la valeur la plus faible au niveau de la station S3.

L'analyse statistique met en évidence une activité similaire ($p > 0.05$) de l'activité de la CAT dans les deux organes dans toutes les stations d'étude. En outre, aucune différence

significative ($p > 0.05$), par rapport à l'activité initiale (S.t₀), n'a été marquée dans cette activité dans les trois stations après la transplantation.

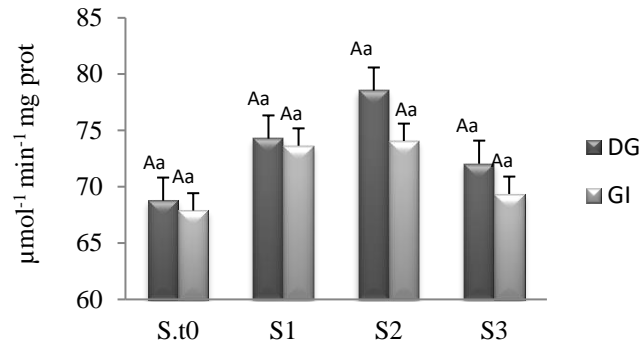


Figure 37. Variation inter-stations et inter-organes de l'activité de CAT.

Les lettres a et b indiquent que la variation inter-stations est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey.

Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

A et B indiquent que la variation inter-organes est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey. Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.4 Malondialdéhyde (MDA)

La variation du taux de l'MDA dans les tissus de *P. perna* est indiquée dans la figure 38. Avant la transplantation (S.t₀), le taux de l'MDA était de $1,04 \pm 0,07$ nmol.mg de protéine⁻¹ dans la glande digestive et de $0,36 \pm 0,09$ nmol.mg de protéine⁻¹ dans les branchies.

Dans les stations de contrôle il variait de $3,36 \pm 0,21$ à $6,08 \pm 0,88$ nmol.mg de protéine⁻¹ dans la glande digestive et de $0,44 \pm 0,003$ à $0,65 \pm 0,08$ nmol.mg de protéine⁻¹ dans les branchies. Pour les deux organes la valeur la plus élevée était enregistrée au niveau de la station S2 et la valeur la plus faible au niveau de la station S3.

L'analyse statistique met en évidence que la concentration de l'MDA été significativement différente ($p < 0.05$) entre les deux organes dans les différents stations de contrôle. Après la période de transplantation, cette concentration a augmenté dans la glande digestive de façon significative ($p < 0.05$) dans les stations S1 et S3 et hautement significative ($p < 0.01$) dans la station S2. Par contre, cette concentration n'a montré aucune différence dans les branchies des moules après transplantation ($p > 0.05$).

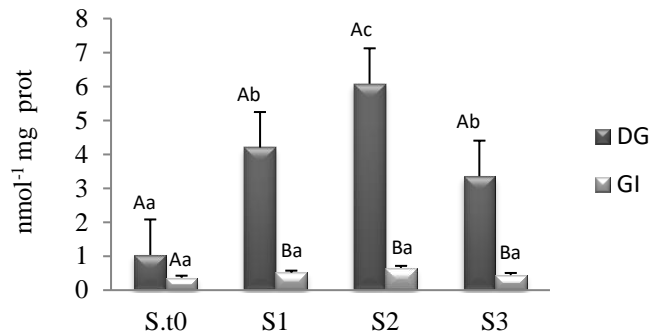


Figure 38. Variation inter-stations et inter-organes de l'activité de MDA.

Les lettres a et b indiquent que la variation inter-stations est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey.

Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

A et B indiquent que la variation inter-organes est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey. Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.5 Acétylcholinestérase (AChE)

La variation de l'activité de l'AChE dans les tissus de *P. perna* est indiquée dans la figure 39. Avant la transplantation (S.t₀), l'activité de l'AChE était de $130,03 \pm 7,4$ nmol.min⁻¹.mg de protéine⁻¹ dans la glande digestive et de $144,20 \pm 10,06$ nmol.min⁻¹.mg de protéine⁻¹ dans les branchies.

Dans les stations de contrôle les concentrations étaient comprises entre $94,43 \pm 8,13$ à $118,54 \pm 6,45$ nmol.min⁻¹.mg de protéine⁻¹ dans la glande digestive et de $65,15 \pm 4,48$ à $91,87 \pm 7,104$ nmol.min⁻¹.mg de protéine⁻¹ dans les branchies. Pour les deux organes la valeur la plus faible a été enregistrée au niveau de la station S2 et la valeur la plus élevée au niveau de la station S3.

L'analyse statistique met en évidence l'absence de différence significative ($p > 0.05$) de l'activité de l'AChE entre les deux organes. Par rapport aux valeurs initiales (S.t₀), cette activité a été significativement inhibé ($p < 0.05$) dans les glandes digestives des moules transplantées dans la station S2 seulement et dans les branchies des moules transplantées dans les trois stations S1, S2 et S3.

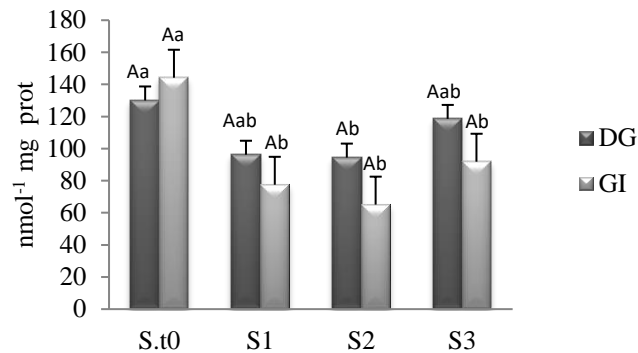


Figure 39. Variation inter-stations et inter-organes de l'activité de AChE.

Les lettres a et b indiquent que la variation inter-stations est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey.

Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

A et B indiquent que la variation inter-organes est significative à $p < 0.05$, en utilisant le test de Tukey. Les histogrammes portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents à $p > 0.05$.

3.6 Analyse en composantes principales

Afin de détecter le chevauchement des différents paramètres étudiés, une analyse multivariée a été effectuée sur les biomarqueurs mesurés dans les glandes digestives et les branchies des moules (GSH, GST, CAT, AChE et MDA), les ETMs au niveau des moules et des sédiments (Cu, Zn, Cd et Pb), l'indice métallique des ETMs dans les moules ainsi que les paramètres physico-chimiques (T° , pH, Sal et O.D) des 4 stations (S.t0, S1, S2 et S3).

Notre ACP (Fig. 40) montre que les deux principales composantes représentent 53,82% de la variation totale. L'axe 1 (37,81 %) est corrélé positivement avec Pb Sed ($r = 0,88$), MDA GD ($r = 0,79$), Cu Mus ($r = 0,77$), Zn Sed ($r = 0,74$), IM Pb ($r = 0,79$), Zn Mus ($r = 0,53$) et négativement avec GSH BRC ($r = - 0,96$), GSH GD ($r = - 0,90$), AChE BRC ($r = - 0,77$) et AChE GD ($r = - 0,70$). Par ailleurs, l'axe 2 (16,01 %) il est construit essentiellement par les fortes corrélations positives des variables IM Zn ($r = 0,72$) et GST BRC ($r = 0,61$), la corrélation négative des variables Cd Mus ($r = - 0,63$), GST GD ($r = - 0,81$) et CAT GD ($r = - 0,83$).

Les résultats de l'ACP illustrés au niveau de la figure (B) sépare les moules de la station S.t0 et celles des autres stations S1, S2 et S3, ce qui reflète d'une part la différence de la qualité des milieux étudiés et d'autre part l'absence d'effets de la contamination des éléments traces présents dans la station S.t0, cette dernière étant en effet géographiquement éloignée du

Hotspot. De plus, les moules transplantées à la station S1 étaient étroitement associées à celles des deux autres stations (S2 et S3) surtout S2.

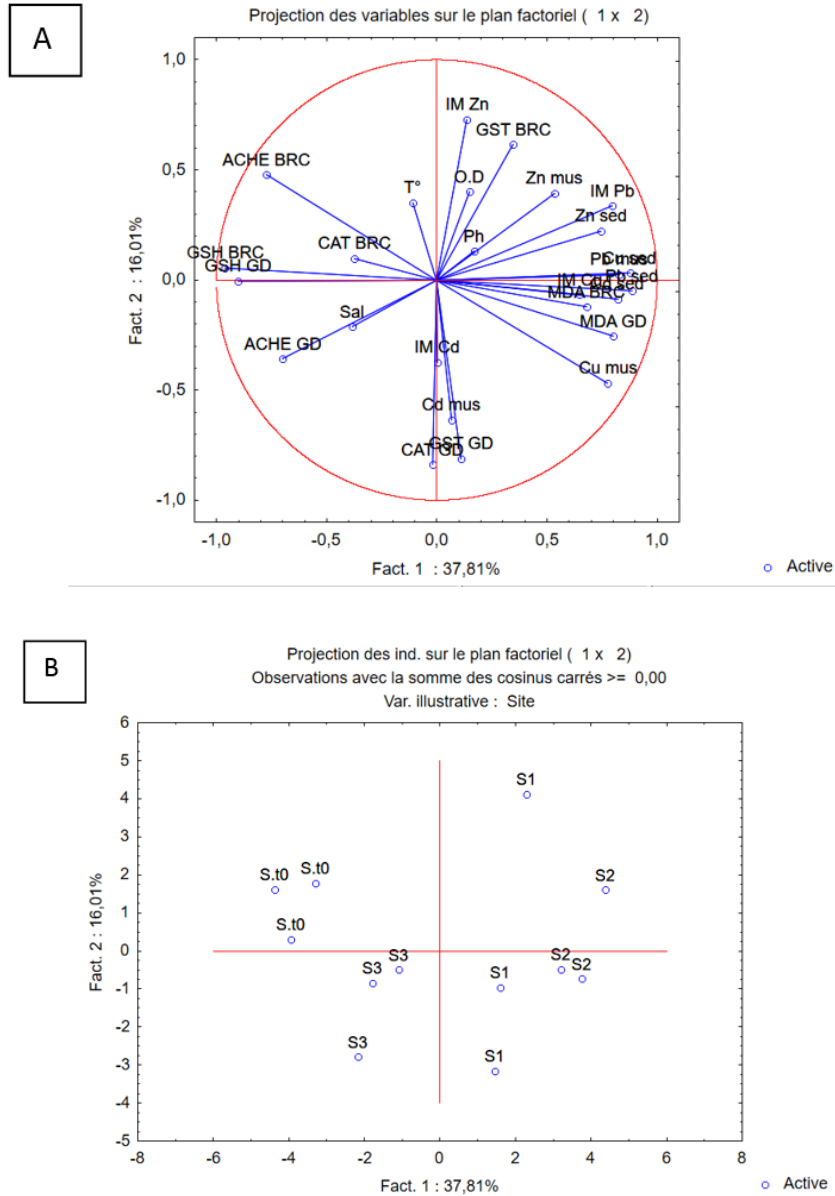


Figure 40. Analyse en composantes principales **A-** corrélation entre les différents paramètres étudiés **B-** corrélation entre les stations d'étude.

4 DISCUSSION

Afin de mieux caractériser la réponse des moules à la contamination par les métaux lourds, cinq biomarqueurs ont été analysés avant (t_0) et après une période de transplantation ($t_1=12$ semaines) dans 3 stations de contrôle dans le golfe d'Annaba. Les résultats des biomarqueurs étaient conformes et complémentaires à ceux des variations des concentrations des métaux dans les tissus des moules.

Le tripeptide GSH a un rôle central dans les processus de défense anti-oxydante intracellulaire en empêchant l'oxydation des protéines grâce à son groupe thiol (**Arrigo, 1999; Sies, 1999**). Ce dernier pourrait être utilisé après l'activation de la glutathion-S-transférase afin de prévenir les dommages cellulaires causés par des niveaux élevés d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**Gismondi et al., 2012**). La diminution du GSH suggère l'initiation du processus de détoxification contre la production de radicaux libres induite par certains xénobiotiques dont les métaux lourds (**Khati et al., 2018**). Cette situation est observée dans cette étude où nous avons observé une réduction significative des niveaux de GSH associée à des niveaux élevés des concentrations des ETMs dans les moules transplantées. Des résultats similaires démontrant la relation entre le niveau de contamination par les ETMs et la diminution des taux de GSH ont été observés chez le gastéropode *S. haemastoma* (**Bouzahouane et al., 2018**), l'huître *Crassostrea virginica* (**Ringwood et al., 2004**), la moule *Perna viridis* exposée aux ETMs (**Verlecar et al., 2007**) et *P. perna* exposée au Cd et au Cu (**Khati et al., 2012**).

L'activité la plus élevée de la GST et de la CAT a été enregistrée dans les moules transplantées dans le port (S2). Parmi les trois stations, ce dernier est considéré comme le plus contaminé par les métaux lourds. En effet, des concentrations élevées des ETMs pourraient stimuler les enzymes antioxydantes (**Sheehan et al., 2001**). Ces deux enzymes semblent avoir des schémas d'élimination similaires pour certains ERO, et en particulier le peroxyde d'hydrogène (**Giarratano et al., 2013**).

L'activité de GST a un rôle crucial dans la phase II des processus de désintoxication des xénobiotiques. Par conséquent, il a été proposé comme biomarqueur pertinent d'exposition chez les poissons, les crustacés et les mollusques (**Bebianno et al., 2007; Bradai et al., 2007**). En outre, plusieurs études ont fait état de niveaux plus élevés de GST dans les organismes marins provenant de sites pollués par rapport à ceux qui peuplent des zones saines (chez *P. perna* par **Sáenz et al., 2010**; chez *Liza aurata* par **Bouzenda et al., 2017**; chez *M.*

galloprovincialis par **Mejdoub et al., 2017**). De nombreux auteurs ont signalé l'induction de cette enzyme chez les invertébrés aquatiques exposés à la pollution métallique (chez *Perinereis nuntia* par **Won et al., 2011**; chez *Helix aspersa* par **Abedl-Halim et al., 2013**; chez *Venerupis philippinarum* par **Zhang et al., 2018** ; chez *Clams ruditapes* par **Saidani et al., 2019**).

La CAT est une enzyme occupant le premier rang des défenses antioxydantes en agissant pour neutraliser les ERO (**Chandurvelan et al., 2015**). Son activité est souvent associée à la production de l'anion superoxyde de radicaux libres H₂O₂ instable et très actif. Cette enzyme a un rôle principal dans la protection des organismes aquatiques contre les radicaux hydroxyles toxiques générés par l'exposition aux métaux lourds (**Valavanidis et al., 2006**; **Chandurvelan et al., 2015**; **Mejdoub et al., 2017**). Ainsi, cette enzyme a été approuvée par de nombreux auteurs pour l'évaluation du stress oxydatif causé par des facteurs biologiques et environnementaux, comme c'est le cas chez les organismes suivants : *D. trunculus* (**Bensouda et Soltani-Mazouni, 2014**), *P. cultrifera* (**Guemouda et al., 2014**), *P. perna* (**El-Jourmi et al., 2015**), *P. lividus* (**Amri et al., 2017**) et *M. galloprovincialis* (**Balbi et al., 2017**).

Dans une étude réalisée dans le golfe d'Annaba, **Bouzahouane et al. (2018)** ont constaté une activité simultanée de CAT et de GST chez *S. haemastoma* avec une concentration maximale entre le printemps et l'été juste avant le frai, comme c'est le cas dans notre étude. Des observations similaires chez la moule *Perna viridis* ont été notées par **Verlecar et al. (2007)** qui ont suggéré que l'augmentation du métabolisme à cette période de l'année entraîne d'avantage de formation des ERO, et donc une augmentation de l'activité de ces enzymes antioxydantes.

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme importante pour le processus de neurotransmission, dont le rôle principal est la dégradation de l'acétylcholine en choline et acétyl-Coa. En effet, le stress généré dans un organisme par certaines substances chimiques telles que les métaux lourds peut inhiber l'activité de cette enzyme très sensible. Ceci est connu comme l'effet neurotoxique d'un xénobiotique (**Grintzalis et al., 2012**; **Vidal-Linan et al., 2015**). De plus, d'autres auteurs ont rapporté que l'inhibition de l'activité AChE est positivement corrélée à la quantité de polluants présents dans l'environnement (**Devi et al., 1995**; **Magni et al., 2006**; **Richetti et al., 2011**; **Boucetta et al., 2016**). Cette constatation apparaît clairement dans cette présente étude où une inhibition significative de l'activité AChE dans les deux organes (branchie et glande digestive) a été enregistrée chez *P. perna* transplantées dans les trois stations. L'ordre des groupes en fonction du degré d'inhibition est

similaire à celui de la bioaccumulation des métaux ($S2 > S1 > S3$). Le degré d'inhibition le plus élevé a été enregistré dans les tissus de *P. perna* transplantés dans le port (S2), et le plus bas était dans celles de la plage La Caroube (S3) qui était la station la moins contaminée par les ETMs. Par ailleurs, les résultats sur l'activité de ce biomarqueur de neurotoxicité sont conformes avec ceux des biomarqueurs de stress oxydatif. Nos résultats sont similaires à ceux observés chez *M. galloprovincialis* transplantés dans le port d'Oran (**Taleb et al., 2009**) et dans la zone industrielle d'Augusta au Sud-Est de la Sicile (**Maisano et al., 2016**). D'autres résultats similaires indiquant une corrélation entre l'inhibition de cette enzyme et l'exposition à la pollution par les métaux lourds ont également été observés chez des moules indigènes provenant des zones industrialisées de différentes régions (**Lionetto et al., 2003; Casas, 2005; Benghali, 2006; Magni et al., 2006; Taleb et al., 2007**).

En fait, l'effet neurotoxique s'accompagne souvent de dommages dans le compartiment lipidique des cellules par le processus de peroxydation. Cela peut augmenter la concentration de MDA. La formation de ce composé est considérée comme un signe précoce de l'endommagement de la membrane cellulaire par des espèces radicalaires, alors que son contenu peut indiquer le degré d'exposition. Par conséquent, la concentration de MDA peut être utilisée comme biomarqueur du stress causé par les polluants chimiques (**Del Rio et al., 2005; Lykkesfeldt, 2007**). Nos résultats ont révélé une augmentation significative de la teneur en MDA dans les trois groupes de moules après la période de transplantation, en particulier celles du port (S2). Cependant, l'augmentation de ce composé n'était significative que dans la glande digestive mais pas dans les branchies. Cela suggère que les tissus de la glande digestive accumulent plus de métaux trace que ceux des branchies. En effet, **Livingstone (1991)** a déjà suggéré que les moules peuvent fortement concentrer les polluants chimiques dans leur tube digestif. Des résultats similaires aux nôtres rapportant une corrélation positive entre l'accumulation de métaux lourds et l'augmentation de la concentration de MDA ont été observés chez *Cerastoderma edule* (**Bergayou et al., 2009**), *P. perna* (**Khati et al., 2012**) et chez *S. haemastoma* (**Bouzahouane et al., 2018**).

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Cette étude qui fait partie d'un programme national de recherche sur la biosurveillance permanente du golfe d'Annaba a permis de mettre en évidence la présence de contaminants chimiques dans le sédiment et la moule *P. perna* transplantée pendant 12 semaines dans 3 stations différentes exposés à différents degrés de pollution (Joinoville, Port d'Annaba, La Caroube). La quatrième station, la plage Lahnaya, a été choisie comme station de référence en raison de son éloignement des actions anthropiques.

Les résultats obtenus ont révélé que le port et la plage de Joinoville sont les principales sources de pollution métallique de la région, et que cette contamination devient moins intense en s'éloignant de ces deux stations comme c'est le cas de la plage La Caroube.

L'évaluation des concentrations des métaux traces dans les moules transplantées ainsi que la variation de leur état physiologique (approche multimarqueurs) pourraient être utilisées comme outil prédictif pour surveiller la contamination par les métaux traces dans le golfe d'Annaba surtout dans les stations où il n'est possible d'utiliser des organismes indigènes.

En respectant, par exemple, les valeurs guides de l'USEPA et le suivi officiel de la sécurité alimentaire des coquillages en France, les teneurs élevées en Cu et Pb constituent une menace potentielle pour la biodiversité de notre zone d'étude et même pour la santé humaine. Cette situation préoccupante exige par conséquent des mesures urgentes de prévention et de lutte contre ces déversements non contrôlés et parfois abusifs de polluants chimiques toxiques qui pourraient avoir des impacts néfastes sur les habitats et la biodiversité marine côtière du golfe d'Annaba. Il est inadmissible de nos jours que les eaux usées domestiques et d'origine industrielle soient rejetées directement en mer sans traitement préalable.

A l'échelle régionale, il devient impératif que la communauté scientifique via ses centres de recherche spécialisés et ses laboratoires universitaires ainsi que toutes les institutions chargées de la protection de l'environnement marin s'impliquent directement ou indirectement dans les projets internationaux de lutte et prévention de la pollution marine dans le bassin méditerranéen, comme c'est le cas du plan d'action PAMEx, 2030 initié par l'UICN lors de son dernier Congrès Mondial pour la Nature qui s'est déroulé en septembre 2021. Il a été démontré dans de nombreux travaux la fiabilité des résultats en utilisant comme matériel biologique les organismes marins côtiers filtreurs. Cette mise en œuvre de programmes de coopération sur le biomonitoring marin permettra certainement de capitaliser de nombreuses informations précieuses en vue de trouver des solutions adéquates à ces problèmes de pollution qui ne cesse d'affecter les écosystèmes côtiers, comme c'est le cas du golfe

d'Annaba qui est exposé actuellement à de nombreuses sources de contamination (domestiques et industrielles).

Cette investigation mérite d'être élargie à l'ensemble des secteurs côtiers de l'Est algérien soumis aux actions anthropiques afin de dresser une cartographie précise des sites anthropisés ou susceptibles de l'être dans le proche avenir si des mesures préventives ne sont pas mises en œuvre par les institutions compétentes. L'inventaire des sites pollués est l'une des informations fondamentales à mettre à la disposition des gestionnaires pour la gestion des zones marines côtières et la proposition d'aires protégées (AMP).

Nous encourageons particulièrement l'utilisation de la méthode de transplantation d'organismes filtreurs dans les programmes de biosurveillance. Cette mise en cage d'invertébrés filtreurs a pour avantage de fournir des réponses fiables et rapides sur le degré de contamination des sites anthropisés le long des côtes sud de la Méditerranée. De telles informations pourraient faciliter les prises de décision par les gestionnaires environnementaux face à des situations de pollution marine.

L'étude de la contamination par les ETMs devrait s'étendre à d'autres éléments toxiques (Cr, Hg, As, Fe, etc.) et menée sur divers organismes filtreurs vagiles et sessiles à des fins de comparaison. L'impact des contaminants devrait être recherché dans les territoires anatomiques cibles, comme les branchies, l'hépatopancréas, les gonades et le muscle et aussi en tenant compte de l'état physiologique de l'animal (âge, sexe, etc.). En effet, les mécanismes de bioaccumulation et d'amplification varient sensiblement en fonction des espèces et des paramètres physiologiques précités. Pour conforter les résultats de contamination par les ETMs, il serait souhaitable d'associer des analyses histologiques et biochimiques pour mieux évaluer l'effet de la pollution métalliques chez les organismes. De telles études pourraient être menées aussi sur de nouveaux polluants tels que les hydrocarbures et les polychlorobiphényles. Enfin, l'évaluation de la contamination chimique par le dosage d'autres biomarqueurs plus sensibles (exp : métallothionéine) et par l'étude des biomarqueurs de génotoxicité (test des comètes, test des micronoyaux) constituent aussi des alternatives.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- Aarab N., (2004).** Les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves: de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain, sciences de l'environnement. Thèse de doctorat, Ecotoxicologie des milieux aquatique, Université Bordeaux 1, 276 p.
- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., & Andersen, O. K. (2000).** PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic toxicology*, 51(2), 241-258.
- Abada-Boudjema, Y. M., (1983).** Etude dynamique de deux populations de moules *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) et *Perna perna* (L.) de Bordj El Kiffan (Baie d'Alger). Thèse 3^{ème} cycle, USTHB, Alger, 155p.
- Abdel-Halim, K. Y., El-Saad, A. A., Talha, M. M., Hussein, A. A., & Bakry, N. M. (2013).** Oxidative stress on land snail *Helix aspersa* as a sentinel organism for ecotoxicological effects of urban pollution with heavy metals. *Chemosphere*, 93(6), 1131-1138.
- Abdenour, C., Smith, B. D., Boulakoud, M. S., Samraoui, B., & Rainbow, P. S. (2000).** Trace metals in shrimps and sediments from Algerian water. *Journal of Materials and Environmental Science*, 3, 9-12.
- Abdenour, C., Drif, F., Boulakoud, M.S., & Ounissi, M. (2010).** Trace metals in the mussel *Donax trunculus* of Annaba estuaries, Algeria. *Oceanography*, 1: 15-20.
- ABRMC. (1991).** Pollution du Rhône. Synthèse des connaissances, Ministère de l'Environnement Français. Lyon: Agence du Bassin du Rhône Méditerranée Corse 'ABRMC'.
- Adams, W. J., Kimerle, R. A., & Barnett Jr, J. W. (1992).** Sediment quality and aquatic life assessment. *Environmental science & technology*, 26(10), 1864-1875.
- Added, A., Ben Mammou, A., Abdeljaoued, S., Essouni, N., & Fernex, F. (2003).** Caractérisation géochimique des sédiments de surface du golfe de Tunis. *Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer de Salammbô*, 30, 135-142.
- Almamoori, A. M. J., Salman, J.M., Hughes, R., & Al-Saadi, A.A.H. (2013).** Biochemical changes in two species of molluscs as environmental biomarkers of pollution in Hilla river, Iraq. *I.J.S.N.* 4 : 40-43.
- Al-Samman, T. (2015).** Effect of heavy metal impurities in secondary Mg alloys on the microstructure and mechanical properties during deformation', *Materials & Design*, 65: 983-88.
- Amiard, J. C., & Amiard-Triquet, C. (2008).** Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier Tec & Doc, Paris, 375p.
- Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., & Rainbow, P. S. (2006).** Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic toxicology*, 76(2), 160-202.
- Amiard-Triquet, C., Burgeot, T., & Claisse, D. (1999).** La surveillance de la qualité du milieu marin: l'expérience du Réseau National d'Observation (RNO) et le développement de biomarqueurs. *Océanis*, 25(4), 651-684.
- Amira, A., Merad, I., Almeida, C. M. R., Guimarães, L., & Soltani, N. (2018).** Seasonal variation in biomarker responses of *Donax trunculus* from the Gulf of Annaba (Algeria): implication of metal accumulation in sediments. *Comptes Rendus Geoscience*, 350(4), 173-179.
- Amri, S., Samar, M. F., Sellem, F., & Ouali, K. (2017).** Seasonal antioxidant responses in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816) used as a bioindicator of the environmental contamination in the South-East Mediterranean. *Marine pollution bulletin*, 122(1-2), 392-402.
- Andral, B. & Alzieu, C. (2004).** Emploi d'une méthode de transplantation de mollusques pour l'évaluation de l'impact des immersions des sédiments drogues. IFREMER. Centre de Toulon. La Seyne sur mer.

- Andral, B., Stanisiere, J. Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., & Boissery, P. (2004).** Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin*, 49(9-10), 704-712.
- André, J.M. (1988).** Recherche en écotoxicologie marine sur la contamination des Delphinidés par les micropolluants. Tracer les métaux et les composés organochlorés. Thèse de doctorat. Es sciences. Université de Bordeaux: 282 p
- Antunes, S. C., Marques, S. M., Pereira, R., Gonçalves, F., & Nunes, B. (2010).** Testing procedures for the determination of several biomarkers in different species, for environmental assessment of pollution. *Journal of Environmental Monitoring*, 12(8), 1625-1630.
- Arrigo, A. P. (1999).** Gene expression and the thiol redox state. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9-10), 936-944.
- Asubiojo, O. I., Nkono, N. A., Ogunsua, A. O., Oluwole, A. F., Ward, N. I., Akanle, O. A., & Spyrou, N. M. (1997).** Trace elements in drinking and groundwater samples in Southern Nigeria. *Science of the total environment*, 208(1-2), 1-8.
- Atgin, R. S., El-Agha, O., Zararsız, A., Kocataş, A., Parlak, H., & Tuncel, G. (2000).** Investigation of the sediment pollution in Izmir Bay: trace elements. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 55(7), 1151-1164.
- Bahnasawy, M., Khidr, A. A., & Dheina, N. (2009).** Seasonal variations of heavy metals concentrations in mullet, *Mugil cephalus* and *Liza ramada* (Mugilidae) from Lake Manzala, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 13(2), 81-100.
- Bainy, A. C. D., Almeida, E. A., Müller, I. C., Ventura, E. C., & Medeiros, I. D. (2000).** Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Marine Environmental Research*, 50(1-5), 411-416.
- Balbi, T., Fabbri, R., Montagna, M., Camisassi, G., & Canesi, L. (2017).** Seasonal variability of different biomarkers in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) farmed at different sites of the Gulf of La Spezia, Ligurian sea, Italy. *Marine pollution bulletin*, 116(1-2), 348-356.
- Balk, L., Hylland, K., Hansson, T., Berntssen, M. H., Beyer, J., Jonsson, G., Melbye, A., Grung, M., Torstensen, B.E., Borseth, J.F.,...& Klungsøyr, J. (2011).** Biomarkers in natural fish populations indicate adverse biological effects of offshore oil production. *PLoS One*, 6(5), e19735.
- Balls, P. W., Hull, S., Miller, B. S., Pirie, J. M., & Proctor, W. (1997).** Trace metal in Scottish estuarine and coastal sediments. *Marine pollution bulletin*, 34(1), 42-50.
- Banum, S.J.(1982).** Introduction to Organic and Biological Chemistry Third ed., Macmillan Publishing Co., New York, NY, p. 541.
- Bardi, U. (2010).** Extracting minerals from seawater: an energy analysis. *Sustainability*, 2(4), 980-992.
- Barrell, D.C. (1975).** Atomic Spectrophotometer Analysis of Heavy Metals Pollutants in Water, Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor, MI, p. 25.
- Bastami, K. D., Afkhami, M., Mohammadzadeh, M., Ehsanpour, M., Chambari, S., Aghaei, S., ...& Baniamam, M. (2015).** Bioaccumulation and ecological risk assessment of heavy metals in the sediments and mullet *Liza klunzingeri* in the northern part of the Persian Gulf. *Marine pollution bulletin*, 94(1-2), 329-334.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Dizer, H., & Hansen, P. D. (1999).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Marine Environmental Research*, 47(1), 17-47.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J. F., Burgeot, T., Michel, X., & Bellocq, J. (1999).** Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus sp.*) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Marine Environmental Research*, 47(5), 415-439.

- Baussant, T., Sanni, S., Jonsson, G., Skadsheim, A., & BØRSETH, J. F. (2001).** Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 1. Bioconcentration in two marine species and in semipermeable membrane devices during chronic exposure to dispersed crude oil. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(6), 1175-1184.
- Bebianno, M. J., Lopes, B., Guerra, L., Hoarau, P., & Ferreira, A. M. (2007).** Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: effect of abiotic factors. *Environment International*, 33(4), 550-558.
- Bedrin, A. G., Bubnov, I. A., Dashuk, S. P., & Mironov, I. S. (2003).** Compact spectral analyzer of heavy-metal impurities in air. *Journal of Optical Technology*, 70(4), 234-237.
- Belabed, B. E., Djabourabi, A., & Bensouilah, M. (2008).** Teneurs en Plomb, Cadmium, Mercure et Zinc relevées dans la chair de la moule, *Perna perna*, dans le littoral d'Annaba. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 18, 12-22.
- Belabed, B. E., Meddour, A., Samraoui, B., & Chenchouni, H. (2017).** Modeling seasonal and spatial contamination of surface waters and upper sediments with trace metal elements across industrialized urban areas of the Seybouse watershed in North Africa. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(6), 265.
- 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), 85-90.
- Belhaouari, B., Rouane-Hacene, O., Bouhadiba, S., & Boutiba, Z. (2011).** Utilisation d'un Gastéropode marin *Osilinus turbinatus* en biosurveillance marine: application aux métaux lourds du littoral algérien occidental. *J. Sci. Hal. Aquat*, 3, 89-96.
- Benali, I., Boutiba, Z., Grandjean, D., De Alencastro, L. F., Rouane-Hacene, O., & Chèvre, N. (2017).** Spatial distribution and biological effects of trace metals (Cu, Zn, Pb, Cd) and organic micropollutants (PCBs, PAHs) in mussels *Mytilus galloprovincialis* along the Algerian west coast. *Marine Pollution Bulletin*, 115(1-2), 539-550.
- Benali, I., Boutiba, Z., Merabet, A., & Chèvre, N. (2015).** Integrated use of biomarkers and condition indices in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for monitoring pollution and development of biomarker index to assess the potential toxic of coastal sites. *Marine pollution bulletin*, 95(1), 385-394.
- Benghali, S.M.E.A. (2006).** Biosurveillance de la pollution marine sur la côte ouest algérienne par la mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, la moule *Paracentrus lividus* et la patelle *Patella coerulea*. *Sciences de l'environnement*, p. 83
- Benguedda-Rahal, W. (2012).** Contribution à l'étude de la bioaccumulation métallique dans les sédiments et différents maillons de la chaîne trophique du littoral Extrême Ouest Algérien. *Thèses de doctorat ; Université de Tlemcen, Algérie*. 117 p.
- Bensafia, N., & Khati, W. (2018).** Seasonal variations in four trace metals (Cu, Zn, Pb, Cd) in sponges *Sarcotragus spinosulus* of the Gulf of Annaba, Northeast Algeria. *AAFL Bioflux*, 11(3), 937.
- Bensouda, L., & Soltani-Mazouni, N. (2014).** Measure of oxidative stress and neurotoxicity biomarkers in *Donax trunculus* from the gulf of Annaba (Algeria): case of the year 2012. *Annual Research & Review in Biology*, 1902-1914.
- Bergayou, H., Mouneyrac, C., Pellerin, J., & Moukrim, A. (2009).** Oxidative stress responses in bivalves (*Scrobicularia plana*, *Cerastoderma edule*) from the Oued Souss estuary (Morocco). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3), 765-769.
- Berthet, B. (2008).** Les espèces sentinelles. *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*, 121-48.
- Bervoets, L., Voets, J., Covaci, A., Chu, S., Qadah, D., Smolders, R., Schepens & Blust, R. (2005).** Use of transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the

- bioavailability of microcontaminants in Flemish surface waters. *Environmental science & technology*, 39(6), 1492-1505.
- Besse, J. P., Geffard, O., & Coquery, M. (2012).** Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 36, 113-127.
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., ...& Schøyen, M. (2017).** Blue mussels (*Mytilus edulis spp.*) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: a review. *Marine environmental research*, 130, 338-365.
- Blanchette, B. N., & Singh, B. R. (1999).** Purification and characterization of the glutathione S-transferases from the northern quahog *Mercinaria mercinaria*. *Marine biotechnology*, 1(1), 74-80.
- Blandin, P. (1986).** Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bulletin d'écologie*, 17(4), 215-307.
- Blazer, V. S., Iwanowicz, L. R., Henderson, H., Mazik, P. M., Jenkins, J. A., Alvarez, D. A., & Young, J. A. (2012).** Reproductive endocrine disruption in smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*) in the Potomac River basin: spatial and temporal comparisons of biological effects. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(7), 4309-4334.
- Bocquené, G. (2002).** Bilan ponctuel de la présence et des effets des pesticides en milieu littoral martiniquais en 2002. le Robert : IFREMER, p.39.
- Bocquené, G., & Galgani, F. (2004).** Les marqueurs biologiques des effets des polluants: l'acétylcholinestérase. Editions Quae. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin, p.28.
- Bocquené, G., Galgani, F., & Walker, C. H. (1997).** Les cholinestérases, biomarqueurs de neurotoxicité. *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*, 43, 209-240.
- Bolognesi, C., & Cirillo, S. (2014).** Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Current Zoology*, 60(2), 273-284.
- Borja, A., Bricker, S. B., Dauer, D. M., Demetriades, N. T., Ferreira, J. G., Forbes, A. T., & Zhu, C. (2008).** Overview of integrative tools and methods in assessing ecological integrity in estuarine and coastal systems worldwide. *Marine pollution bulletin*, 56(9), 1519-1537.
- Boucetta, S., Beldi, H., & Draredja, B. (2016).** Effects of metal pollution on the activities of Acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Phorcus (Osilinus) turbinatus* (Gastropoda, Trochidae) of the coast East-Algerian. *Advances in Environmental Biology*, 10(5), 46-61.
- Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Vincent-Hubert, F., Palais, F., Geffard, A., Biagianti-Risbourg, S., Pain-Devin, S., & Tusseau-Vuillemin, M. H. (2010).** Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: an integrated ecotoxicological assessment. *Environmental toxicology*, 25(5), 468-478.
- Boust, D. (1981).** *Les métaux-traces dans l'estuaire de la Seine et ses abords* (Doctoral dissertation, Commissariat à l'Energie Atomique).
- Boutabia-Trea, S., 2016.** *Posidonia oceanica* (L) Delile, bioindicateur de la pollution métallique du golfe d'Annaba (Nord-Est Algerien). Thèse de doctorat. Option : biologie végétale. Université de Badji Mokhtar. Annaba. Algérie. p.246. Disponible sur : <http://biblio.univ-annaba.dz>.
- Boutiba, Z., Zoheír, T. M., & El Amine, A. A. S. (2003).** Etat de la pollution marine de la côte oranaise. Dar el gharb. Algérie, pp: 69
- Bouzahouane, H., Barour, C., Sleimi, N., & Ouali, K. (2018).** Multi-biomarkers approach to the assessment of the southeastern Mediterranean Sea health status: Preliminary study on *Stramonita haemastoma* used as a bioindicator for metal contamination. *Chemosphere*, 207, 725-741.

- Bouzenda, R., & Khebbeb, N. S. M. E. H. (2017).** Assessment of pollution in the Gulf of Annaba (Algeria) by monthly measurements of two biomarkers in a fish species *Liza aurata*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(1), 366-372.
- Bowen, M. J. M., 1966:** Trace elements in biochemistry. -Academic Press, New York, 241 pp.
- Bradai, M.N., Bouaroui, L., Menif, L., Hamza, A., 2007.** First records of two clingfishes species: *Opeatogynus gracilis* and *Lepadogaster candollei* (Pisces, Gobiesocidae) in the gulf of Gabes (Tunisia). *Bulletin du Muséum d'histoire naturelle de Marseille. Mésogée* 63,7-9.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2) : 248-254
- Broeg, K., Westernhagen, H. V., Zander, S., Körting, W., & Köhler, A. (2005).** The “bioeffect assessment index” (BAI): a concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine pollution bulletin*, 50(5), 495-503.
- Buccolieri, A., Buccolieri, G., Cardellicchio, N., Dell'Atti, A., Di Leo, A., & Maci, A. (2006).** Heavy metals in marine sediments of Taranto Gulf (Ionian Sea, southern Italy). *Marine chemistry*, 99(1-4), 227-235.
- Buggy, C. J., & Tobin, J. M. (2008).** Seasonal and spatial distribution of metals in surface sediment of an urban estuary. *Environmental Pollution*, 155(2), 308-319.
- Butler P.A., Andren L., Bonde G.J., Jernelov A., Reisch D.J. (1971).** Monitoring organisms. FAO conference on marine pollution and its effect on living resources and fishing, Rome. FAO fisheries reports, 99(S1), 101-112.
- Cabane, F. (2007).** Lexique d'écologie, d'environnement et d'aménagement du littoral. Version 13. IFREMER. Documentation sur l'Environnement et de l'Aménagement du Littoral, p. 283.
- Caccia, V. G., Millero, F. J., & Palanques, A. (2003).** The distribution of trace metals in Florida Bay sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 46(11), 1420-1433.
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., & Viarengo, A.(2000).** The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, 247, 295-311.
- Calamari, D., Naeve, H. (1994).** Review of Pollution in the African Aquatic Environment. Committee for Inland Fisheries of Africa (CIFA) Technical Paper 25, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.
- Cappello, T., Brandão, F., Guilherme, S., Santos, M.A., Maisano, M., Mauceri, A., Canário, J., Pacheco, M., Pereira, P. (2016a).** Insights into the mechanisms underlying mercury induced oxidative stress in gills of wild fish (*Liza aurata*) combining 1H NMR metabolomics and conventional biochemical assays. *Sci. Total Environ.* 548-549, 13-24.
- Cappello, T., Mauceri, A., Corsaro, C., Maisano, M., Parrino, V., Paro, G. L., & Fasulo, S. (2013).** Impact of environmental pollution on caged mussels *Mytilus galloprovincialis* using NMR-based metabolomics. *Marine pollution bulletin*, 77(1-2), 132-139.
- Cappello, T., Pereira, P., Maisano, M., Mauceri, A., Pacheco, M., Fasulo, S.(2016b).** Advances in understanding the mechanisms of mercury toxicity in wild golden grey mullet (*Liza aurata*) by 1H NMR-based metabolomics. *Environ. Pollut.* 219, 139-148.
- Casas, S. (2005).** Modélisation de la bioaccumulation des métaux traces «Hg, Cd, Pb, Zn et Cu» dans la moule *Mytilus galloprovincialis* en milieu méditerranéen. Thèse de doctorat en bioocéanologie, milieu marin, Université du sud toulon var, 356 p
- Chafik, A. (2001).** Qualité physicochimique des eaux côtières et bioaccumulation métallique chez la moule *Mytilus galloprovincialis* sur le littoral atlantique marocain. *Aquatic Living Resources*, 14(4), 239-249
- Chandurvelan, R., Marsden, I. D., Glover, C. N., & Gaw, S. (2015).** Assessment of a mussel as a metal bioindicator of coastal contamination: relationships between metal bioaccumulation and multiple biomarker responses. *Science of the Total Environment*, 511, 663-675.

- Chase, M. E., Jones, S. H., Hennigar, P., Sowles, J., Harding, G. C. H., Freeman, K., ... & Taylor, D. (2001).** Gulfwatch: Monitoring spatial and temporal patterns of trace metal and organic contaminants in the Gulf of Maine (1991–1997) with the blue mussel, *Mytilus edulis* L. *Marine Pollution Bulletin*, 42(6), 490-504.
- Chesman, B. S., O'hara, S., Burt, G. R., & Langston, W. J. (2007).** Hepatic metallothionein and total oxyradical scavenging capacity in Atlantic cod *Gadus morhua* caged in open sea contamination gradients. *Aquatic Toxicology*, 84(3), 310-320.
- Chiffolleau, J. F., Claisse D., Cossa D., Ficht A., Gonzalez G., Guyot T., Michel P., Miramand P., Oger C., Petit F. (2001).** La contamination métallique, Rapport du Programme scientifique Seine-Aval, p. 39.
- Chraïbi, N., Gheit, A., Benazzou, L., & Sadak, A. (1999).** Evaluation de la contamination par les métaux lourds chez les mytilidés: *Perna perna* (L.) et *Mytilus galloprovincialis* Lmk. des côtes marocaines. *Haliotis (Paris)*, 29, 11-26.
- Christophoridis, C., Dedepsidis, D., & Fytianos, K. (2009).** Occurrence and distribution of selected heavy metals in the surface sediments of Thermaikos Gulf, N. Greece. Assessment using pollution indicators. *Journal of hazardous materials*, 168(2-3), 1082-1091.
- Ciacci, C., Canonico, B., Bilaničová, D., Fabbri, R., Cortese, K., Gallo, G., & Canesi, L. (2012).** Immunomodulation by different types of N-oxides in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One*, 7(5), e36937.
- Claisse, D. (2001).** Mise en place du RNO aux Antilles-Définition des points de prélèvement et du programme de surveillance.
- Claisse, D. (1995).** Surveillance du milieu marin «Les métaux lourds dans les sédiments de la baie de Seine». *Travaux Du RNO*, 25.
- Claisse, D., Joanny, M., & Quintin, J. Y. (1992).** Le réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO). *Analisis*, 20(6), 19– 23.
- Claudet, J., & Frascetti, S. (2010).** Human-driven impacts on marine habitats: a regional meta-analysis in the Mediterranean Sea. *Biological Conservation*, 143(9), 2195-2206.
- Çoğun, H. Y., Yüzerog̃lu, T. A., Fırat, Ö., Gök, G., & Kargın, F. (2006).** Metal concentrations in fish species from the northeast Mediterranean Sea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 121, 431–438.
- Cohen, T., Hee, S. S. Q., & Ambrose, R. F. (2001).** Trace metals in fish and invertebrates of three California coastal wetlands. *Marine Pollution Bulletin*, 42(3), 224-232.
- Connon, R.E., D'Abronzio, L.S., Hotstetter, N.J., Javidmehr, A., Roby, D.D., Evans, A.F., Loge, F.J., Werner, I. (2012).** Transcription profiling in environmental diagnostics: health assessments in Columbia River basin steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Sci Technol* 46:6081–6087.
- Conrad, S., Odentaal, J., Snyman, R. (2014).** An analysis of historical Mussel Watch Programme data from the west coast of the cape Peninsula, Cape Town. *Marine Pollution Bulletin*. 87 (1-2), 374-380.
- Cooper, N. L., & Bidwell, J. R. (2006).** Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, after exposure to an organophosphate insecticide. *Aquatic toxicology*, 76(3-4), 258-267.
- Cosson, R. P., Amiard, J. C., & Amiard-Triquet, C. (1988).** Trace elements in little egrets and flamingos of Camargue, France. *Ecotoxicology and environmental safety*, 15(1), 107-116.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M. C., & Vasseur, P. (1997).** Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques. *Biomarqueurs en écotoxicologie*, 149-163.
- Cristina Fossi, M., & Marsili, L. (1997).** The use of non destructive biomarkers in the study of marine mammals. *Biomarkers*, 2(4), 205-216.
- Dabrowska, H., Kopko, O., Turja, R., Lehtonen, K. K., Góra, A., Polak-Juszczak, L., Warzocha, J., & Kholodkevich, S. (2013).** Sediment contaminants and contaminant levels

- and biomarkers in caged mussels (*Mytilus trossulus*) in the southern Baltic Sea. *Marine environmental research*, 84, 1-9.
- Dauberschmidt, C., Dietrich, D. R., & Schlatter, C. (1997).** Esterases in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*: activities, inhibition, and binding to organophosphates. *Aquatic Toxicology*, 37(4), 295-305.
- Davenport, R. (1993).** Additional records of *Perna perna* (Linnaeus, 1758) on the Texas coast. *Tex Conchol*, 30, 3-4.
- Davies, R. P., & Dobbs, A. J. (1984).** The prediction of bioconcentration in fish. *Water research*, 18(10), 1253-1262.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005).** A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 15(4), 316-328.
- Dellali, M., Romeo, M., & Aissa, P. (2001).** Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. *Oceanologica acta*, 24(3), 263-271.
- Denslow, N. D., Kocerha, J., Sepúlveda, M. S., Gross, T., & Holm, S. E. (2004).** Gene expression fingerprints of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to pulp and paper mill effluents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552(1-2), 19-34.
- Derbal, F. (2007).** L'ichtyofaune des côtes de l'est algérien: écologie de quatre téléostéens (*diplodus cervinus cervinus*, *D. Puntazzo*, *Sciaena umbra*, *Epinephelus costae*) et contribution à la biologie du sar tambour *Diplodus cervinus cervinus* (LOWE,1838). Thèse de Doctorat. Option : biologie et écologie des populations. Université de Badji Mokhtar. Annaba. Algérie. p. 213. Disponible sur : <http://biblio.univ-annaba.dz>.
- Devauchelle, N. (2002).** Bilans de santé des organismes et des écosystèmes marins. Quels signaux biologiques mesurer? Ifremer.
- 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. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 55, 746-750.
- Di Leo, A., Annicchiarico, C., Cardellicchio, N., Spada, L., Giandomenico, S. (2013).** Trace metal distributions in *Posidonia oceanica* and sediments from Taranto Gulf (Ionian Sea, Southern Italy). *Mediterranean Marine Science*, 14(1), 204-213.
- Diop, M., Howsam, M., Diop, C., Cazier, F., Goossens, J.F., Diouf, A., Amara, R. (2016).** Spatial and seasonal variations of trace elements concentrations in liver and muscle of round Sardinelle (*Sardinella aurita*) and Senegalese sole (*Solea senegalensis*) along the Senegalese coast. *Chemosphere* 144:758-766. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.085>
- Downs, C. A., Richmond, R. H., Mendiola, W. J., Rougee, L., & Ostrander, G. K. (2006).** Cellular physiological effects of the MV Kyowa Violet fuel-oil spill on the hard coral, *Porites lobata*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(12), 3171-3180.
- Duman, F., & Kar, M. (2012).** Temporal variation of metals in water, sediment and tissues of the European Chup (*Squalius cephalus* L.). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 89(2), 428-433.
- EC. (2015).** Commission Regulation (EU) 2015/1005 of amending Regulation (EC). No. 1881/2006 as regards maximum levels of lead in certain food stuffs. Off. J. Eur. Union Available from URL. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/uri=CELEX:32015R1005>
- Edge, K. J., Johnston, E. L., Roach, A. C., & Ringwood, A. H. (2012).** Indicators of environmental stress: cellular biomarkers and reproductive responses in the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). *Ecotoxicology*, 21(5), 1415-1425.

- Edmond, J. M., Spivack, A., Grant, B. C., Ming-Hui, H., Zexiam, C., Sung, C., & Xiushau, Z. (1985).** Chemical dynamics of the Changjiang estuary. *Continental Shelf Research*, 4(1-2), 17-36.
- Eisler, R. (1981).** *Trace metal concentrations in marine organisms* (p. 685). Oxford: Pergamon Press.
- El Jourmi, L., Amine, A., Boutaleb, N., Abouakil, N., Lazar, S., & El Antri, S. (2015).** The use of biomarkers (catalase and malondialdehyde) in marine pollution monitoring: Spatial variability. *J. Mater. Environ. Sci*, 6, 1592-1595.
- El Zrelli, R., Courjault-Radé, P., Rabaoui, L., Castet, S., Michel, S., & Bejaoui, N. (2015).** Heavy metal contamination and ecological risk assessment in the surface sediments of the coastal area surrounding the industrial complex of Gabes city, Gulf of Gabes, SE Tunisia. *Marine pollution bulletin*, 101(2), 922-929.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., & Jürgens, G. (1992).** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(4), 341-390.
- Farombi, E. O., Adelowo, O. A., & Ajimoko, Y. R. (2007).** Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *International journal of Environmental research and Public health*, 4(2), 158-165.
- Farrington, J. W., Tripp, B. W., Tanabe, S., Subramanian, A., Sericano, J. L., Wade, T. L., & Knap, A. H. (2016).** Edward D. Goldberg's proposal of "the mussel watch": reflections after 40 years. *Marine pollution bulletin*, 110(1), 501-510.
- Farrington, J. W., Tripp, B. W., Tanabe, S., Subramanian, A., Sericano, J. L., Wade, T. L., & Knap, A. H. (2016).** Edward D. Goldberg's proposal of "the mussel watch": reflections after 40 years. *Marine pollution bulletin*, 110(1), 501-510.
- Fasulo, S., Iacono, F., Cappello, T., Corsaro, C., Maisano, M., D'Agata, A., ... & Mauceri, A. (2012).** Metabolomic investigation of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) caged in aquatic environments. *Ecotoxicology and environmental safety*, 84, 139-146.
- Feldstein, T., Kashman, Y., Abelson, A., Fishelson, L., Mokady, O., Bresler, V., et al. (2003).** Marine molluscs in environmental monitoring. III. Trace metals and organic pollutants in animal tissue and sediments. *Helgoland Marine Research*, 57, 212-219.
- Fernández, B., Campillo, J. A., Martínez-Gómez, C., & Benedicto, J. (2010).** Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. *Aquatic Toxicology*, 99(2), 186-197.
- Fischer, H. (1984).** Cadmium body burden/shell weight of mussels: a precise index for environmental monitoring. *Coun. Meet. Int. Explor. Sea CM-ICESRE.*, 41, 1-19.
- Fisher, 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. Vol 1. Végétaux et Invertébrés. Publication FAO et commission de communautés européennes. Rome, FAO, Vol. 1, p. 760.
- Flammarion, P., Noury, P., & Garric, J. (2002).** The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution*, 120(2), 325-330.
- Foley, V., & Sheehan, D. (1998).** Glutathione S-transferases of the yeast *Yarrowia lipolytica* have unusually large molecular mass. *Biochemical journal*, 333(3), 839-845.
- Förstner, U. (1982).** Accumulative phases for heavy metals in limnic sediments. *Hydrobiologia*, 91(1), 269-284.

- Fossi, C., & Leonzio, C. (1993).** *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. CRC Press. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 261–285.
- Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F., & Guilhermino, L. (2005).** Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, 10(5), 360-375
- Frenzilli, G., Nigro, M., Scarcelli, V., Gorbi, S., & Regoli, F. (2001).** DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. *Aquatic Toxicology*, 53(1), 19-32.
- Fu, F., & Wang, Q. (2011).** Removal of heavy metal ions from waste waters: a review. *Journal of environmental management*, 92(3), 407-418.
- Fulton, M. H., & Key, P. B. (2001).** Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(1), 37-45.
- Galgani, F., & Bocquene, G. (1990).** In vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 45(2), 243-249.
- Galloway, T. S., Brown, R. J., Browne, M. A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M. B., & Depledge, M. H. (2004).** A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environmental Science & Technology*, 38(6), 1723-1731.
- Gao, X., & Chen, C. T. A. (2012).** Heavy metal pollution status in surface sediments of the coastal Bohai Bay. *Water research*, 46(6), 1901-1911.
- Garbarino, J. R., Hayes, H., Roth, D., Antweider, R., Brinton, T. I., & Taylor, H. (1995).** Contaminants in the Mississippi river. *US geological survey circular*, 1133.
- Garvey, J. E., Owen, H. A., & Winner, R. W. (1991).** Toxicity of copper to the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae), as affected by humic substances of terrestrial and freshwater origin. *Aquatic Toxicology*, 19(2), 89-96.
- Genestra, M. (2007).** Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular signalling*, 19(9), 1807-1819.
- George, S. G., & Buchanan, G. (1990).** Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione S-transferases. *Fish physiology and biochemistry*, 8(6), 437-449.
- GESAMP (IMO/FAO/Unesco/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution), 1989.** Long-term consequences of low-level effects of marine contamination: An analytic approach. Rep. Stud. GESAMP (40), 14 p.
- GESAMP, 2009.** Pollution in the Opean Ocean: A Review of Assessments and Related Studies; International Maritime Organization: London, UK, 2009; p. 64.
- Giarratano, E., Gil, M. N., & Malanga, G. (2011).** Seasonal and pollution-induced variations in biomarkers of transplanted mussels within the Beagle Channel. *Marine pollution bulletin*, 62(6), 1337-1344.
- Giarratano, E., Gil, M. N., & Malanga, G. (2013).** Assessment of antioxidant responses and trace metal accumulation by digestive gland of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* from Northern Patagonia. *Ecotoxicology and environmental safety*, 92, 39-50.
- GIS, Posidonie. (1996).** Groupement d'Internet Scientifique d'études et de protection de l'environnement marin. Biologie méditerranéenne, nuisance et pollution.
- Gismondi, E., Beisel, J. N., & Cossu-Leguille, C. (2012).** Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. *Environmental Research*, 118, 47-52.
- Goldberg, E. D. (1954).** Marine Geochemistry 1. Chemical Scavengers of the Sea. *The Journal of Geology*, 62(3), 249–265.
- Goldberg, E. D. (1975).** The mussel watch a first step in global marine monitoring. *Marine pollution bulletin*, 6, 111-113.

- Goldberg, E. D. (1980).** The international mussel watch. *National Academy of Sciences, Washington, DC.*
- Goldberg, E. D., & Bertine, K. K. (2000).** Beyond the mussel watch—new directions for monitoring marine pollution. *Science of the Total Environment, 247(2-3)*, 165-174.
- Goldberg, E. D., Bowen, V. T., Farrington, J. W., Harvey, G., Martin, J. H., Parker, P. L., Risebrough, R. W., Robertson, W., Schneider, E. & Gamble, E. (1978).** The mussel watch. *Environmental conservation, 5(2)*, 101-125.
- Goldberg, E. D., Koide, M., Hodge, V., Flegal, A. R., & Martin, J. (1983).** U.S. Mussel Watch: 1977–1978 results on trace metals and radionuclides. *Estuarine, Coastal and Shelf Science, 16(1)*, 69–93.
- Goldberg, E. D. (1986).** The mussel watch concept. *Environmental Monitoring and Assessment, 7(1)*, 91-103.
- Gonçalves, E.P.R., & Boaventura, R. (1991).** Sediments as indicators of the river Ave Contamination by heavy metals. Raposa, Integrated Approaches to Water Pollution Problems (pp. 209–218). London: Elsevier
- González-Fernández, C., Albentosa, M., Campillo, J. A., Viñas, L., Romero, D., Franco, A., & Bellas, J. (2015).** Effect of nutritive status on *Mytilus galloprovincialis* pollution biomarkers: implications for large-scale monitoring programs. *Aquatic Toxicology, 167*, 90-105.
- Gosling, E.M. (1992).** Systematics and geographic distribution of *Mytilus*. In: Gosling EM (ed), *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands
- Gravez, V., Bernard, G. (2006).** Pollution marine : Les définitions. www.com.univ-mrs.fr.
- Green-Ruiz, C., & Páez-Osuna, F. (2001).** Heavy metal anomalies in lagoon sediments related to intensive agriculture in Altata-Ensenada del Pabellón coastal system (SE Gulf of California). *Environment International, 26(4)*, 265-273.
- Grintzalis, K., Georgiou, C. D., & Dailianis, S. (2012).** Total thiol redox status as a potent biomarker of PAH-mediated effects on mussels. *Marine environmental research, 81*, 26-34.
- Grumiaux, F., Demuyne, S., Lepretre, A., & Dhainaut-Courtois, N. (1997).** Teneurs métalliques et organiques dans les sédiments et effets sur les communautés benthiques dans deux cours d'eau représentatifs de la région Nord/Pas-de-Calais. In *Contaminated soils. Third International Conference on the Biogeochemistry of trace elements*. R. PROST Ed., INRA, CD-Rom, Paris.
- Gueddah, D. (2003).** Evaluation de la pollution industrielle et urbaine dans la région de Skikda : impact sur l'écosystème marin côtier. *Thèse de Magister. Université de Annaba.*
- Guemouda, M., Meghlaoui, Z., Daas, T., Daas-Maamcha, O., & Scaps, P. (2014).** Monitoring pollution in East Algerian coasts using biochemical markers in the polychaete annelid *Perinereis cultrifera*. *Annals of Biological Research, 5(2)*, 31-40.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974).** Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry, 249(22)*, 7130-7139.
- Hafsaoui, I., Draredja, B., Lasota, R., Como, S., & Magni, P. (2016).** Population dynamics and secondary production of *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) in the Gulf of Annaba (Northeast Algeria). *Mediterranean Marine Science, 17(3)*, 738-750.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015).** *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hicks, D. W. (1995).** Ecological notes and patterns of dispersal in the recently introduced mussel, *Perna perna* (Linne, 1758), in the Gulf of Mexico. *Am. Malacol. Bull., 11(2)*, 203-206.
- Hicks, D. W., Tunnell Jr, J. W., & McMahon, R. F. (2001).** Population dynamics of the nonindigenous brown mussel *Perna perna* in the Gulf of Mexico compared to other world-wide populations. *Marine Ecology Progress Series, 211*, 181-192.

- Hirst, D. M. (1962).** The geochemistry of modern sediments from the Gulf of Paria—II The location and distribution of trace elements. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 26(11), 1147-1187.
- Holdren, C., Harte, J., Schneider, R., Shirley, C. (1991).** A guides to commonly encountered toxics”. In: Harte J, Holdren C, Schneider R, Shirley C (eds.) *Toxics A to Z – a guide to every day pollution hazards*. University of California Press, Berkeley, pp. 244–247, 436–438.
- Hong, S. H., Park, H. J., & Kong, K. H. (1999).** Purification and biochemical properties of glutathione S-transferase from *Oryza sativa*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 122(1), 21-27.
- Hook, S. E. (2010).** Promise and progress in environmental genomics: a status report on the applications of gene expression-based microarray studies in ecologically relevant fish species. *Journal of fish biology*, 77(9), 1999-2022.
- Hook, S. E., Skillman, A. D., Small, J. A., & Schultz, I. R. (2006).** Gene expression patterns in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to a suite of model toxicants. *Aquatic Toxicology*, 77(4), 372-385. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/4195/>
- Hu, H. (2002).** Human health and heavy metals exposure. *Life support: the environment and human health*, 65-82.
- Hugget, R. J., Kimerle, R. A., Mehrle, P. M., & Bergman, H. L. (1992).** Biomarkers Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress, *SETAC Special Publication Series. Lewis Publ., Boca Raton*. 5-17.
- Ibrahim, A. A., & Omar, H. M. (2013).** Seasonal variation of heavy metals accumulation in muscles of the African Catfish *Clarias gariepinus* and in River Nile water and sediments at Assiut Governorate, Egypt. *J Biol Earth Sci*, 3(2), B236-B248.
- Idhalla, M., Bouhaimi, A., Zekhnini, A., Narbonne, J. F., & Mathieu, M. (1997).** Etude du cycle de reproduction de deux espèces de moules *Perna perna* (Linné, 1758) et *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 dans la baie d'Agadir (Sud du Maroc). *Haliotis (Paris)*, 26, 51-62.
- IFREMER, 2006.** Rapport d'activités 2005 du département « biogéochimie et écotoxicologie » [.r.int.dcn-be/2006.05/Nantes](http://r.int.dcn-be/2006.05/Nantes).
- Islam, S., Ahmed, K., & Masunaga, S. (2015).** Potential ecological risk of hazardous elements in different land-use urban soils of Bangladesh. *Science of the Total Environment*, 512, 94-102.
- Jayawardena, U. A., Angunawela, P., Wickramasinghe, D. D., Ratnasooriya, W. D., & Udagama, P. V. (2017).** Heavy metal–induced toxicity in the Indian green frog: Biochemical and histopathological alterations. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(10), 2855-2867.
- Jebali, J., Chouba, L., Banni, M., & Boussetta, H. (2014).** Comparative study of the bioaccumulation and elimination of trace metals (Cd, Pb, Zn, Mn and Fe) in the digestive gland, gills and muscle of bivalve *Pinna nobilis* during a field transplant experiment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(2), 212-217.
- Jiang, Z., Xu, N., Liu, B., Zhou, L., Wang, J., Wang, C., & Xiong, W. (2018).** Metal concentrations and risk assessment in water, sediment and economic fish species with various habitat preferences and trophic guilds from Lake Caizi, Southeast China. *Ecotoxicology and environmental Safety*, 157, 1-8.
- Johnson, L. L., Lomax, D. P., Myers, M. S., Olson, O. P., Sol, S. Y., O'Neill, S. M., & Collier, T. K. (2008).** Xenoestrogen exposure and effects in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, WA. *Aquatic Toxicology*, 88(1), 29-38.
- Jović, M., & Stanković, S. (2014).** Human exposure to trace metals and possible public health risks via consumption of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic coastal area. *Food and chemical toxicology*, 70, 241-251.

- Kabata-Pendias, A., & Pendias, H. (1992).** Trace elements in soils and plants—CRC Press. *Boca Raton, FL*, 356.
- Kalantzi, I., Black, K. D., Pergantis, S. A., Shimmield, T. M., Papageorgiou, N., Sevastou, K., & Karakassis, I. (2013).** Metals and other elements in tissues of wild fish from fish farms and comparison with farmed species in sites with oxic and anoxic sediments. *Food chemistry*, *141*(2), 680-694.
- Kamel, N. (2014).** Effets combinés des facteurs environnementaux et des polluants chimiques chez la moule *Mytilus galloprovincialis* : Harmonisation des biomarqueurs d'exposition suivant les recommandations OSPAR et MEDPOL. Thèse de Doctorat. Université de Nantes, 190 p.
- Kamisaka, K., Habig, W. H., Ketley, J. N., Arias, I. M., & Jakoby, W. B. (1975).** Multiple forms of human glutathione S-transferase and their affinity for bilirubin. *European journal of biochemistry*, *60*(1), 153-161.
- Karageorgis, A. P., Sioulas, A. I., & Anagnostou, C. L. (2001).** Use of surface sediments in Pagassitikos Gulf, Greece, to detect anthropogenic influence. *Geo-Marine Letters*, *21*(4), 200-211.
- Kelly, K. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H., & Levin, E. D. (1998).** Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental health perspectives*, *106*(7), 375-384.
- Khammar, H. (2007).** Caracteres chimiques des effluents urbains introduits au littoral d'annaba (Doctoral dissertation, Université de Annaba-Badji Mokhtar).
- Khan, F. R., Irving, J. R., Bury, N. R., & Hogstrand, C. (2011).** Differential tolerance of two *Gammarus pulex* populations transplanted from different metallogenic regions to a polymetal gradient. *Aquatic Toxicology*, *102*(1-2), 95-103.
- Khati, W., Bensafia, N., Ouali, K., Derbal, F. (2018).** Sponges (Porifera) as bioindicator species of environmental stress from de Gulf of Annaba (Algeria). *Biodiversity Journal*, 2018, 9 (4): 319–324.
- Khati, W., Ouali, K., Mouneyrac, C., & Banaoui, A. (2012).** Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use in biomonitoring. *Energy Procedia*, *18*, 784-794.
- 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.
- Klumpp, D. W., Huasheng, H., Humphrey, C., Xinhong, W., & Codi, S. (2002).** Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China.: I. Organic pollutants in mussel and fish tissues. *Marine pollution bulletin*, *44*(8), 752-760.
- Krauskopf, K. B. (1956).** Factors controlling the concentrations of thirteen rare metals in seawater. *Geochimica et cosmochimica acta*, *9*(1-2), 1-B32.
- Krishna Das, (2006).** Ecotoxicologie Marine et Biochimie de la pollution. Programme de cours 2006-2007. Université de Liège.
- Krystofova, O., Shestivska, V., Galiova, M., Novotny, K., Kaiser, J., Zehnalek, J., Babula, P., Opatrilova, R., Adam, V., & Kizek, R. (2009).** Sunflower plants as bioindicators of environmental pollution with lead (II) ions. *Sensors*, *9*(7), 5040-5058.
- Labrot, F., Ribera, D., Denis, M. S., & Narbonne, J. F. (1996).** In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, *1*(1), 21-28.
- Lacaze J-C., et Ramade F., 1993.** La dégradation de l'environnement côtier, conséquences écologiques. Edition Masson. Paris. p129.
- Laetz, C. A., Baldwin, D. H., Collier, T. K., Hebert, V., Stark, J. D., & Scholz, N. L. (2009).** The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the

- conservation of endangered Pacific salmon. *Environmental health perspectives*, 117(3), 348-353.
- Lagadic, L., Caquet, T., & Amiard, J. C. (1997).** Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions (introduction).
- Lane, T. W., & Morel, F. M. (2000).** A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4627-4631.
- LCHF, (1976).** Extension du port d'Annaba. Etude générale des conditions naturelles dans le golfe (synthèse finale du LCHF), p : 50. In : Derbal, F., 2007. L'ichtyofaune des côtes de l'est algérien: écologie de quatre téléostéens (*dipodus cervinus cervinus*, *D. Puntazzo*, *Sciaena umbra*, *Epinephelus costae*) et contribution à la biologie du sar tambour *Dipodus cervinus cervinus* (LOWE, 1838). Thèse de Doctorat. Option : biologie et écologie des populations. Université de Badji Mokhtar. Annaba. Algérie. p.213.
- LeBlanc, G. A., & Cochrane, B. J. (1987).** Identification of multiple glutathione S-transferases from *Daphnia magna*. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 88(1), 39-45.
- Lee, R. F., & Anderson, J. W. (2005).** Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, 50(7), 705-723.
- Li, F., Lin, J. Q., Liang, Y. Y., Gan, H. Y., Zeng, X. Y., Duan, Z. P., Liang, K., Liu, X., Huo, Z.H., & Wu, C. H. (2014).** Coastal surface sediment quality assessment in *Leizhou Peninsula* (South China Sea) based on SEM-AVS analysis. *Marine pollution bulletin*, 84(1-2), 424-436.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Pascariello, M. F., Marinosci, L., & Schettino, T. (2003).** Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollution Bulletin*, 46(3), 324-330.
- Livingstone, D. R. (2001).** Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine pollution bulletin*, 42(8), 656-666.
- Livingstone, D.R. (1991).** Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrate. *Advanced Comparative Environmental and physiology*. 7: 45-187
- Lubet, P. (1959).** Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés. *Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes*. Nantes, 23 (3) : pp. 384-548.
- Lykkesfeldt, J. (2007).** Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica chimica acta*, 380(1-2), 50-58.
- Maanan, M., Saddik, M., Maanan, M., Chaibi, M., Assobhei, O., & Zourarah, B. (2015).** Environmental and ecological risk assessment of heavy metals in sediments of Nador lagoon, Morocco. *Ecological Indicators*, 48, 616-626.
- Mackay, D., & Fraser, A. (2000).** Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental pollution*, 110(3), 375-391.
- Magni, P., De Falco, G., Falugi, C., Franzoni, M., Monteverde, M., Perrone, E., & Bolognesi, C. (2006).** Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). *Environmental pollution*, 142(1), 65-72.
- Maisano, M., Cappello, T., Oliva, S., Natalotto, A., Giannetto, A., Parrino, V., Battaglia P, Romeo T, Salvo A, Spanò N, & Mauceri, A. (2016).** PCB and OCP accumulation and evidence of hepatic alteration in the Atlantic bluefin tuna, *T. thynnus*, from the Mediterranean Sea. *Marine environmental research*, 121, 40-48.
- Marchand, M. (2002).** Pollution marine et contamination chimique. Peut-on éliminer les substances chimiques dangereuses du milieu marin ? IFREMER, DEL/PC.

- Martin, R., Rose, D., Yu, K., & Barros, S. (2006).** Toxicogenomics strategies for predicting drug toxicity. *Pharmacogenomics* 7:1003–1016.
- Martínez-Gómez, C., Fernández, B., Valdés, J., Campillo, J. A., Benedicto, J., Sánchez, F., & Vethaak, A. D. (2009).** Evaluation of three-year monitoring with biomarkers in fish following the Prestige oil spill (N Spain). *Chemosphere*, 74(5), 613-620.
- Martinez-Lara, E., George, S. G., Lopez-Barea, J., & Bárcena, J. A. (1997).** Purification and characterization of multiple glutathione transferase isoenzymes from grey mullet liver. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 53(9), 759-768.
- Matozzo, V., Tomei, A., & Marin, M. G. (2005).** Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Marine pollution bulletin*, 50(12), 1686-1693.
- Mejdoub, Z., Fahde, A., Loutfi, M., & Kabine, M. (2017).** Oxidative stress responses of the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to emissary's pollution in coastal areas of Casablanca. *Ocean & Coastal Management*, 136, 95-103.
- Merad, I., & Soltani, N. (2017).** Sublethal effects of cadmium on energy reserves in the edible Mollusk *Donax trunculus*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, , 5(1), 100-105.
- Metcalf-Smith, J. L. (1994).** Influence of species and sex on metal residues in freshwater mussels (family Unionidae) from the St. Lawrence River, with implications for biomonitoring programs. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 13(9), 1433-1443.
- Meylan, W. M., Howard, P. H., Boethling, R. S., Aronson, D., Printup, H., & Gouchie, S. (1999).** Improved method for estimating bioconcentration/bioaccumulation factor from octanol/water partition coefficient. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(4), 664-672.
- Michelet, F., Gueguen, R., Leroy, P., Wellman, M., Nicolas, A., & Siest, G. (1995).** Blood and plasma glutathione measured in healthy subjects by HPLC: relation to sex, aging, biological variables, and life habits. *Clinical chemistry*, 41(10), 1509-1517.
- Micheli, F., Halpern, B. S., Walbridge, S., Ciriaco, S., Ferretti, F., Frascchetti, S., Lewison, R., Nykjaer, L., & Rosenberg, A. A. (2013).** Cumulative human impacts on Mediterranean and Black Sea marine ecosystems: assessing current pressures and opportunities. *PloS one*, 8(12), e79889.
- Miquel, M. (2001).** Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Rapport Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (Dir.). Rapport Sénat n° 261. France, 360 p.
- Mitra, A., Trivedi, S., Gupta, A., Chaudhuri, A., & Choudhury, K. (1996).** Distribution of trace metals in the sediments from Hooghly estuary, India. *Pollution Research*, 15, 137-141.
- Monfort, P. (2006).** Microbiologie et coquillages. *Direction des Opérations: Laboratoire Environnement Ressources-Concarneau*, 18.
- Moore, M. N., Viarengo, A. G., Somerfield, P. J., & Sforzini, S. (2013).** Linking lysosomal biomarkers and ecotoxicological effects at higher biological levels. *Ecological biomarkers: Indicators of ecotoxicological effects. Boca Raton (FL): CRC. p*, 107-130.
- Mouchel, J.M., Thévenot, D. (2003).** Support de cours d'Ecotoxicologie du CEREV « Centre d'Enseignement et de Recherche Eau Ville environnement ».
- Mucha, A. P., Vasconcelos, M. T. S., & Bordalo, A. A. (2003).** Macrobenthic community in the Douro estuary: relations with trace metals and natural sediment characteristics. *Environmental pollution*, 121(2), 169-180.
- Myers, M. S., Landahl, J. T., Krahn, M. M., & McCain, B. B. (1991).** Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the US West Coast. *Environmental Health Perspectives*, 90, 7-15.

- Myers, M. S., Stehr, C. M., Olson, O. P., Johnson, L. L., McCain, B. B., Chan, S. L., & Varanasi, U. (1994).** Relationships between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in English sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the Pacific Coast, USA. *Environmental Health Perspectives*, 102(2), 200-215.
- Nadem, S., El-Baghdadi M., Rais J., Barakat A. (2015).** Evaluation of heavy metal contamination of sediments of the estuary of the Bouregreg (Atlantic Coast, Morocco). *J.Mater. Environ. Sci.* 6 (11) : 3338-3345.
- Nakhle, K. F. (2003).** Le mercure, le cadmium et le plomb dans les eaux littorales libanaises : Apports et suivi au moyen de bioindicateurs quantitatifs (Eponges, bivalves et gastéropodes). Thèse de doctorat. Interactions toxiques dans les écosystèmes. Université Paris 7, p. 246.
- Nasernejad, B., Zadeh, T. E., Pour, B. B., Bygi, M. E., & Zamani, A. (2005).** Comparison for biosorption modeling of heavy metals (Cr (III), Cu (II), Zn (II)) adsorption from wastewater by carrot residues. *Process biochemistry*, 40(3-4), 1319-1322.
- National Research Council. (1987).** Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, 74, 3-9.
- Norgate, T. E., Jahanshahi, S., & Rankin, W. J. (2007).** Assessing the environmental impact of metal production processes. *Journal of Cleaner Production*, 15(8-9), 838-848.
- Nouri, J., Karbassi, A. R., & Mirkia, S. (2008).** Environmental management of coastal regions in the Caspian Sea. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 5(1), 43-52.
- Nouri, J., Mahvi, A. H., Babaei, A., & Ahmadpour, E. (2006).** Regional pattern distribution of groundwater fluoride in the Shush aquifer of Khuzestan County, Iran. *Fluoride*, 39(4), 321.
- OCDE (1994)** Exigences en matière de données pour l'homologation des pesticides dans les pays membres de l'OCDE: résultats d'enquêtes. Signaler. Organisation de coopération et de développement économiques, Série sur les pesticides n ° 1, Paris
- Odzak, N. Zvonaric, T., Kljakovic-Gaspic, Z., Horvat, M. and Baric, A. (2001).** Biomonitoring of copper, cadmium, lead, zinc and chromium in the Kastela bay using transplanted mussels. *Fres. Environ. Bull.*, Vol. 10, pp 37-41.
- OMS (2007)** Risques pour la santé des métaux lourds provenant de la pollution atmosphérique transfrontière à longue distance. Organisation mondiale de la Santé 2007. Bureau régional de l'OMS pour l'Europe Copenhague, Danemark ISBN 978 92 890 7179 6
- Onundi, Y. B., Mamun, A. A., Al Khatib, M. F., & Ahmed, Y. M. (2010).** Adsorption of copper, nickel and lead ions from synthetic semiconductor industrial wastewater by palm shell activated carbon. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 7(4), 751-758.
- OSPAR (2002)** Cadmium. Hazardous substances series. OSPAR Commission 2002. OSPAR publication number 151/2002
- Otto, D. M. E., & Moon, T. W. (1996).** Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31(1), 141-147.
- Ouali, N., Belabed, B. E., Zeghdoudi, F., & Rachedi, M. (2018).** Assessment of metallic contamination in sediment and mullet fish (*Mugil cephalus* Linnaeus, 1758) tissues from the East Algerian coast. *Journal of Water and Land Development*.
- Ounissi, M., Ziouch, O. R., & Aounallah, O. (2014).** Variability of the dissolved nutrient (N, P, Si) concentrations in the Bay of Annaba in relation to the inputs of the Seybouse and Mafragh estuaries. *Marine pollution bulletin*, 80(1-2), 234-244.
- Ozdemir E., Ugur S. et Kaimaki A., 1998.** Heavy metal concentrations in some molluscs and in superficial sediments from Izmir Bay (Turkey). *Rapports de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée*, 35 (2).

- Pampanin, D. M., Marangon, I., Volpato, E., Campesan, G., & Nasci, C. (2005).** Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Italy). *Environmental Pollution*, 136(1), 103-107.
- Pasteur-Humbert C. , 1962.** Les mollusques marins testacés du Maroc: Les Lamellibranches et les Scaphopodes. *Trav. Inst. Sci. Chérif., sér. Zool.* n° 28 : 184 p.
- Patil, V. K., & David, M. (2013).** Oxidative stress in freshwater fish, *Labeo rohita* as a biomarker of malathion exposure. *Environmental monitoring and assessment*, 185(12), 10191-10199.
- Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L. L. (1996).** Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland, *Marine Pollution Bulletin*, 32 (2), p. 225–231.
- Pekey, H. (2006).** The distribution and sources of heavy metals in Izmit Bay surface sediments affected by a polluted stream. *Marine Pollution Bulletin*, 52(10), 1197-1208.
- Pellerin-Massicotte, J. (1994).** Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 3(2), 101-111
- Pereira, S., Pinto, A. L., Cortes, R., Fontainhas-Fernandes, A., Coimbra, A. M., & Monteiro, S. M. (2013).** Gill histopathological and oxidative stress evaluation in native fish captured in Portuguese northwestern rivers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 90, 157-166.
- Perez-Lopez, M., Anglade, P., Bec-Ferte, M. P., Debrauwer, L., Perdu, E., Cravedi, J. P., & Rouimi, P. (2000).** Characterization of hepatic and extrahepatic glutathione S-transferases in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their induction by 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl. *Fish Physiology and Biochemistry*, 22(1), 21-32.
- Pergent, G., Semroud, R., BABA, A. R., Delbal, F., Khatal, Y., Remili, A., & Boudouresque, C. F. (1993).** Données préliminaires sur la répartition et l'état de l'herbier à *Posidonia oceanica* de la région d'El Kala (Algérie). *Scientific reports of Port-Cros national Park*, 15, 253-263.
- Phillips D.J.H. & Rainbow P.S. (1993).** Biomonitoring of trace aquatic contaminants. Environmental management series, Alden Press Ltd, Oxford, p. 371.
- Phillips, D. J. (1977).** The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments—a review. *Environmental Pollution (1970)*, 13(4), 281-317.
- Phillips, D. J. H. (1976).** The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. *Marine Biology*, 38(1), 59-69.
- Phillips, D. J., & Segar, D. A. (1986).** Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: programme design imperatives. *Marine pollution bulletin*, 17(1), 10-17.
- Phillips, D.J.H. (1980).** Quantitative aquatic biological indicators: their use to monitor trace metal and organochlorine pollution, *Applied Science Publishers*, London.
- Pierce, S., & Tappel, A. L. (1978).** Glutathione peroxidase activities from rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 523(1), 27-36.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T. C., Leitao, M. A., Okamoto, O. K., Morse, D., & Colepico, P. (2003).** Heavy metal-induced oxidative stress in algae 1. *Journal of phycology*, 39(6), 1008-1018.
- PNAE-DD/Algerian NEAP. (2002).** Plan National d'Actions pour l'Environnement et le Développement Durable, République Algérienne Démocratique et Populaire, Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Alger, 140 pp.
- Pompella, A., Maellaro, E., Casini, A. F., Ferrali, M., Ciccoli, L., & Comporti, M. (1987).** Measurement of lipid peroxidation in vivo: a comparison of different procedures. *Lipids*, 22(3), 206-211.

- Poynton, H. C., & Vulpe, C. D. (2009).** Ecotoxicogenomics: emerging technologies for emerging contaminants 1. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 45(1), 83-96.
- Prueli, R.J., Quinn, J., Lake, J.L., & Davis, W.R. (1987).** Availability of PCBs and PAHs to *Mytilus edulis* from artificially resuspended sediments". In: Capuzzo J.M., D.R. Kester (eds) Oceanic processes in marine pollution, vol 1: Biological processes and wastes in the ocean. Robert E. Keiger. Publishers, Boca Raton 10: 97-108.
- Pruell, R. J., Quinn, J. G., Lake, J. L., & Davis, W. R. (1987).** Availability of PCBs and PAHs to *Mytilus edulis* from artificially resuspended sediments.
- Qayyum, S., Ara, A., & Usmani, J. A. (2012).** Effect of nickel and chromium exposure on buccal cells of electroplaters. *Toxicology and Industrial Health*, 28(1), 74-82.
- Rabaoui, L., Balti, R., Zrelli, R., & Tlig-Zouari, S. (2014).** Assessment of heavy metals pollution in the gulf of Gabes (Tunisia) using four mollusk species. *Mediterranean Marine Science*, 15(1), 45-58.
- Rai, L. C., Gaur, J. P., & Kumar, H. D. (1981).** Phycology and heavy-metal pollution. *Biological Reviews*, 56(2), 99-151.
- Raikwar, M. K., Kumar, P., Singh, M., & Singh, A. (2008).** Toxic effect of heavy metals in livestock health. *Veterinary world*, 1(1), 28.
- Rainbow, P. S. (1995).** Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 31(4-12), 183-192.
- Raut, N., Charif, G., Amal Al-Saadi, S. A. A., & Abrar, A. A. (2012).** A critical review of removal of Zinc from wastewater. In *Proceedings of the world congress on Engineering* (Vol. 1, pp. 4-6), London, U.K.
- Regoli, F., & Giuliani, M. E. (2014).** Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine environmental research*, 93, 106-117.
- Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., & Winston, G. W. (2002).** Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research*, 54(3-5), 419-423.
- Richetti, S. K., Rosemberg, D. B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J. M., Bogo, M. R., & Bonan, C. D. (2011).** Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology*, 32(1), 116-122.
- Ridgway, J., & Shimmiel, G. (2002).** Estuaries as repositories of historical contamination and their impact on shelf seas. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55(6), 903-928.
- Ringwood, A. H., Hoguet, J., Keppler, C., & Gielazyn, M. (2004).** Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters—*Crassostrea virginica*. *Marine environmental research*, 58(2-5), 151-155.
- Rivail Da Silva, M., Lamotte, M., Donard, O.F.X., et al. (1996).** Metal contamination in surface sediments of mangroves, lagoons and Southern Bay in Florianopolis Island. *Environmental Technology*, 17, 1035-1046.
- RNB, (1999).** Réseau National de Bassin. Les micropolluants dans les cours d'eau français, 3 années d'observations (1995 à 1997). Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement et les agences de l'eau. France.
- RNO, (2005).** Surveillance du Milieu Marin. Travaux du RNO. Edition 2005., NANTES : IFREMER edn
- RNO, (2006).** Surveillance du milieu marin. Travaux du réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin. Ifremer.
- Robbe, D. (1984).** Interprétation des teneurs en éléments métalliques associés aux sédiments (Doctoral dissertation), Rapport des Laboratoires. Série I: Environnement et Génie Urbaine, EG-1, LCPC, Paris, pp. 20±45.

- Roberts, A. P., Oris, J. T., Burton Jr, G. A., & Clements, W. H. (2005).** Gene expression in caged fish as a first-tier indicator of contaminant exposure in streams. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(12), 3092-3098.
- Romankevic, E.A. (1984).** Geochemistry of Organic Matter in the Ocean. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Springer Verlag, , XV + 334 S., 48 Abb., 72 Tab., 148,—DM. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*. 13(6): 668–668
- Romeo, M., & Gnassia-Barelli, M. (1988).** *Donax trunculus* and *Venus verrucosa* as bioindicators of trace metal concentrations in Mauritanian coastal waters. *Marine Biology*, 99(2), 223-227.
- Rouane-Hacene, O., Belhaouari, B., & Boutiba, Z. (2012).** Trace element concentrations (Zn, Cu, Pb and Cd) in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Oran Harbour (Oran Bay, Algerian west coast). *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 2(9), 446-452.
- Rouane-Hacene, O., Boutiba, Z., Belhaouari, B., Guibbolini-Sabatier, M. E., Francour, P., & Risso-de Faverney, C. (2015).** Seasonal assessment of biological indices, bioaccumulation and bioavailability of heavy metals in mussels *Mytilus galloprovincialis* from Algerian west coast, applied to environmental monitoring. *Oceanologia*, 57(4), 362-374.
- Roussiez, V., Ludwig, W., Monaco, A., Probst, J-L., Bouloubassi, I., Buscail, R. (2006).** Sources and sinks of sediment-bound contaminants in the Gulf of Lions (NW Mediterranean Sea): A multi-tracer approach. *Continental Shelf Research*, 26, 1843-1857.
- Roy, L. A., Armstrong, J. L., Sakamoto, K., Steinert, S., Perkins, E., Lomax, D. P., Johnson, L.L., & Schlenk, D. (2003).** The relationships of biochemical endpoints to histopathology and population metrics in feral flatfish species collected near the municipal wastewater outfall of Orange County, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(6), 1309-1317.
- Rusyniak, D. E., Arroyo, A., Acciani, J., Froberg, B., Kao, L., & Furbee, B. (2010).** Heavy metal poisoning: management of intoxication and antidotes. *Molecular, clinical and environmental toxicology*, 365-396.
- Sabaliūnas, D., Lazutka, J., Sabaliūniene, I., & Södergren, A. (1998).** Use of semipermeable membrane devices for studying effects of organic pollutants: Comparison of pesticide uptake by semipermeable membrane devices and mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17(9), 1815-1824.
- Sabhi, Y. (1997).** Etude des tendances des polluants chimiques métalliques (Hg, Cd, Pb, Cr, Ni, Zn, Cu) dans les organismes marins de la côte méditerranéenne marocaine. *Thèse de Doctorat d'Etat es-Sciences Biologie. Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès* : 220 pp.
- Saidani, W., Sellami, B., Khazri, A., Mezni, A., Dellali, M., Joubert, O., & Beyrem, H. (2019).** Metal accumulation, biochemical and behavioral responses on the Mediterranean *clams Ruditapes decussatus* exposed to two photocatalyst nanocomposites (TiO₂ NPs and AuTiO₂NPs). *Aquatic toxicology*, 208, 71-79.
- Saint-Denis, M., Labrot, F., Narbonne, J. F., & Ribera, D. (1998).** Glutathione, glutathione-related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35(4), 602-614.
- Saker, H. (2007).** Analyse et dosage des hydrocarbures présents dans les eaux de mer du littoral de Skikda. Mémoire de Magister. Université de Skikda. p.99.
- Sakuragui, M. M., Paulino, M. G., Pereira, C. D. S., Carvalho, C. S., Sadauskas-Henrique, H., & Fernandes, M. N. (2013).** Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. *Environmental Pollution*, 178, 41-51.
- Salaya, J. J., Beuperthuy, I., & Martínez, J. (1973).** Estudio sobre la biología, pesquería y cultivo del Mejillon, *Perna Perna* (L) en Venezuela. *Informe Tecnico-Proyecto de Investigacion y Desarrollo Pesquero MAC-PNUD-FAO (Venezuela).(1973).*(, (62), 6-50.

- Salazar, M. H., & Salazar, S. M. (1996).** Mussels as bioindicators: effects of TBT on survival, bioaccumulation, and growth under natural conditions. In *Organotin* (pp. 305-330). Springer, Dordrecht.
- Salem, Z. B., Capelli, N., Laffray, X., Elise, G., Ayadi, H., & Aleya, L. (2014).** Seasonal variation of heavy metals in water, sediment and roach tissues in a landfill draining system pond (Etueffont, France). *Ecological Engineering*, 69, 25-37.
- Sanchez, W. (2007).** Approche multibiomarqueurs chez l'Épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.) : un modèle pour la surveillance des écosystèmes aquatiques continentaux. Thèse de Doctorat, Museum national d'histoire naturelle, France, 270 p.
- Sanchez, W., Ait-Aissa, S., Palluel, O., Ditche, J. M., & Porcher, J. M. (2007).** Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology*, 16(2), 279-287.
- Sanchez, W., Katsiadaki, I., Piccini, B., Ditche, J. M., & Porcher, J. M. (2008).** Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: a multiparametric approach. *Environment International*, 34(4), 490-498.
- Saxena, G., Purchase, D., Mulla, S. I., Saratale, G. D., & Bharagava, R. N. (2019).** Phytoremediation of heavy metal-contaminated sites: eco-environmental concerns, field studies, sustainability issues, and future prospects. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 249*, 71-131.
- Schurink, C., & Griffiths, C. L. (1990).** Marine mussels of southern Africa their distribution patterns, standing stocks, exploitation and culture. *Journal of Shellfish Research*, 9(1), 75-85.
- Schurink, C., & Griffiths, C. L. (1991).** A comparison of reproductive cycles and reproductive output in four southern African mussel species. *Marine Ecology Progress Series*, 123-134.
- Seed, R., & Suchanek, T. H. (1992).** Population and community ecology of Mytilus. *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*, 25, 87-170.
- Semedo, M., Reis-Henriques, M. A., Rey-Salgueiro, L., Oliveira, M., Delerue-Matos, C., Morais, S., & Ferreira, M. (2012).** Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in octopus (*Octopus vulgaris*) from Northwest Atlantic. *Science of the Total Environment*, 433, 230-237.
- Serbanescu, O., Munteanu, G., Pecheanu, I., & Mihnea, I. (1980).** *Mytilus galloprovincialis* de la Cote Roumaine de la Mer Noire, Factor de Concentration en Metaux Lourds. Ves Journées Etud. Pollution, Cagliari. *CIESM*, 573-576.
- Sericano, J. L., Wade, T. L., Jackson, T. J., Brooks, J. M., Tripp, B. W., Farrington, J. W., ... & Goldberg, E. D. (1995).** Trace organic contamination in the Americas: an overview of the US National Status & Trends and the International 'Mussel Watch' programmes. *Marine Pollution Bulletin*, 31(4-12), 214-225.
- Sheehan, D., Meade, G., FOLEY, V. M., & DOWD, C. A. (2001).** Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical journal*, 360(1), 1-16.
- Siddall, S. E. (1980).** A clarification of the genus Perna (Mytilidae). *Bulletin of Marine Science*, 30(4), 858-870.
- Shelly, C., Lu, M.D, 2009.** Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* 30(1-2), 42-59.
- Sies, H. (1999).** Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9-10), 916-921.
- Solé, M., Porte, C., Albaiges J., 1995.** Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environment. Toxic. Chem.* 14, 157-164

- Soto, M., Ireland, M. P., & Marigómez, I. (1997).** The contribution of metal/shell-weight index in target-tissues to metal body burden in sentinel marine molluscs. 2. *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the total environment*, 198(2), 149-160.
- Soto, M., Kortabitarte, M., & Marigomez, I. (1995).** Bioavailable heavy metals in estuarine waters as assessed by metal/shell-weight indices in sentinel mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine ecology progress series*, 125, 127-136.
- Stankovic, S., & Jovic, M. (2012).** Health risks of heavy metals in the mediterranean mussels as seafood. *Environmental chemistry letters*, 10(2), 119-130.
- Stankovic, S., & Stankovic, A. R. (2013).** Bioindicators of toxic metals. In *Green materials for energy, products and depollution* (pp. 151-228). Springer, Dordrecht.
- Stankovic, S., Jovic, M., Stankovic, A. R., & Katsikas, L. (2012).** Heavy metals in seafood mussels. Risks for human health. In *Environmental chemistry for a sustainable world* (pp. 311-373). Springer, Dordrecht.
- Stegeman, J. J., Brouwer, M., Digiulio, R. T., Forlin, L., Fowler, B. A., Sanders, B. M. and Van Veld, P. A. (1992).** Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure and effect.
- Steinert, S. A., Streib-Montee, R., Leather, J. M., & Chadwick, D. B. (1998).** DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399(1), 65-85.
- Stoffers, P., Summerhayes, C., Forstner, U., & Patchineelam, S. R. (1977).** Copper and other heavy metal contamination in sediments from New Bedford Harbor, Massachusetts: a preliminary note. *Environmental Science & Technology*, 11(8), 819-821.
- Superville, P. J., Prygiel, E., Magnier, A., Lesven, L., Gao, Y., Baeyens, W., Ouddane, B., Dumoulin, D., & Billon, G. (2014).** Daily variations of Zn and Pb concentrations in the Deûle River in relation to the resuspension of heavily polluted sediments. *Science of the total environment*, 470, 600-607.
- Szyczewski, P., Siepak, J., Niedzielski, P., & Sobczyński, T. (2009).** Research on heavy metals in Poland. *Pol. J. Environ. Stud*, 18(5), 755–768.
- Taleb, Z. M., Benghali, S., Kaddour, A., & Boutiba, Z. (2007).** Monitoring the biological effects of pollution on the Algerian west coast using mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Oceanologia*, 49(4): 1–22
- Taleb, Z. M., Benali, I., Gherras, H., Ykhlef-Allal, A., Bachir-Bouiadjra, B., Amiard, J. C., & Boutiba, Z. (2009).** Biomonitoring of environmental pollution on the Algerian west coast using caged mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Oceanologia*, 51(1), 63-84.
- Taylor, A. M., & Maher, W. A. (2010).** Establishing metal exposure–dose–response relationships in marine organisms: illustrated with a case study of cadmium toxicity in *Tellina deltoidalis*. *New oceanography research developments: marine chemistry, ocean floor analyses and marine phytoplankton*, 1-57.
- Tekin-Özan, S., & Kir, İ. (2008).** Seasonal variations of heavy metals in some organs of carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) from Beyşehir Lake (Turkey). *Environmental monitoring and assessment*, 138(1), 201-206.
- Thibaud, Y., & Boutier, B. (1988).** Surveillance du mercure et du cadmium dans les huîtres et les moules du littoral français (1979-1985). *Rapport Synthèse RNO*, 4, 55-100.
- Thomas, P. (1990).** Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. *Biological indicators of stress in fish*, 8, 9-28.
- Timbrell, J.A., Drapper, R., Waterfiel, C. (1994).** Biomarkers in toxicology : new uses for old molecules. *Toxicology and Ecotoxicology News* 1: 4-14.
- Tom, M., Moran, O., Jakubov, E., Cavari, B., & Rinkevich, B. (1998).** Molecular characterization of metallothionein-cDNA of *Sparus aurata* used for detecting heavy metal pollution along the Mediterranean coast of Israel. *Marine pollution bulletin*, 36(2), 131-137.

- Torres, M. A., Barros, M. P., Campos, S. C., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R. T., & Colepicolo, P. (2008).** Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 1-15.
- Tsangaris, C., Kaberi, H., Catsiki, V.A. (2012).** Metal levels in sediments and transplanted mussels in Pagassitikos Gulf (Aegean Sea, Eastern Mediterranean). *Environmental Monitoring and Assessment*. 185(7): 6077–6087
- Tsangaris, C., Kormas, K., Stroglyoudi, E., Hatzianestis, I., Neofitou, C., Andral, B., & Galgani, F. (2010).** Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(3), 369-378.
- Turja, R., Höher, N., Snoeijs, P., Baršienė, J., Butrimavičienė, L., Kuznetsova, T., ... & Lehtonen, K. K. (2014).** A multibiomarker approach to the assessment of pollution impacts in two Baltic Sea coastal areas in Sweden using caged mussels (*Mytilus trossulus*). *Science of the Total Environment*, 473, 398-409.
- Turja, R., Soirinsuo, A., Budzinski, H., Devier, M. H., & Lehtonen, K. K. (2013).** Biomarker responses and accumulation of hazardous substances in mussels (*Mytilus trossulus*) transplanted along a pollution gradient close to an oil terminal in the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 157(1), 80-92.
- Turner, A. (1996).** Trace-metal partitioning in estuaries: importance of salinity and particle concentration. *Marine Chemistry*, 54(1-2), 27-39.
- Turner, A., Millward, G. E., & Tyler, A. O. (1994).** The distribution and chemical composition of particles in a macrotidal estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 38(1), 1-17.
- Ulmer, L. (1997).** Werden die Alpen zur Seniorenresidenz? [Bevölkerungsveränderungen]. Diplomarbeit Geogr. Institut Univ. Zürich. VIII, 152 S. Fig., Tab., Karten. [u.a. Surselva GR], p. 2574.
- UN. (2016).** The First Global Integrated Marine Assessment. World Ocean Assessment I. Chapter 20. Coastal, Riverine and Atmospheric Inputs from Land; UN: New York, NY, USA, p. 93.
- Uren Webster, T. M., Bury, N., van Aerle, R., & Santos, E. M. (2013).** Global transcriptome profiling reveals molecular mechanisms of metal tolerance in a chronically exposed wild population of brown trout. *Environmental science & technology*, 47(15), 8869-8877.
- USEPA. (2002).** Guidelines for the Application of SEM/EDX Analytical Techniques to Particulate Matter Samples. EPA600/R-02-070. US Environmental Protection Agency.
- 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.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006).** Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 64(2), 178-189.
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003).** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149.
- Van Straalen, N. M., & Feder, M. E. (2012).** Ecological and evolutionary functional genomics-How can it contribute to the risk assessment of chemicals?. *Environmental science & technology*, 46(1), 3-9.
- Verlecar, X. N., Jena, K. B., & Chainy, G. B. N. (2007).** Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chemico-biological interactions*, 167(3), 219-226.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., & Koehler, A. (2007).** The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in

- sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3), 281-300.
- Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Accomando, R., Mancinelli, G., & Orunesu, M. (1989).** Lipid peroxidation and level of antioxidant compounds (GSH, vitamin E) in the digestive glands of mussels of three different age groups exposed to anaerobic and aerobic conditions. *Marine environmental research*, 28(1-4), 291-295.
- Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Salgueiro-González, N., Muniategui, S., & Beiras, R. (2015).** Bioaccumulation of 4-nonylphenol and effects on biomarkers, acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase, in *Mytilus galloprovincialis* mussel gills. *Environmental Pollution*, 200, 133-139.
- Vieweg, I., Hop, H., Brey, T., Huber, S., Ambrose Jr, W. G., & Gabrielsen, G. W. (2012).** Persistent organic pollutants in four bivalve species from Svalbard waters. *Environmental pollution*, 161, 134-142.
- Vincent, M. (2006).** Etude d'expertise en Aquaculture - Environnement - Pêche – Pollution. Saint-Maximin – France.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. J., & Valavanidis, A. (2007).** Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin*, 54(9), 1361-1371.
- Vural, N. (2005)** Toxicology. Publications of Ankara University Pharmacy Dep. No: 73.
- Wagoner, J.K., & Soffiotti, U. (1976).** Occupational Carcinogenesis, New York Academy of Science, p. 271.
- Wang, Y., Li, L., Hu, M., & Lu, W. (2015).** Physiological energetics of the thick shell mussel *Mytilus coruscus* exposed to seawater acidification and thermal stress. *Science of the Total Environment*, 514, 261-272.
- Weckbecker, G., & Cory, J. G. (1988).** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters*, 40(3), 257-264.
- Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., & Tillitt, D. E. (2000).** Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical reviews in toxicology*, 30(4), 347-570.
- Williams, C. R., & Gallagher, E. P. (2013).** Effects of cadmium on olfactory mediated behaviors and molecular biomarkers in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic toxicology*, 140, 295-302.
- Wilson, J. H., & Seed, R. (1974).** Reproduction in *Mytilus edulis* L.(Mollusca: Bivalvia) in Carlingford Lough, Northern Ireland. *Irish Fisheries Investigations, series B (Marine)*, 15, 1-30.
- Won, E. J., Kim, R. O., Rhee, J. S., Park, G. S., Lee, J., Shin, K. H., & Lee, J. S. (2011).** Response of glutathione S-transferase (GST) genes to cadmium exposure in the marine pollution indicator worm, *Perinereis nuntia*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154(2), 82-92.
- Wu, R. S., Siu, W. H., & Shin, P. K. (2005).** Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring. *Marine pollution bulletin*, 51(8-12), 623-634.
- Yu, C. L., Liu, C. L., Tsai, C. Y., Sun, K. H., Liao, T. S., Lin, W. M., ... & Yu, H. S. (1993).** Prostaglandin E 2 suppresses phytohemagglutinin-induced immune responses of normal human mononuclear cells by decreasing intracellular glutathione generation, but not due to increased DNA strand breaks or apoptosis. *Agents and actions*, 40(3), 191-199.
- Zaouali, J. (1973).** Note sur la presence de *Perna perna* L.(= *Mytilus africanus* Chemnitz) dans la region de Bizerte (Tunisie). *Bull. Inst. Océanogr. Pêche, Salammbô*, 2, 637-642.

- Zhang, L., Qiu, L., Wu, H., Liu, X., You, L., Pei, D., & Zhao, J. (2012).** Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes from *Venerupis philippinarum* exposed to heavy metals and benzo [a] pyrene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(3), 517-527.
- Ziouch, O. R., Laskri, H., Chenaker, H., Ledjedel, N. E., Daifallah, T., & Ounissi, M. (2020).** Transport of nutrients from the Seybouse River to Annaba Bay (Algeria, SW Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin*, 156, 111231.
- Zulfa, N., Effendi, H., & Riani, E. (2016).** Preliminary rapid fishing port water quality assessment with pollution index. *Advances in Environmental Sciences*, 8(1), 96-106.

Cette thèse est supportée par :

1. Communication internationale

LAOUATI Imèn, ZERARGUIA Islem, DERBAL Farid, OUALI Khireddine 2019. Variation spatio-temporelle des éléments traces métalliques chez la moule africaine *Perna perna* (Mollusque, Bivalve) du golfe d'Annaba, Algérie. *VIIème congrès international de biotechnologie et valorisation des Bio-Ressources, organisé par l'AT-BVBR du 20 au 23 Mars 2019 à Tabarka- Tunisie* (Communication orale).

LAOUATI Imèn, ZERARGUIA Islem, KHATI Wyllia, DERBAL Farid, OUALI Khireddine 2018. Biosurveillance active de la qualité des eaux du golfe d'Annaba via l'analyse des éléments traces métalliques (ETMs) chez la moule *Perna perna* (mollusque, bivalve). *6ème Congrès Franco-Maghrébin de Zoologie 119ème Journées annuelles de la SZF*. Paris (France) à La Maison de la Tunisie 21-23 Novembre (Communication par affichage).

LAOUATI Imèn, ZERARGUIA Islem, KHATI Wyllia, DERBAL Farid, OUALI Khireddine 2018. Utilisation de la méthode caging dans la biosurveillance de la qualité des eaux marines côtières via un bioindicateur, la moule *Perna perna* (mollusque, bivalve). *1er Colloque International Bio-ressources et économie Bleue et Verte*. Hammamet (Tunisie) 26-29 Avril (Communication par affichage).

2. Publication internationale

Laouati Imèn, Rouane-Hacene Omar, Derbal Farid, Ouali Kheireddine. The mussel caging approach in the assessment of trace metal contamination in southern Mediterranean coastal waters: a multi-biomarker study. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-13. Facteur d'impact IF (2021) : 4.01, H Index : 113.

3. Projets de recherche

PRFU : Biosurveillance de la qualité du milieu marin et terrestre à l'aide d'indicateurs biologiques et biochimiques. **D01N01UN230120180020**. 2018 – 2021

Détection et caractérisation des particules de plastique dans des produits de la mer en Tunisie et en Algérie: Évaluation de l'impact Eco toxicologique et de sécurité alimentaire. **Projets de Recherche – Développement TUNISO-ALGERIEN**. 2020 - 2022

ANNEXES

Annexe I : Gamme d'étalonnage des éléments traces métalliques dosés

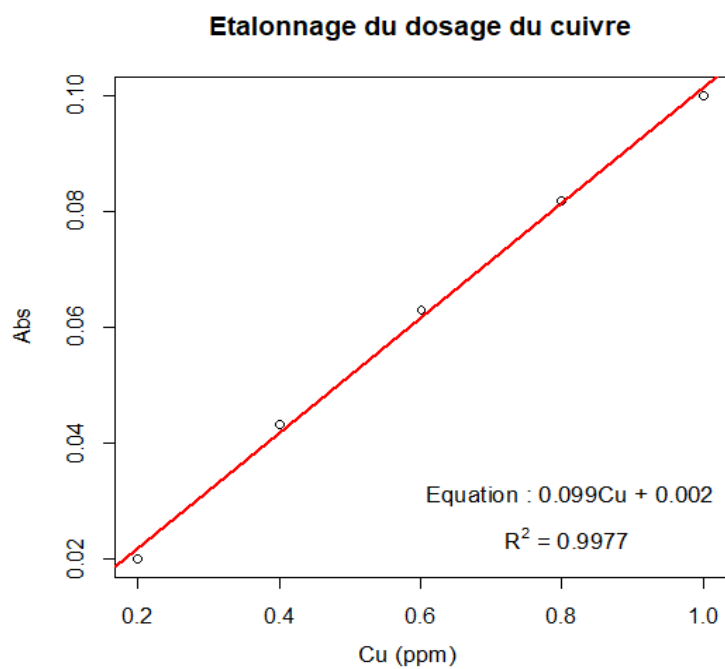


Figure 41. Courbe d'étalonnage du cuivre.

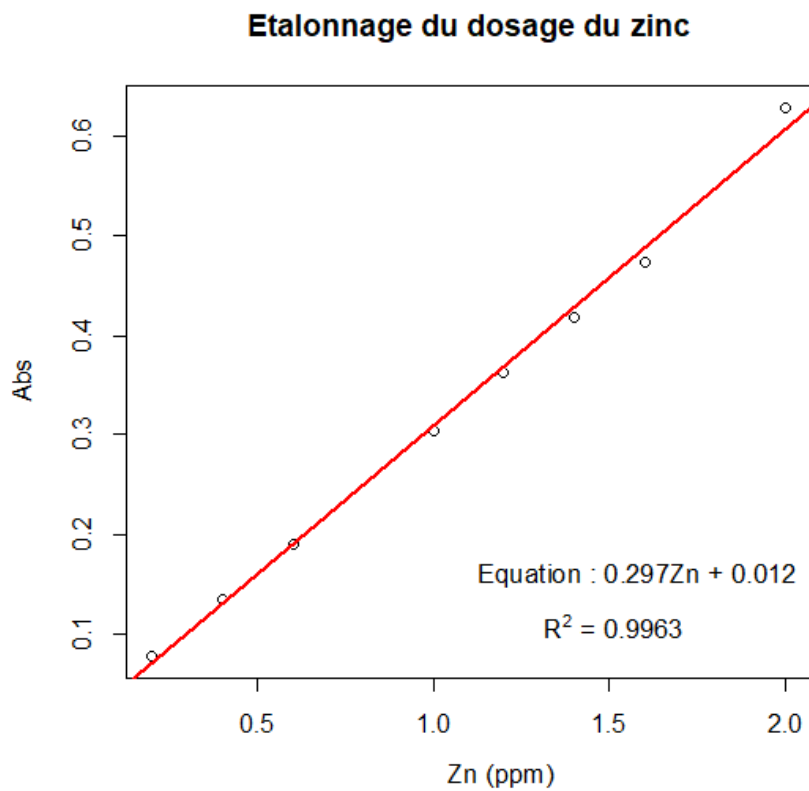


Figure 42. Courbe d'étalonnage du zinc.

Etalonnage du dosage du Plomb

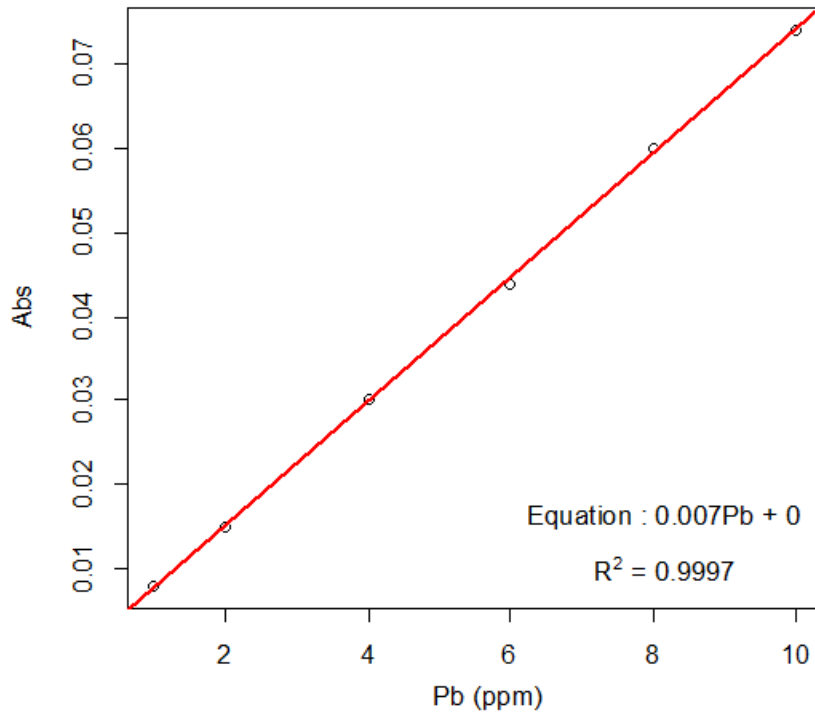


Figure 43. Courbe d'étalonnage du plomb.

Etalonnage du dosage du cadmium

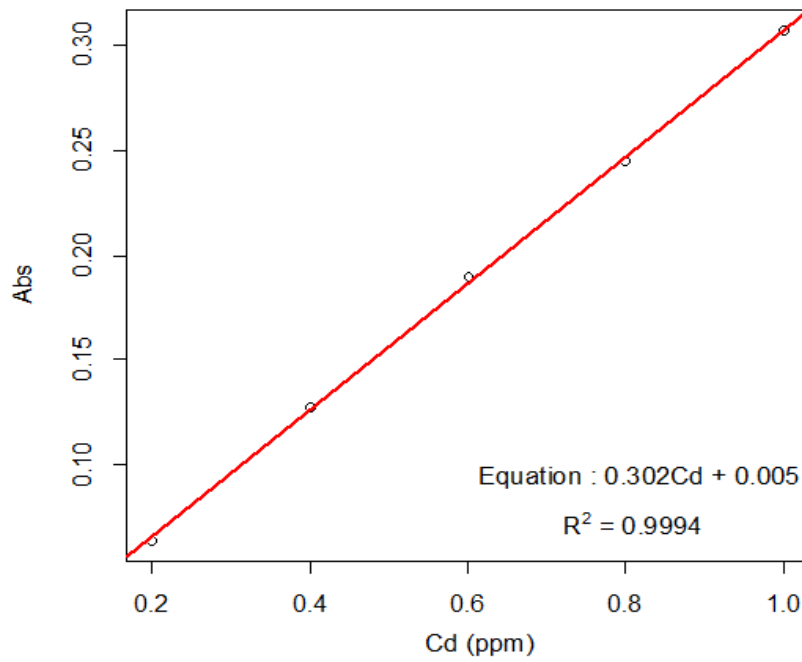


Figure 44. Courbe d'étalonnage du cadmium.

Annexe II : Composition des produits nécessaires aux dosages des biomarqueurs

Tampons d'homogénéisation

Tampon Tris à 20 mM (pH = 7.6)

Produits utilisés

- Hydroxyméthyl aminométhane (Tris).....20 mM
- Acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA).....1 mM
- Saccharose.....0.5 M
- Chlorure de potassium (KCl).....0.15 M
- Dithiothréitol (DTT).....1 mM
- Fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF).....0.1mM
 - Solubiliser le PMSF dans de l'isopropanol à raison 200 mM ;
 - Aliquoter dans des tubes Eppendorf à raison 50 µl ;
 - Solution stable pendant 6 mois à - 20 ° C.

Préparation

- Pour la préparation de 100 ml de tampon Tris, dissoudre dans 80 ml d'eau distillée 24 g de Tris ; 0.029 g d'EDTA ; 17.11 g de saccharose ; 1.11 g KCl ; 0.015 g DTT et le contenu d'un tube Eppendorf de PMSF ;
- Mélanger puis compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Tampon à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Protéines

Composition et préparation du réactif nécessaire au dosage

Réactif protéique

Produits utilisés

- Bleu brillant de Coomassie (G250).
- Éthanol 95 %
- Acide phosphorique 85 %

Préparation

- Dissoudre 100 mg du bleu brillant de Coomassie dans 50 ml d'éthanol.
- Agiter 2 heures puis ajouter 100 ml d'acide phosphorique.
- Mélanger puis ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à 1000 ml.
- Agiter puis filtrer sur papier filtre whatman n°1.
- Solution stable pendant plusieurs semaines à l'obscurité et à 4 ° C.

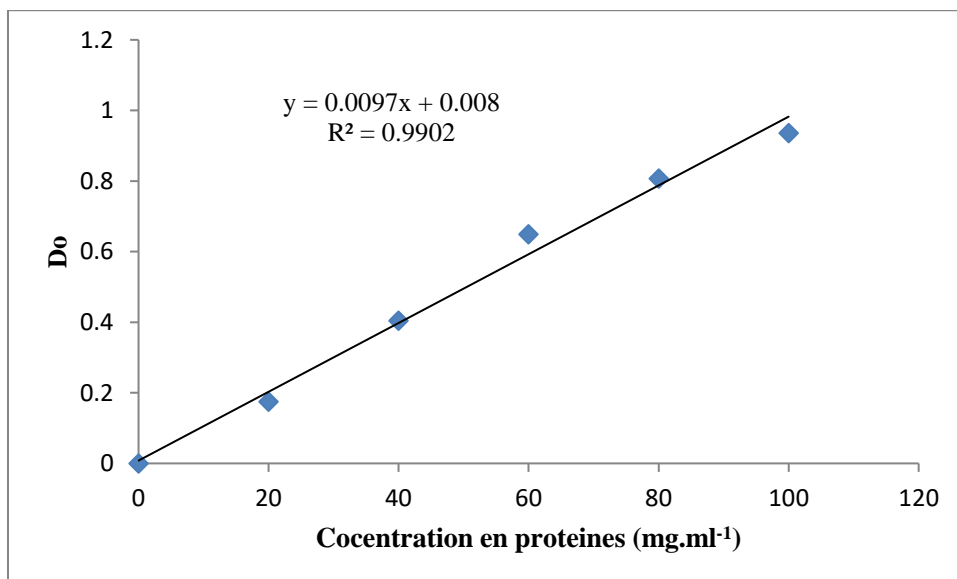


Figure 45. Représentation graphique de la courbe d'étalonnage des protéines.

Glutathion réduit (GSH)

Composition et préparation des produits nécessaires au dosage

Solution d'acide sulfosalicylique à 4 %

Produit utilisé

- Acide sulfosalicylique.

Préparation

- Dissoudre 4 g de l'acide sulfosalicylique dans 80 ml d'eau distillée.
- Mélanger puis ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml.
- Solution à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Réactif d'Ellman à 10 mM

Produits utilisés

- Acide 5.5'-dithio-bis-2 nitrobenzoïque (DTNB).
- Méthanol absolu.

Préparation

- Dissoudre 0.0396 g de DTNB dans 10 ml de méthanol absolu.
- Solution instable à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Tampon Tris-HCl à l'EDTA (pH = 9.6)

Produits utilisés

- Tris 0.4 M
- EDTA 20 mM
- Acide chlorhydrique (HCl) 37%

Préparation

- Pour la préparation de 500 ml de tampon, dissoudre 24.22 g de Tris dans 400 ml d'eau distillée.
- Ajouter 2.92 g d'EDTA.
- Mélanger puis compléter à 500 ml avec de l'eau distillée.
- Ajuster le pH à 9.6 avec quelques gouttes d'HCl.
- Solution à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Glutathion S-transférase

Composition et préparation des produits nécessaires au dosage

Tampon phosphate à 0.1 M (pH = 6.5)

Produits utilisés

- Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4).
- Hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4).

Préparation

- Dissoudre 13.6 g de KH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution A).
- Dissoudre 17.4 g de K_2HPO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution B).
- Ajuster le pH de la solution (A) à l'aide de la solution (B).
- Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C.

Solution 1-chloro -2.4 - dinitrobenzène à 20 mM

Produits utilisés

- 1- Chloro-2.4-dinitrobenzène (CDNB).
- Ethanol absolu.

Préparation

- Dissoudre 0.04 g de CDNB dans 10 ml d'éthanol absolu.
- Solution instable à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Solution de glutathion réduit à 20 mM

Produit utilisé

- Glutathion réduit (GSH).

Préparation

- Dissoudre 0.06 g de GSH dans 10 ml d'eau distillée.
- Solution instable à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Catalase

Composition et préparation des produits nécessaires au dosage

Tampon phosphate à 0.1 M (pH = 7.5)

Produits utilisés

- Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4).
- Hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4).

Préparation

- Dissoudre 13.60 g de KH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (solution A).
- Dissoudre 17.40 g de K_2HPO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (solution B).
- Ajuster le pH de la solution (B) à l'aide de la solution (A).
- Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C.

Peroxyde d'hydrogène à 5%

Produits utilisés

- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 30 %
- Tampon phosphate (pH = 7.5) 0.1 M

Préparation

- Pour la préparation de 100 ml de peroxyde d'hydrogène à 5 %, ajouter 16.66 ml d' H_2O_2 à 83.34 ml de tampon phosphate.
- Solution instable à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Malondialdéhyde

Composition et préparation des produits nécessaires au dosage

Solution TCA 5 %

Produits utilisés :

- Acide trichloroacétique (TCA)

Préparation

- Dissoudre 5 g de TCA dans 100 ml d'eau distillée.

Solution TBA 0.67 %

Produits utilisés

- Acide thiobarbiturique (TBA)

Préparation

- Dissoudre 0.67 g de TBA dans 100 ml d'eau distillée.

Acétylcholinestérase

Composition et la préparation des produits nécessaires au dosage

Tampon tris 100 mM pH = 7.5

Produits utilisés

- Hydroxyméthyl aminométhane (Tris).....20 mM

Préparation

- Dissoudre 1.211 g de Tris dans 100 ml d'eau distillée

Réactif d'Ellman à 0.01 M

Produits utilisés

- Acide 5, 5'- dithiobis - 2 - nitrobenzoïque (DTNB).
- Bicarbonate de sodium (CO_3HNa)
- Tampon Tris 0.1 M

Préparation

- Dissoudre 0.0396 g de DTNB et 0.015 g de CO_3HNa dans 10 ml de tampon Tris 0.1 M.
- Solution instable à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Solution d'acétylthiocoline à 0.1 M

Produits utilisés

- Acétylthiocoline iodide.
- Eau distillée.

Préparation

- Dissoudre 0.144 g d'acétylthiocoline dans 10 ml d'eau distillée.
- Solution à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.