

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE
VEGETAL, ENVIRONNEMENT, NUTRITION, AGROALIMENTAIRE, MER



Année 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

Discipline : Environnement
Spécialité : Ecotoxicologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Naouel KAMEL

Le 26 juin 2014, devant le jury ci-dessous

Président	
Rapporteurs	Dalila SAIDANE, Professeur, Faculté de pharmacie de Monastir Philippe GARRIGUES, Directeur de recherche, Université de Bordeaux I
Examineurs	Amina BAKHROUF, Professeur, Faculté de pharmacie de Monastir Catherine MOUNEYRAC, Professeur, Université Catholique de l'Ouest

Co-Directeurs de thèse :

Thierry BURGEOT, HDR, Ifremer-Nantes

Hamadi BOUSSETTA, Professeur, ISA Chott-Mariem Sousse

Remerciements

Au terme de ce travail, je voudrais remercier les nombreuses personnes qui m'ont aidé au niveau scientifique, mais également sur un plan plus personnel. Tout d'abord, un énorme merci à tous les membres de jury qui ont accepté d'évaluer ce travail et de participer à la soutenance par visio-conférence.

J'exprime toute ma gratitude à mes Directeurs de Thèse, Professeur Hamadi Boussetta, Directeur du laboratoire de Biochimie et de Toxicologie Environnementale (LBTE) ISA-Chott mariem, et Docteur Thierry Burgeot, Responsable de l'Unité de Biogéochimie et écotoxicologie (Ifremer-Nantes). Je tiens à vous remercier pour la confiance et pour la grande liberté que vous m'avez accordée dans mes recherches, et qui m'a permis d'acquérir l'autonomie nécessaire pour arriver à ce stade merci encore pour cette confiance.

Toute ma reconnaissance va ensuite au Docteur Mohamed Banni que je considère comme réel co-encadrant de ce travail. Il a su me transmettre ses connaissances en écotoxicologie, sa rigueur de travail et m'a également encouragé à entreprendre cette thèse.

Mes remerciements et mon estime au Professeur Dalila Saidane de la faculté de pharmacie de Monastir, vos qualités nobles et humaines m'ont beaucoup touché. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez exprimé à la lecture du manuscrit en tant que rapporteur et pour les corrections apportées. Avec toutes mes excuses pour le désagrément.

Je suis particulièrement honorée de l'attention que Professeur Philippe Garrigues de l'Université Bordeaux I qui a bien voulu accorder à ce travail en tant que rapporteur. Je tiens à associer à mes remerciements Mesdames les Professeurs Amina Bakhrouf de la faculté de pharmacie de Monastir et Catherine Mouneyrac de l'Université Catholique de l'Ouest pour avoir accepté de participer à ce jury.

Remerciements

J'inclue dans ces remerciements le Professeur Christophe Minier de l'Université du Havre, qui m'a bien accueilli dans son laboratoire pour l'analyse des MXR.

Je remercie également Messieurs Mohamed Chalhaf de l'ISPA de Bizerte et Simon Devin de l'Université de Lorraine pour leurs investissements dans ce travail.

J'exprime aussi tous mes remerciements à tous les membres de LBTE, enseignants, doctorants et étudiants, je vous souhaite bonne continuation et beaucoup de réussite.

Je remercie vivement Docteur Farida Akcha chef du laboratoire Ecotoxicologie Ifremer, pour sa modestie, sa bonne humeur et sa disponibilité.

Je remercie tous les membres d'EX, Dominique, Sabine, Larissa et Julien pour les bons moments passés avec vous. Cette expérience a été merveilleuse pour moi et j'espère que l'on pourra se voir un jour, car c'est un grand plaisir

Un immense merci encore une fois à Sabine et Hansy pour votre gentillesse, votre soutien moral et les bons moments passés ensemble. Merci Sassa pour ta bienveillance, ton écoute et tes encouragements.

Je remercie également tous mes amis, qui malgré mes longues périodes de silence, ne m'ont jamais abandonné. Merci à tous pour votre patience, votre soutien : Jihène, Zied, Sana, Hajer, Faten, Safa, Henda et Sara.

Enfin un grand merci tout spécial à ma famille, en particulier à Belkis, Khaoula et à Kadhem qui m'ont supporté, soutenu et encouragé. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance et le témoignage de mon amour.

Je m'excuse auprès de tous ceux que j'aurais pu oublier et je les remercie quand même de ne pas trop m'en vouloir...

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail,

A la mémoire de mon cher papa Abdelhakim,

J'espère que là où il est, il sera fier de moi

A ma très chère et douce maman Essia,

Tu n'as jamais cessé de m'encourager et de me soutenir même dans tes moments les plus pénibles ...Tu seras présente dans mon cœur et mon esprit le jour de ma soutenance...

Kamel, N. Burgeot T, Banni M, Devin S, Chalghaf M, Minier C, Boussetta H (2014) Effects of increasing temperature on biomarkers responses and accumulation of hazardous substances in rope mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Bizerte Lagoon. Environ Sci Pollut Res. DOI 10.1007/s11356-014-2540-5.

Kamel, N. Attig, H, Dagnino, D, Boussetta, H, Banni, M. 2012. Increased Temperatures Affect Oxidative Stress Markers and Detoxification Response to Benzo[a]Pyrene Exposure in Mussel *Mytilus galloprovincialis*. Arch Environ Contam Toxicol. DOI 10.1007/s00244-012-9790-3.

Attig, H, **Kamel, N.** Sforzini, S, Dagnino, A, Jebali, J, Boussetta, H, Viarengo, A, Banni, M. (2014). Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarkers responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam). *In press* in Marine Environmental Research.

Kamel, N. Jebali, J, Banni, M, Ben Khedher, S, Chouba, L, Boussetta, H. 2012. Biochemical responses and metals levels in *Ruditapes decussatus* after exposure to treated municipal effluents. Ecotoxicology and Environmental Safety 82 (2012) 40–46.

Kamel, N. Burgeot T, Banni M, Akcha F, Devin S, Chalghaf M, Minier C, Ménard D, Boussetta H. Seasonal variation in biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: Integrated monitoring approach of the chemical and the biological effects in the Bizerta lagoon, Tunisia. *En préparation*

Kamel N, Burgeot T, Banni M, Akcha F, Ménard D, Minier C, Devin, Chalghaf M, Boussetta H. "Seasonal variation in biomarkers in the *Mytilus galloprovincialis* mussel: Integrated Monitoring approach for chemical and biological effects in the Bizerta lagoon, Tunisia". PRIMO 17, congrès international à l'université d'Algarve Faro, Portugal. Mai 2013

Kamel N, Attig H, Banni M, Boussetta H. Biochemical and genotoxic responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to benzo[a]pyrene and temperature. TjASSST11. Hammamet Novembre 2011.

°C : Degré Celsus

µg : Microgramme

µl : microlitre

ACh : Acetylcholine

AChE : Acétylcholinestérase

ANOVA : Analysis Of Variance

B[a]P : Benzo [a] pyrène

BAC : Background Assessment Criteria

BPH : Benzopyrène hydroxylase

Ca : Calcium

CAT : Catalase

Cd : Cadmium

CDNB : 1- chloro 2,4-dinitrobenzène

Cu : cuivre

Cys : cystéine

DCE : La directive cadre sur l'eau

DCSMM : Directive cadre Stratégie pour le milieu marin

DO : densité optique

DTNB : 5.5-dithiobis-2-acidenitrobenzoïque

EAC : Environmental Assessment Criteria

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétate

ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène

Liste des abréviations

GSH : glutathion réduit

GST : glutathion S-transférase

HAPs : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

IBR : Integrated biomarkers responses

KD : Kilo Dalton

MDA : malondialdéhyde

MEDPOL : Mediterranean Pollution, c'est la composante d'évaluation et de maîtrise de la pollution marine du PAM, qui est responsable du suivi des travaux liés à la mise en œuvre du Protocole "tellurique".

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

MTs : Métallothionéine

MXR : protéines de résistance aux multixénobiotiques

NADH₂ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogène

NADPH₂ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogène

Ni : nickel

nm : nanomètre

NP : Nonylphénol

OP : Organophosphorés

OSPAR : Oslo-Paris, la Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est

P : protéine

PAM : le **Plan d'action pour la Méditerranée**

PCBs : Polychlorobiphényles

Liste des abréviations

pH : potentiel d'hydrogène

ppm : partie par million

psu : L'unité de salinité pratique ou « *practical salinity unit* »

RRN : rétention du rouge neutre

SLM : stabilité des membranes lysosomales

SoS : stress on stress

TBA : Acide thiobarbiturique

TMP : Tétramétoxypropane

TNB : Thionitrobenzoate

UNEP ou PNUE : Programme des Nations unies pour l'environnement

WGBEC : Working Group on Biological Effect of Contaminants

Zn : zinc

Liste des Figures

	Page
Figure 1 : Schéma illustrant l'écart se creusant entre la surveillance des substances dangereuses dans les programmes de surveillance nationaux et internationaux.	2
Figure 2 : Récapitulatif du changement climatique et de l'acidification des océans.	7
Figure 3 : Le bassin méditerranéen	10
Figure 4 : Les lagunes méditerranéennes dont les données hydrologiques, géomorphologiques et écologiques sont disponibles dans la littérature scientifique.	11
Figure 5 : L'urbanisation des villes côtières de la méditerranée (Source Plan Bleu 2004).	14
Figure 6 : Les déchets toxiques issus des industriels implantés dans les pays méditerranéens	15
Figure 7 : Répartition des Concentrations des métaux traces (Pb, Cd et Hg) au niveau du sédiment et des tissus de la moule <i>M. galloprovincialis</i> sur les côtes méditerranéennes	18
Figure 8 : Zones juridictionnelles de la Convention des Nations Unies sur le droit de la mer, de la Convention OSPAR, de la Directive cadre sur l'eau (DCE) de l'UE et de la Directive cadre Stratégie pour le milieu marin (DCSMM) de l'UE.	25
Figure 9 : Représentation schématique des différents types de paramètres mesurables à différents niveaux d'organisation biologique permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques	27
Figure 10 : Représentation de l'ordre chronologique des différentes atteintes induites au sein de l'organisation des systèmes biologiques.	29
Figure 11 : Sources entraînant une augmentation des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule et les dommages cellulaires associés et intervention du système antioxydant	34
Figure 12 : Peroxydation lipidique : voie de synthèse du malonedialdéhyde à partir des acides gras polyinsaturés	36
Figure 13 : Les conséquences des altérations au niveau de l'ADN	41
Figure 14 : Exemple de noyaux de cellule d'hémolymphes endommagée et non endommagée. Hémolymphes prélevées chez la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> , marquage des noyaux par GR.	42
Figure 15 : Les deux mécanismes possibles à la formation d'un micronoyau suite à l'exposition à un agent génotoxique	43
Figure 16 : Morphologie interne des valves (a) et anatomie du corps mou de la moule	48
Figure 17 : les différentes conditions de l'exposition de la moule au B[a]P et au gradient de température.	54
Figure 18 : Bilan hydrologique de la lagune de Bizerte durant la saison hivernale (a) et la saison estivale	56

Liste des Figures

Figure 19 : Localisation des sites d'étude	58
Figure 20 : Utilisation des tissus de <i>Mytilus galloprovincialis</i> pour la mesure des biomarqueurs	61
Figure 21 : Hydrolyse de la thiocholine en présence de DTNB	62
Figure 22 : Réaction du malonedialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique	65
Figure 23 : Les étapes de quantification des MXR	73
Figure 24 : Variation des enzymes de biotransformation BPH et GST au niveau de la glande digestive des moules <i>Mytilus galloprovincialis</i> suite à l'exposition à une dose subléthale de B[a]P et à un gradient croissant de température pendant sept jours.	81
Figure 25 : Réponse des biomarqueurs de stress oxydatif au niveau de la glande digestive <i>Mytilus galloprovincialis</i> suite à l'exposée au B[a]P et à un gradient croissant de température.	82
Figure 26 : évaluation de l'effet d'une dose subléthale de B[a]P et de l'élévation de la température sur l'activité acétylcholinestérase au niveau de la glande digestive de moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> après sept jours d'exposition.	83
Figure 27 : fréquence des micronoyaux au niveau des cellules de la glande digestive des moules <i>Mytilus galloprovincialis</i> exposées pendant sept jours à une dose de B[a]P et à un gradient croissant de température	85
Figure 28 : Evolution de l'indice de condition des moules (n=30 individus) prélevées à Menzel Abdelrahmen (Site 1) et à la baie des carrières (Site 2) entre avril 2011 et mars 2013	99
Figure 29 : Variation des indices gonadiques chez la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> prélevée de deux sites dans la lagune de Bizerte au cours de la période Avril 2011-Mars 2013(n=30).	101
Figure 30 : Variation de la teneur en métaux traces (Cu, Cd, Zn et Ni) dans la glande digestive de <i>M.galloprovincialis</i> provenant de deux sites de la lagune de Bizerte	103
Figure 31 : Temps de survie des moules prélevées de Menzel Abdelrahmen (site 1) et de la baie des carrières (site 2) dans la lagune de Bizerte, n=30	113
Figure 32 : Evolution de la stabilité des membranes lysosomales dans les hémocytes de moules (n=10 individus) prélevées à Menzel abdelrahmen (site1) et à la baie des carrières	115
Figure 33 : Evolution de l'activité benzopyrène hydroxylase (moyenne ± écart type, n=10 individus) entre avril 2011 et Mars 2013 mesurée dans la glande digestive de la moule <i>M.galloprovincialis</i>	117
Figure 34 : Evolution de l'activité glutathion S-transférase entre avril 2011 et Mars 2013 mesurée dans la glande digestive de la moule <i>M.galloprovincialis</i>	119
Figure 35 : Evolution de l'activité multixénobiotiques résistance entre avril 2011 et Mars 2013 mesurée dans les branchies de la moule <i>M.galloprovincialis</i>	121

Liste des Figures

Figure 36 : Evolution de l'activité catalase (moyenne $\pm$ écart type, n=10 individus) entre avril 2011 et Mars 2013 chez la moule <i>M.galloprovincialis</i>	123
Figure 37 : Evolution du taux d'accumulation des Thiobarbituric acid reactive (TBARS) entre avril 2011 et Mars 2013	125
Figure 38 : Evolution de du taux d'accumulation des métallothionéines entre avril 2011 et Mars 2013 mesurée dans la glande digestive de la moule <i>M.galloprovincialis</i>	127
Figure 39 : Evolution de l'activité acétylcholinestérase entre avril 2011 et Mars 2013 mesurée dans les branchies de la moule <i>M.galloprovincialis</i>	129
Figure 40 : Indice de cassures de l'ADN exprimé par le Olive Tail Moment (OTM) dans les cellules d'hémolymphe de moules prélevées mensuellement de deux sites de la lagune de Bizerte.	131
Figure 41 : Intégration des biomarqueurs analysés chez la moule <i>M.galloprovincialis</i> provenant de Menzel Abdelrahmen et de la baie des carrières entre avril 2011 et septembre 2012.	132
Figure 42 : évolution de l'indice des réponses de biomarqueur (IBR) et de la température dans la lagune de Bizerte durant la période avril 2011-mars 2013	135

	Page
Tableau 1 : Impacts du changement climatique sur les milieux physique et chimique, et biologique.	9
Tableau 2 : Valeurs des concentrations minimales et maximales/ ou la moyenne des éléments traces mesurés dans les sédiments des certaines lagunes méditerranéennes	12
Tableau 3 : Les méthodes d'évaluation de l'activité des mécanismes de défense multixénobiotiques chez les bivalves	40
Tableau 4 : Contribution des différentes sources de pollution de la lagune de Bizerte	57
Tableau 5 : Gamme étalon du glutathion réduit	67
Tableau 6 : Composition du tampon de lyse	69
Tableau 7 : Concentration du B[a]P dans la glande digestive de <i>Mytilus galloprovincialis</i>	80
Tableau 8 : Variation des paramètres physico-chimiques de l'eau de la lagune de Bizerte	97
Tableau 9 : Evolution de la bioaccumulation des métaux traces (Cadmium(Cd) ; Cuivre (Cu), Zinc (Zn) et Nickel (Ni)) au niveau de la glande digestive de <i>M.galloprovincialis</i>	105
Tableau 10 : Evolution de la bioaccumulation des HAPs dans la glande digestive de <i>Mytilus galloprovincialis</i> provenant de Menzel abdelrahmen (site 1) dans la lagune de Bizerte	109
Tableau 11 : Evolution de la bioaccumulation des HAPs dans la glande digestive de <i>Mytilus galloprovincialis</i> provenant de la baie des carrières (site 2) dans la lagune de Bizerte	109
Tableau 12 : Evolution de la bioaccumulation des PCBs dans la glande digestive de <i>Mytilus galloprovincialis</i> provenant de Menzel abdelrahmen (site 1) dans la lagune de Bizerte	112
Tableau 13 : Evolution de la bioaccumulation des PCBs dans la glande digestive de <i>Mytilus galloprovincialis</i> provenant de la baie des carrières (site 2) dans la lagune de Bizerte	112
Tableau 14 : les niveaux de base (BAC) et les seuils d'effet (EAC) des biomarqueurs chez <i>Mytilus galloprovincialis</i> vivant dans la lagune de Bizerte	136

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	
A. Changement climatique et contamination chimique de la mer Méditerranée	6
I. Le changement climatique	6
1. Processus général du changement climatique	6
2. Impacts du changement climatique	8
II. Etat du bassin méditerranéen	10
1. Cadre géographique	10
1.1. Le système lagunaire en Méditerranée	11
1.2. Impacts des activités humaines sur les différents compartiments de l'écosystème lagunaire.....	12
2. Contraintes et pressions anthropiques en méditerranée.....	14
2.1. Les principales sources de pollution	14
2.2. Les polluants majeurs en Méditerranée.....	16
B. La surveillance biologique et chimique dans le milieu marin.....	23
I. Les programmes de surveillance en Méditerranée Nord Occidentale.....	23
1. Evolution du cadre réglementaire de la surveillance	23
2. Directive cadre sur l'eau (DCE)	23
3. La directive-cadre « stratégie pour le milieu marin » (DCSMM)	25
4. Le Plan d'Action pour la Méditerranée et le programme MEDPOL	26
II. Concept d'une approche intégrée chimie-biologie en écotoxicologie.....	27
1. L'approche chimique : détection et quantification des polluants.....	27
2. L'approche biologique : développement méthodologique.....	28
3. Les biomarqueurs: utilisation et application dans les programmes de biosurveillance	30
3.1. Application dans les programmes de biosurveillance	30
3.2. Avantages et limites de l'utilisation des biomarqueurs.....	31
C. Les biomarqueurs choisis pour l'étude de la lagune de Bizerte	32
1. L'acétylcholinestérase: un biomarqueur de neurotoxicité	32
2. Les biomarqueurs de stress oxydatif.....	33
1.1. La catalase	34
1.2. La peroxydation lipidique	35
3. Les métallothionéines: biomarqueur de stress métallique.....	37
4. Les biomarqueurs du mécanisme de biotransformation.....	37
4.1. La benzopyrène hydroxylase : enzyme de phase I.....	37
4.2. La glutathion-S transférase : enzyme de phase II de biotransformation	38
4.3. La résistance aux multixénobiotiques (MXR).....	39

5. Les biomarqueurs de génotoxicité	41
5.1. Le Test des Comètes	42
5.2. Le Test des micronoyaux.....	44
6. La stabilité des membranes lysosomales (SML)	45

Matériel et méthodes

A. Choix de l'espèce sentinelle : La moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	47
I. Classification, morphologie et écologie	47
1. Anatomie et physiologie de la moule	48
2. Le cycle sexuel de la moule	50
II. Intérêt de la moule comme espèce sentinelle	52
B. Etude expérimentale	53
Evaluation de l'effet combiné de l'élévation de la température et d'une dose subléthale du B[a]P sur les biomarqueurs de stress oxydatif chez <i>Mytilus galloprovincialis</i>	53
II. La substance testée : le benzo[a]pyrène	53
1. Structure et caractérisation chimique	53
3. Toxicité du B[a]P	53
II. Protocole expérimental	54
C. Etude in situ	55
Application d'une approche multibiomarqueurs chez <i>M. galloprovincialis</i> pour la biosurveillance de la lagune de Bizerte	55
I. Choix du site d'étude	55
1. Hydrologie et spécificités de la lagune.....	55
2. Sources majeures de pollution de la lagune	56
3. Localisation des sites de prélèvements	58
II. Méthodologie d'échantillonnage	58
III. Mesures des paramètres biométriques	59
1. L'indice de condition	59
2. Indice gonado-somatique.....	60
D. Dosages des biomarqueurs.....	61
1. Mesure de l'activité acétylcholinestérase	61
2. Dosage de l'activité enzymatique de la Benzopyrène Hydrolase	62
3. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase	63
4. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase	64
5. Le taux d'accumulation des malondialdéhydes	65
6. Le dosage des métallothionéines	66

7. Evaluation des cassures d'ADN via le test COMET	68
8. Détermination de la fréquence des micronoyaux	70
9. Evaluation de la stabilité des membranes lysosomales	71
10. Dosage immunologique des protéines de résistance aux multixénobiotiques	72
E. Analyses chimiques.....	74
I. Détermination des teneurs en métaux traces	74
II. Détermination des teneurs Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.....	75
III. Analyse des Polychlorobiphényles.....	75
F. Traitement des résultats.....	76
I. Calcul de l'indice IBR	76
II. Analyses statistiques	76

Résultats et discussion

A. Expérimentations au laboratoire	80
B. Expérimentation in situ.....	96
I. Les paramètres physico-chimiques de la lagune de Bizerte	96
II. Variation saisonnière des paramètres physiologiques chez <i>Mytilus galloprovincialis</i>	98
1. L'indice de condition	98
2. L'indice gonadique.....	100
III. La bioaccumulation des composés chimiques dans la glande digestive des moules.....	102
1. Teneurs en métaux traces	103
2. Teneurs en Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs).....	107
3. Teneurs en Polychlorobiphényles (PCBs)	110

IV. Évaluation de la variabilité saisonnière des biomarqueurs chez <i>Mytilus galloprovincialis</i> pendant un cycle de deux ans	113
1. Le stress on stress.....	113
2. La stabilité des membranes lysosomales	114

Les enzymes de Biotransformation

1. L'activité du benzopyrène hydroxylase (BPH) (enzyme de phase I)	117
2. L'activité de la glutathion S-transférase (GST) (enzyme de phase II).....	118
3. Les protéines de résistance aux multixénobiotiques (MXR) (protéine de phase III).....	120

Les biomarqueurs de stress oxydatif

1. L'activité de la catalase.....	122
2. Le taux d'accumulation des malondialdéhydes (MDA).....	125

Biomarqueur de stress métallique

1. Les métallothionéines (MTs)	126
<i>Biomarqueur de neurotoxicité</i>	
1. L'acétylcholinestérase (AChE).....	128
<i>Biomarqueur de génotoxicité</i>	
1. Le test des comètes	130
V. Indice composite : "Integrated Biomarker Responses"	132
VI. Les seuils de réponse des biomarqueurs étudiés dans la lagune de Bizerte	136
 Discussion générale	 155
Conclusion	161
Références bibliographiques	164

Introduction Générale

Située entre l'Europe, l'Afrique et l'Asie, la mer méditerranée est une mer semi fermée qui couvre 0.8% de l'océan mondial et renferme 10% de la biodiversité marine. Malgré sa superficie restreinte la mer méditerranéenne constitue un pôle économique mondial soumis à une surexploitation humaine. En effet, une soixantaine de plates-formes côtières d'exploitation pétrolières sont implantées 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...).

Le suivi de la contamination chimique et de ses effets sur l'ensemble des composantes d'un écosystème marin côtier est aujourd'hui recommandé en partant d'une échelle individuelle jusqu'à une échelle populationnelle (Roose et al., 2011). Cette démarche écotoxicologique a été agréée depuis une dizaine d'années. Dans le but de protéger les écosystèmes marins contre les effets contraignants de la pollution, des programmes de surveillance environnementale à long terme ont été mis en œuvre dès le début des années 70 (Goldberg, 1975) afin d'évaluer l'exposition des organismes marins. La stratégie était basée sur l'analyse des contaminants chimiques majeurs (hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), polychlorobiphényles (PCB), métaux lourds et pesticides organochlorés...) dans les différents compartiments de l'écosystème (eau, sédiment, organismes). Le volet des effets biologiques des contaminants chimiques s'est développé en parallèle avec le volet chimique mais avec des objectifs plus restreints en Europe. La priorité donnée à la contamination chimique et le manque de protocole standardisé en biologie sont en partie la cause des objectifs restreints. Depuis les années 1970, le volet des effets biologiques s'est principalement focalisé dans le cadre de la surveillance OSPAR, sur les assemblages de communautés phytoplanctoniques et le suivi de communautés benthiques. Depuis 2003 l'imposex (Roose 2011) est le premier biomarqueur retenu en surveillance de routine et un travail de développement méthodologique a été conduit pour proposer une nouvelle liste de biomarqueurs (Davis et Veethack 2012).

Parmi les contaminants chimiques les plus communément mesurés dans le cadre de la surveillance environnementale des écosystèmes aquatiques, les HAPs, les PCBs, les pesticides organochlorés et les métaux traces. Leurs caractères persistants dans l'environnement, les compétences analytiques et les tonnages d'utilisation constituaient les critères principaux de sélection.

La figure 1 issue d'un ouvrage du groupe d'experts internationaux du Marine Board (Roose et al., 2011) montre que l'évolution du nombre et de la diversité des substances recherchées augmentent de manière croissante depuis le début des années 1970. Cependant, l'écart se creuse chaque décennie, entre le nombre de molécules mesurées dans les programmes de surveillance et le nombre bien supérieur de nouvelles substances mises sur le marché identifiées sous l'appellation des substances émergentes.

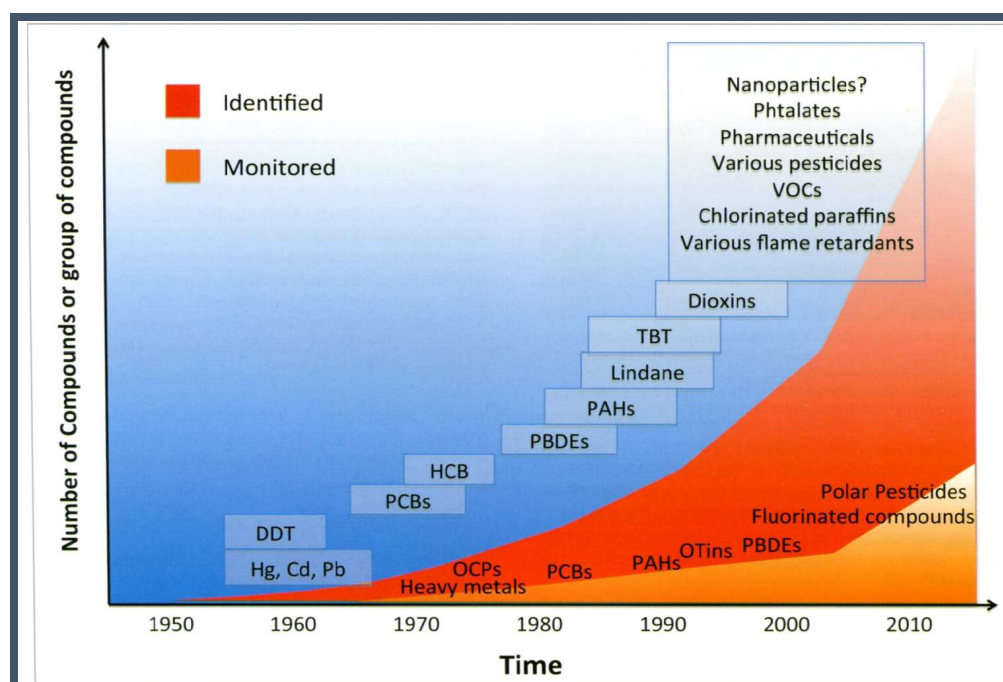


Figure 1 : Schéma illustrant l'écart se creusant entre la surveillance des substances dangereuses dans les programmes de surveillance nationaux et internationaux et l'émergence de nouvelles substances toujours plus diversifiées dans l'environnement depuis les années 1970 (Roose et al., 2011).

Dans ce contexte, les impacts croissants des activités humaines sur la mer Méditerranée ont incité les pays méditerranéens et l'Union Européenne à établir le Plan d'Action pour la Méditerranée (PAM) sous les auspices du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE). La Convention de mer régionale de Barcelone pour la Protection de la Mer Méditerranée contre la Pollution (MEDPOL), adoptée en 1976, soutient les efforts collectifs des Etats méditerranéens et de l'Union Européenne contre la pollution marine. Le programme MEDPOL permet de quantifier et qualifier la pollution marine, préserver la diversité biologique, et promouvoir la gestion des zones côtières (MEDPOL 2006).

Les activités de surveillance menées dans le cadre du MEDPOL se sont déroulées sur différentes phases (Phase I, II, III et IV) du MEDPOL, et avaient comme principaux objectifs : i) entreprendre des évaluations périodiques de l'état du milieu marin méditerranéen pour donner des renseignements sur l'état fondamental des zones soumises à des pressions anthropiques, ii) lutter contre la pollution d'origine terrestre au moyen du respect des limites réglementaires nationales et internationales et iii) contribuer en coopération avec d'autres composantes du PAM, à l'application de l'approche écosystémique à la gestion des activités humaines dans le cadre du PAM. Le MEDPOL constitue le volet « surveillance continue » et « évaluation ». Avec la mise en œuvre de la directive européenne sur le milieu marin, il apparaît aujourd'hui nécessaire d'harmoniser les démarches de surveillance et méthodologies en Atlantique Nord Est (convention OSPAR), en Baltique (convention Helcom) et en Méditerranée (convention Barcelone). Une démarche commune de pré-normalisation méthodologique de la surveillance est ainsi engagée entre les différentes conventions de mers régionales. Elle est à la base de ce sujet de thèse visant à harmoniser les méthodes OSPAR (CIEM) et Barcelone (MEDPOL) en intégrant les méthodes jugées les plus pertinentes en surveillance (MEDPOL 2006 ; WGBEC 2013) dans une étude des effets biologiques des polluants menée au sein d'une lagune tunisienne à Bizerte.

La sélection des biomarqueurs a ainsi été réalisée sur la base des recommandations combinées des conventions OSPAR et Barcelone. Parmi les biomarqueurs communs à OSPAR et Barcelone proposés chez la moule, le stress *on stress*, les métallothionéines et la stabilité de la membrane lysosomale. Le stress *on stress* consiste à évaluer le temps de survie des moules exposées à l'air, ce test peut nous révéler l'état de santé général (Viarengo et al., 2007). La stabilité de la membrane lysosomale (SML) est une réaction de stress général au niveau subcellulaire, considérée sensible à l'exposition aux contaminants, et est évaluée à travers le temps de rétention du rouge neutre (MEDPOL Phase IV). Le stress métallique que subissent les moules de la lagune de Bizerte a été évalué par la mesure des métallothionéines (MTs) (Viarengo et al., 1997). Une liste élargie de biomarqueurs pertinents proposés par OSPAR a permis d'évaluer leurs variations saisonnières spécifiques : Les activités de biotransformation ont été étudiées par la mesure de l'activité enzymatique de la Benzopyrène Hydroxylase (BPH) étant une enzyme de phase de fonctionnalisation de la phase métabolique I (Akcha et al., 2000), la mesure de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST) qui est une enzyme de conjugaison de la phase métabolique II (Cheung et al., 2001) et par la mesure de l'activité des protéines impliquées dans les mécanismes de résistance

multixénobiotiques (MXR) de la phase métabolique III (Minier et al., 1993). Le suivi de l'activité acétylcholinestérase (AChE) comme marqueur de neurotoxicité (Bocquené et Galgani, 1998), l'activité de la catalase (CAT) (Livingstone et al., 2001) et du taux d'accumulation du malonedialdéhyde (MDA) (Sunderman et al., 1987) comme des biomarqueurs de stress oxydatif. L'effet génotoxique des contaminants chimiques au niveau des cellules de l'hémolymphe a été évalué par le test Comet (Akcha et al., 2004).

Le suivi de la contamination côtière au moyen des bivalves du genre *Mytilus*, est très largement utilisé dans de nombreux programmes de surveillance à l'échelle mondiale. Il a été proposé par Goldberg dès 1975, par le concept “ *Mussel Watch* “. L'utilisation des moules comme espèce sentinelle dans de tels programmes de surveillance est basée sur des caractéristiques spécifiques à savoir, leur mode de vie sessile et euryhalin, leur pouvoir accumulateur des polluants présents dans l'environnement, la stabilité de leur population et la facilité de collecte à un coût modeste, leur tolérance à différents stress, et la possibilité de les transplanter et d'utiliser des individus de même cohorte. La répartition géographique de la moule *Mytilus galloprovincialis*, fait d'elle un bon modèle biologique qui nous a incité à l'utiliser dans cette étude afin de suivre et d'évaluer les effets combinés des polluants chimiques et la variations des facteurs environnementaux dans un écosystème méditerranéen soumis à une forte influence continentale comme notamment la lagune de Bizerte au nord-est de la Tunisie.

Le premier objectif de ma thèse vise à étudier la variation des réponses biochimiques et physiologiques chez la moule *Mytilus galloprovincialis* provenant de deux sites différents de la lagune de Bizerte pendant deux cycles saisonniers. Cette évaluation se base sur un suivi mensuel des facteurs physico-chimiques et des paramètres de croissance et de reproduction qui interagissent directement sur les biomarqueurs. Le suivi a été réalisé sur une même cohorte issue de la lagune et exposée de manière permanente à une contamination diffuse.

Le deuxième objectif consiste à déterminer l'amplitude de variation de la réponse biologique globale caractérisée par l'ensemble des biomarqueurs pendant deux cycles saisonnier. Cette amplitude de réponse d'adaptation métabolique globale qui varie pendant les deux cycles saisonniers permet de caractériser des seuils de réponse maximale et minimale intégrant les interactions du cycle physiologique et des variations abiotiques comme la température, la salinité et l'oxygène. Les variations de chaque biomarqueur permettent de déterminer un seuil de base spécifique sur une région peu contaminée (BAC : background

assessment criteria) et un seuil de réponse maximale assimilé à un seuil de stress sur le site le plus contaminé (EAC : Evaluation assessment criteria). La détermination des deux seuils de réponse biologique sur deux sites d'un niveau de contamination chimique différents permet une interprétation standardisée des biomarqueurs chez *M. galloprovincialis*.

Le troisième objectif était de développer une méthode d'interprétation intégrée chimie biologie à partir des seuils déterminés dans la lagune de Bizerte. L'application de l'indice composite IBR (Beliaeff et Burgeot, 2002) développé par le CIEM/OSPAR a tout d'abord permis de déterminer la réponse globale d'adaptation métabolique suivant deux cycles saisonniers. L'IBR a ensuite été comparé à la méthode de syndrome de stress développée en méditerranée (Viarengo et al., 2007). Puis, la méthode intégrée de chimie biologie proposée par OSPAR (Davies et Vethaack, 2012) a été appliqué dans la lagune de Bizerte pour compléter les informations données par l'IBR et le syndrome de stress.

Synthèse Bibliographique

A. Changement climatique et contamination chimique de la mer Méditerranée

I. Le changement climatique

Au cours du sommet de la terre tenu en 1992 à Rio de Janeiro, la Méditerranée semblait être restée en retrait ou du moins en retard par rapport aux autres problèmes écologiques planétaires. La décennie 2000 a vu s'amorcer un virage autour du changement climatique et la Méditerranée. Celle-ci est aujourd'hui présentée comme un « hot-spot », une région du globe particulièrement concernée par les effets du réchauffement climatique selon les experts climatologues et notamment ceux du groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC).

Outre les événements climatiques violents annoncés (inondations, coulées de boue, feux...) et l'augmentation du niveau de la mer, la Méditerranée est pointée du doigt à cause d'un certain nombre de facteurs comme l'augmentation de l'urbanisation des zones côtières et les activités telluriques. Le constat est donc alarmant : ces phénomènes géographiques pourraient devenir des facteurs aggravants en termes d'impacts des effets du changement climatique sur la région. Dans ce contexte, la problématique du changement climatique, pourtant complexe et polémique, a joué un rôle mobilisateur en Méditerranée. Finalement, les impacts annoncés du réchauffement ont permis d'impulser un cadre de réflexion et de coopération et des actions qui vont dans le sens d'une prise de conscience du patrimoine naturel commun que représente la Méditerranée et surtout de sa fragilité face aux changements climatiques (communication personnelle de l'Institut de la Méditerranée).

1. Processus général du changement climatique

Le climat atmosphérique et le climat océanique sont étroitement liés, en effet, l'océan joue un rôle important dans la régulation des profils météorologiques et climatiques régionaux et globaux. Il est connu que les teneurs croissantes en gaz à effet de serre anthropiques contribuent à l'augmentation de la moyenne des températures atmosphériques de la planète depuis le milieu du XXe siècle. L'augmentation des teneurs atmosphériques en dioxyde de carbone (CO₂) accroît également l'acidité de l'océan (Figure 2).

Le changement climatique et l'acidification des océans présentent des menaces sérieuses pour les écosystèmes marins et affecteront en fin de compte le bien être de

l'Homme. Il s'agit notamment de l'impact de la montée du niveau de la mer, et des modifications de la biodiversité et des stocks halieutiques.

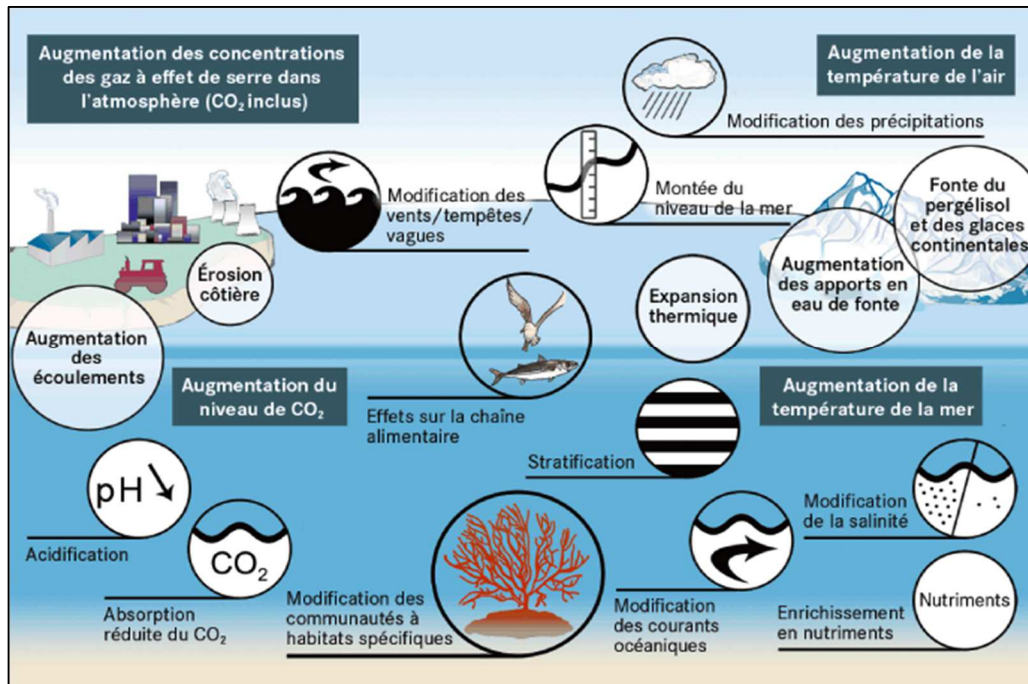


Figure 2 : Récapitulatif du changement climatique et de l'acidification des océans.

Les conséquences directes des émissions post-industrielles comprennent l'augmentation globale de la température, la perturbation des conditions météorologiques régionales, la hausse du niveau des mers, l'acidification des océans, les charges de nutriments changés et la circulation océanique altérée. Ceux-ci et d'autres conséquences physiques ont une incidence sur les processus biologiques marins des gènes aux écosystèmes, sur des échelles de bassins à océan, impactant le fonctionnement des écosystèmes et menaçant la sécurité alimentaire humaine (Andrew et al., 2009).

Le réchauffement observé pendant plusieurs décennies a été relié aux changements survenus dans le cycle hydrologique à grande échelle, notamment : l'augmentation de la teneur en vapeur d'eau de l'atmosphère, la modification de la configuration, de l'intensité et des extrêmes des précipitations, la diminution de la couverture neigeuse et la fonte des glaces accrue, ainsi que la modification de l'humidité du sol et du ruissellement. Les changements dans les précipitations sont très variables à l'échelle spatiale et d'une décennie à l'autre.

L'augmentation de la température des eaux et les variations des phénomènes extrêmes, notamment les crues et les sécheresses, devraient influencer la qualité de l'eau et aggraver de

nombreuses formes de pollution aquatique (sédiments, nutriments, carbone organique dissous, organismes pathogènes, pesticides et sel) ainsi que la pollution thermique, avec d'éventuelles conséquences néfastes sur les écosystèmes, la santé publique, la fiabilité des systèmes de distribution d'eau et les coûts d'exploitation. De plus, l'élévation du niveau de la mer devrait étendre les zones de salinisation des eaux souterraines et les estuaires, ce qui entraînera une diminution de la disponibilité en eau douce pour l'homme et les écosystèmes dans les zones côtières. L'ensemble de ces processus doit ainsi être étudié à différentes échelles physiques, géographique et biologiques. Nous avons situé ce travail de thèse à l'échelle biologique chez un mollusque bivalve *Mytilus galloprovincialis* vivant dans une lagune méditerranéenne en Tunisie.

2. Impacts du changement climatique

L'influence anthropique sur le climat est devenue de plus en plus perceptible par des rejets massifs de gaz à effet de serre (GES) et par des perturbations à grande échelle du cycle de l'eau. De nombreuses mesures ont permis de mettre en exergue la réalité du changement climatique ainsi que de l'accroissement des GES d'origine humaine depuis le début de la révolution industrielle. En effet, l'intensification de l'activité humaine durant les dernières décennies a sensiblement augmenté les concentrations des différents GES dans l'atmosphère, et renforcé leurs effets sur le climat.

Différents rapports émis par le Groupe Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC), indiquent que des changements climatiques notables liés aux effets des GES se font déjà ressentir sur les écosystèmes, sous l'influence d'une augmentation de la fréquence des événements extrêmes (inondations, sécheresses, cyclones, etc.), par la raréfaction de l'eau, une dégradation des terres.

Le groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) de l'ONU a averti que si les émissions de GES se poursuivent à un niveau égal ou supérieur au niveau actuel, le réchauffement sera plus important. Toute une série d'impacts sur le milieu sont attribués au changement climatique (Tableau 1), soit directement (modification de la température de la mer) soit indirectement (modification de la saisonnalité de la distribution et de l'abondance des espèces). Il est difficile de prédire l'impact des futures tendances climatiques sur les écosystèmes marins, du fait de plusieurs incertitudes dont celles des scénarios sur les futures émissions des GES. Il est également nécessaire de comprendre les

réactions des écosystèmes marins face aux changements. Les divers impacts du changement climatique projetés pour diverses composantes des écosystèmes marins sont énumérés dans le tableau.

Tableau 1 : *Impacts du changement climatique sur les milieux physique et chimique, et biologique.*

	Impacts du changement climatique
Milieu physique et chimique	Augmentation de la température de la mer
	Retrait de la banquise
	Augmentations des apports d'eau douce
	Modification de la salinité
	Stratification des eaux épicontinentales
	Tempêtes plus fréquentes
	Montée du niveau de la mer
	Absorption réduite du CO ₂
	Acidification
	Erosion côtière
	Enrichissement en nutriments
Milieu biologique	Plancton : Déplacement vers le nord des espèces sur le plateau et en haute mer
	Efflorescences algales nuisibles : incidence potentiellement croissante due aux modifications de la température, de la salinité et de stratification des eaux
	Poisson : la hausse de la température pourrait accroître l'incidence de maladies pour le poisson et les mollusques et crustacés d'élevage
	Mammifères marins : perte d'habitat pour les mammifères tributaires de la banquise. Des modifications de la disponibilité des espèces-proies sont probables.
	Oiseaux de mer : les impacts sur les oiseaux de mer risquent d'être influencés par des modifications de la disponibilité de la nourriture plutôt que par la perte de nids causée par les changements météorologiques
	Espèces non indigènes : l'accroissement de l'invasion et de leur établissement est probablement facilité par le changement climatique et présente un risque grave pour les écosystèmes existants
	Communautés intertidales : les aires de distribution des diverses espèces intertidales continuent à s'étendre et à rétrécir
	Ecologie benthique : les organismes benthiques sessiles tolèrent bien des modifications environnementales modérées sur des périodes d'adaptation raisonnables mais ils sont très vulnérables dans le cas d'événements abrupts et extrêmes

Selon le quatrième rapport du GIEC (2007), les impacts sectoriels et régionaux du changement climatique se résument comme suit : Une hausse du niveau moyen des mers, pouvant conduire à une salinisation des nappes phréatiques côtières, une élévation de la température de l'eau qui devrait entraîner une baisse de sa qualité (altération des processus biochimiques et diminution des taux en oxygène), les écosystèmes côtiers (récifs et atolls coralliens, marais salins et mangroves...) seront envahis par élévation du niveau de la mer, avec une hausse de la température de la mer et un changement dans la fréquence et dans

l'intensité des tempêtes, les inondations augmenteront en ampleur et en fréquence dans la plupart des régions, une baisse minime des températures des zones tropicales conduira à une diminution globale des rendements de culture, une amplification de la dégradation des sols et des ressources en eau, et la sécurité alimentaire dans les Pays en Développement (PED) et Pays les Moins Avancés (PMA) sera affaiblie.

II. Etat du bassin méditerranéen

1. Cadre géographique

La mer Méditerranée a une superficie de 2.5 Km², elle représente 0.7% de la surface des mers du globe. Ses côtes s'étendent sur 46.000 km en passant par 22 pays peuplés par plus de 400 millions d'habitant. La Méditerranée est une mer semi-fermée et peu brassée, à l'ouest elle est ouverte sur l'océan atlantique par le détroit de Gibraltar (ouverture naturelle) et elle reliée à la mer rouge par le canal de Suez. Sa profondeur atteint rapidement plus de 2 000 m sur l'ensemble du bassin maritime avec des fosses de plus de 5 000 m.

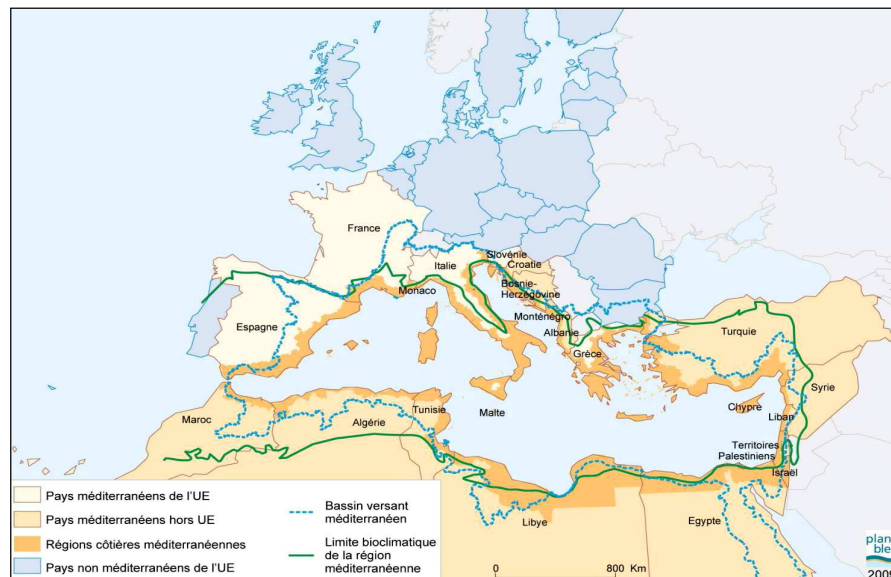


Figure 3 : Le bassin méditerranéen.

La mer Méditerranée est située dans une zone aride, les précipitations et les apports des bassins versants ne suffisent pas pour compenser les pertes dues à l'évaporation estimées à 3130 Km³/an ce qui entraîne une baisse de niveau évalué à 0,62 m/an, ce déficit est comblé par les apports hydrologiques de la mer Noire (180 Km³/an) et surtout de l'Atlantique (1520 Km³/an). Les échanges se font à l'aide d'un double courant : un courant sortant qui est situé entre 150 et 300 m de profondeur (Méditerranée-Atlantique) et un courant entrant qui se situe

entre la surface et une profondeur de 150 m. Ces mouvements s'effectuent à la vitesse de 100cm/s. Cette évaluation des échanges permet d'estimer que, en moyenne les eaux de la Méditerranée se renouvellent en 80 à 100 ans. Ces mouvements hydrologiques créent des courants dont la mécanique repose principalement sur les différences de température et de salinité les eaux les plus salées ou les plus froides circulant en profondeur.

1.1. Le système lagunaire en Méditerranée

Les lagunes sont des étendues d'eau généralement peu profondes séparées de la mer par un cordon littoral (tombolo, lido...). Les lagunes constituent un modèle d'écosystème paralique ayant un rôle écologique très important sur plusieurs points ; en effet, grâce à sa capacité de stockage la lagune régule le flux hydraulique, joue le rôle de filtre en épurant l'eau de ruissellement, protège de l'érosion côtière grâce à la végétation qui l'accompagne, en effet c'est un milieu qui se caractérise par une forte production biologique.

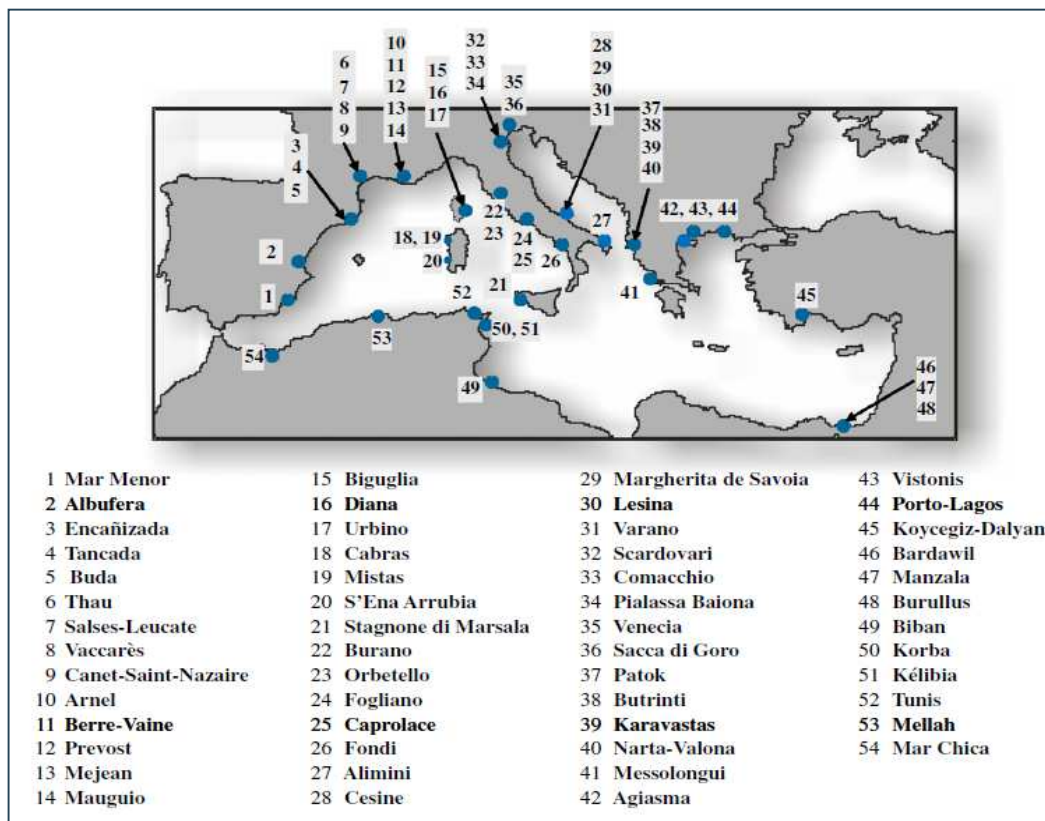


Figure 4 : Les lagunes méditerranéennes dont les données hydrologiques, géomorphologiques et écologiques sont disponibles dans la littérature scientifique (Pérez-Ruzafa et al., 2011).

D'une manière générale, les lagunes se caractérisent par une productivité biologique assez élevée (Yáñez-Arancibia et Nugent, 1977 ; Clark, 1998 ; Alongi, 1998), en effet, plus de 621 espèces des macrophytes et 199 de poissons sont présents dans les lagunes côtières dans la région Atlanto-Méditerranéenne (Pérez-Ruzafa et al., 2010). Cette richesse écologique leur confère un intérêt économique important se traduisant par la pêche, les installations portuaires et le tourisme (activités nautiques, plongée sous-marine...).

1.2.Impacts des activités humaines sur les différents compartiments de l'écosystème lagunaire

Les lagunes se caractérisent par leur relation étroite avec les limites de l'environnement terrestre ce qui les rend particulièrement vulnérables à l'impact des activités humaines, aux apports d'eau douces qui augmentent le taux de sédimentation, le risque d'eutrophisation et de la pollution (Gamito et al., 2005 ; Pérez-Ruzafa et al., 2000, 2002, 2005b). Les lagunes méditerranéennes sont victimes de divers types de polluants d'origine anthropiques principalement, les pesticides pas lessivage du sol, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les métaux traces, etc. (Tableau 2).

Tableau 2 : Valeurs des concentrations minimales et maximales/ ou la moyenne des éléments traces mesurés dans les sédiments des certaines lagunes méditerranéennes (les concentrations sont exprimées en ppm).

	Lagune de Bizerte (Tunisie) Ben Garali et al (2010)	Lagune de Sidi Moussa (Maroc) Maanan et al (2004)	Lagune de Thau (France) Rigollet et al (2004)	Lagune de Venise (Italie) Rigollet et al (2004)	Lagune de Homa (Turquie) Uluturhan et al (2011)
Zn	32 – 749,8	19 - 73	23,8 – 51,5	48,3 - 95,7	46,2 - 91,9
Cu	1 - 67,4	20 - 42	12,2 - 27,2	4,4 - 21,7	10,3 - 25,8
Pb	32,1 - 303,9	—	8,2 - 20,9	5,2 - 7,7	2,43 - 17,2
Ni	2,6 - 192	18 - 43	4,91-14,6	10,2 - 15	51,8 - 108
Mn	31,2 - 178,7	—	154 - 218	313 - 355	410 - 729
Cr	—	55 - 188	13,3 - 38,2	36,6 - 64,9	83,9 - 129
Cd	—	—	0,2 - 0,94	0,21 - 0,47	0,06 - 0,19
Fe	—	1,1 - 4,5	4613 - 8058	12646 - 16128	17,05 - 30,23
Hg	—	—	—	—	0,22 - 0,48
Al	—	2,9 - 11,3	—	—	12,66
Li	—	—	—	—	11,4 - 4,2

En raison de leur importance pour les activités humaines et leur vulnérabilité, il y a une prise de conscience croissante concernant la nécessité de protéger et gérer les lagunes côtières. Toutefois, afin de bien gérer un système, nous avons besoin tout d'abord de connaître

ses composantes, la manière dont ces éléments sont liés et leurs mécanismes de fonctionnement, ainsi que les relations de cause/ effet entre les activités humaines et l'altération des processus écologiques (Pérez-Ruzafa et al., 2011).

La majorité des lagunes côtières ont une longue histoire d'usage et ont été soumises à de fortes pressions anthropiques depuis plusieurs décennies, parmi les activités qui ont le plus impacté les écosystèmes lagunaires on cite l'évolution de l'agriculture et l'usage intense des engrais et la déforestation qui a augmenté le taux de sédimentation. En effet, dans certaines lagunes, tels que la lagune Mar Menor, qui a été affecté par l'exploitation minière qui a existé depuis l'époque romaine et qui est responsable de l'introduction des quantités élevées de métaux lourds dans les sédiments de la lagune (Pérez- Ruzafa et al., 1987, 2005b). D'autres activités, telles comme l'extraction du sel ou de l'ouverture de canaux artificiels pour la pêche, ont été développées au cours des XVIIIe et XIXe siècles dans de nombreuses lagunes de la Méditerranée. Enfin, l'urbanisation des littoraux, l'élargissement des canaux et la construction des ports de loisirs et des plages artificielles sont considérés comme les causes principales de la vulnérabilité des écosystèmes lagunaires côtiers. Toutes ces activités ont eu un effet sur l'organisation spatiale et le confinement des communautés phytoplanctoniques et benthiques, la biodiversité, la productivité et la biomasse qui varient selon les canaux de liaisons avec la mer (Mariani, 2001).

En outre, la forte urbanisation et l'aménagement des littoraux ont contribué à la modification topographique de certaines lagunes méditerranéennes et ceci se manifeste par un changement du taux de sédimentation, et de la profondeur des lagunes qui est principalement dû à la construction des digues et des marinas et la modification des structures des entrées naturelles, de plus, les activités de dragage et du pompage du sable ont provoqué la modification des caractéristiques des sédiments ce qui a comme conséquence la substitution de la végétation sur les fonds sableux accompagné par la substitution d'invertébrés et des poissons (Pérez- Ruzafa et al., 1991). Ainsi, toute activité qui modifie les caractéristiques de la lagune comme leur taille, périmètre ou le développement côtier, l'échange des eaux via les caractéristiques des entrées, le taux de renouvellement, de fond et les sédiments, aura des conséquences importantes sur le biote et les processus écologiques, et doivent donc être étudiés et évalués.

2. Contraintes et pressions anthropiques en méditerranée

La pollution marine et terrestre affecte les eaux côtières de la Méditerranée. Les sources situées à terre sont responsables de 80% de la pollution totale affectant la Méditerranée au cours des trente dernières années et des réponses ont été développées pour la réduire et l'éliminer dans toute la mesure du possible. Les effluents urbains et industriels, sont dans la plus part du temps les acteurs majeurs du déséquilibre écologique au niveau des écosystèmes côtiers (Chuanga et al., 2008). Selon l'Agence Européenne de l'Environnement (AEE Le milieu marin et littoral Méditerranéen - état et pressions, Rapport de l'Agence Européenne pour l'Environnement (AEE), op.cit., pp.13-14.), les principaux facteurs qui occasionnent des altérations de la biodiversité et une dégradation de la qualité des écosystèmes méditerranéens sont ; l'eutrophisation résultant de l'agriculture, le développement urbain, la pollution industrielle, la pêche et la surexploitation des ressources biologiques, et les invasions biologiques liées au trafic maritime et à l'aquaculture.

2.1. Les principales sources de pollution

2.1.1. L'urbanisation et l'industrialisation

Les rives de la Méditerranée sont surpeuplées : Au total, les populations côtières sont passées de 96 millions d'habitants à 145 millions, soit 51% d'augmentation, dont 17.2% pour la rive Nord et 84% pour les rives Est et Sud, ceci sur un espace (Figure 5). Plus de 200 millions de touristes visitent la région méditerranéenne ; plus de 200 installations pétrochimiques et énergétiques, industries chimiques et usines de chlore sont situées le long de la côte méditerranéenne.

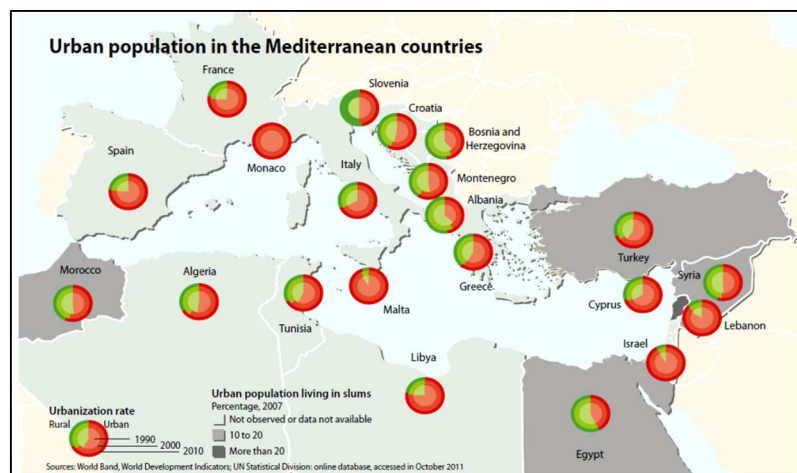


Figure 5 : L'urbanisation des villes côtières de la méditerranée (Source Plan Bleu 2004).

Cette concentration démographique sur les rivages de la Méditerranée est à l'origine de la pollution occasionnée par la décharge directe ou indirecte de déchets solides et d'ordures dans la mer contribuant grandement à la dégradation de la frange côtière marine et de la vie aquatique de la Méditerranée.

Les déchets solides municipaux englobent les ordures des ménages, les déchets organiques, les matières plastiques. Selon les estimations, dans la région méditerranéenne, la production annuelle moyenne de déchets solides atteint 254 kg par personne et enregistre un taux d'accroissement annuel de 2-3 % (Figure 6).

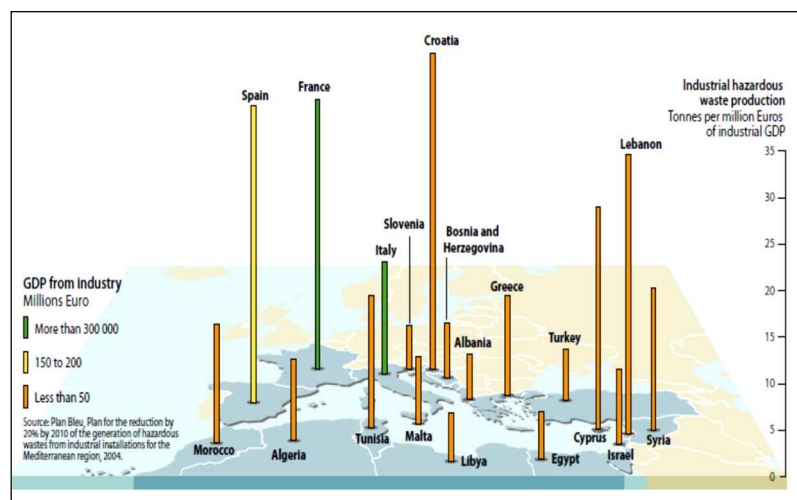


Figure 6 : Les déchets toxiques issus des industriels implantés dans les pays méditerranéens (Source Plan Bleu 2004).

Des données provenant du Programme de surveillance et de recherche en matière de pollution dans la région méditerranéenne, le MED POL /PAM et d'autres sources régionales montrent que de 30 à 40 millions de tonnes de déchets solides municipaux aboutissent dans la mer chaque année. On estime par ailleurs que 30 à 50 % des déchets atteignant la mer Méditerranée pourraient provenir de décharges illégales.

2.1.2. Le transport maritime et l'exploitation pétrolière en mer

La mer Méditerranée est exposée à une intense activité maritime. Elle supporte 30% du commerce maritime mondial dont 22% du trafic pétrolier mondial. Plus de 2 000 navires sont en permanence à la mer avec, parmi eux, 200 à 300 pétroliers pour un total annuel moyen de l'ordre de 220.000 navires navigant en Méditerranée (source CEDRE). Beaucoup de marchandises transportées sont des marchandises dangereuses, dont la perte peut causer de

graves dégâts à l'environnement marin. Il y a environ 2200 produits chimiques qui circulent sur les voies maritimes internationales (GESAMP, 1982, 1989).

La Méditerranée subit non seulement les effets des déversements accidentels, mais aussi de la pollution intentionnelle par les navires. En tant que «Zone spéciale» selon les termes de la Convention MARPOL 73/78 (Annexe 1, Règle 10), le rejet d'hydrocarbures ou de mélanges d'hydrocarbures par les navires est interdit, sauf dans certains cas bien définis. Cependant, la Convention est fréquemment ignorée et les rejets opérationnels des bateaux représentent une grande proportion des hydrocarbures rejetés dans cette mer régionale.

La pollution pétrolière est liée aussi aux itinéraires d'expédition et aux quais de chargement et de déchargement de ces produits. En effet, le trafic pétrolier est très important dans le bassin méditerranéen qui est traversé en permanence par quelque 2000 navires dont deux à trois cents environ transportent du pétrole ou des produits pétroliers. Approximativement 370 millions de tonnes de pétrole (20% de la production mondiale) transitent chaque année par la région méditerranéenne. Les risques de pollution par les hydrocarbures sont très importants. En moyenne, on dénombre 60 incidents chaque année dont 60% se produisent à proximité des installations pétrochimiques. Il existe une soixantaine de plateformes côtières d'exploration et d'exploitation d'hydrocarbures en Méditerranée. Vu les caractéristiques particulières de l'hydrologie et de la courantologie en Méditerranée (une mer semi-fermée et peu brassée), un accident de plateformes aurait des conséquences néfastes sur l'écosystème. La présence de ces implantations dans la mer représente des risques liés à l'ancienneté de certaines de ces installations, ou au déport vers le fond de la mer des opérations de traitement des fluides dans les installations les plus modernes.

2.2. Les polluants majeurs en Méditerranée

Le faible échange d'eau rend la mer Méditerranée un écosystème vulnérable à l'accumulation de polluants, en effet, le bassin méditerranéen est exposée à une pollution émergente et permanente causée par l'industrie, l'agriculture et la forte urbanisation des villes côtières. Ces sources de pollution sont considérées comme l'un des problèmes écologiques importants dans la majorité des pays méditerranéens. La diversité de produits chimiques nécessaires à la fabrication de nombreux produits domestiques et industriels, tels que les plastiques, les pesticides, engrais, solvants, et une multitude de molécules d'origine pharmaceutique, constituent une menace pour la Méditerranée.

Ces substances chimiques toxiques sont rejetées dans l'environnement soit directement lorsqu'elles sont utilisées par l'homme, c'est le cas des pesticides, des fertilisants et des différents solvants, soit indirectement sous forme de déchets industriels provenant de diverses activités comme l'extraction minière, la fabrication industrielle, l'incinération, la consommation de carburants ou les rejets accidentels.

2.2.1. Les métaux lourds

Les métaux lourds (fer, nickel, plomb, cuivre, chrome, zinc...) pénètrent dans le milieu marin : par ruissellement de surface d'origine pluviale, par les retombées atmosphériques directes et par les rejets provenant de réseaux d'égouts et établissements industriels. Une étude faite dans le cadre du Plan d'action pour la Méditerranée (PAM) (PNUE/ PAM /MED POL 2011) donne un aperçu basé sur la base de données MED POL et les publications récentes concernant la répartition et les tendances des métaux lourds (plomb, mercure, cadmium, zinc et cuivre) dans les sédiments côtiers et les biotes (*Mytilus galloprovincialis*) (Figure 7).

Dans les pays méditerranéens, selon le recensement du « National Baseline Budget (BNB) », les émissions atmosphériques de métaux traces sont principalement liés à l'industrie du ciment (Hg, Cu), la production de l'énergie (As, Cd, Ni) et l'industrie des métaux (Pb, Zn), à ceci s'ajoute l'industrie des engrais chimiques, l'inefficacité de certains systèmes d'épuration des eaux usées qui la cause principale de la présence du Cd et du Cu dans le milieu marin. En outre, le raffinage du pétrole constitue la principale source de rejets du chrome dans l'environnement (PNUE/PAM /MEDPOL, 2012).

Mis à part les sources directes définies par les rejets urbains et industriels, le ruissellement contribue fortement à la présence des métaux traces d'origine anthropique et naturelle dans les zones côtières. Les métaux lourds provenant de sources terrestres peuvent non seulement s'accumuler dans la zone côtière, mais également se déplacer dans les zones les plus profondes de la marge continentale par advection, et même dans le bassin profond à travers les processus de transfert pente descendante.

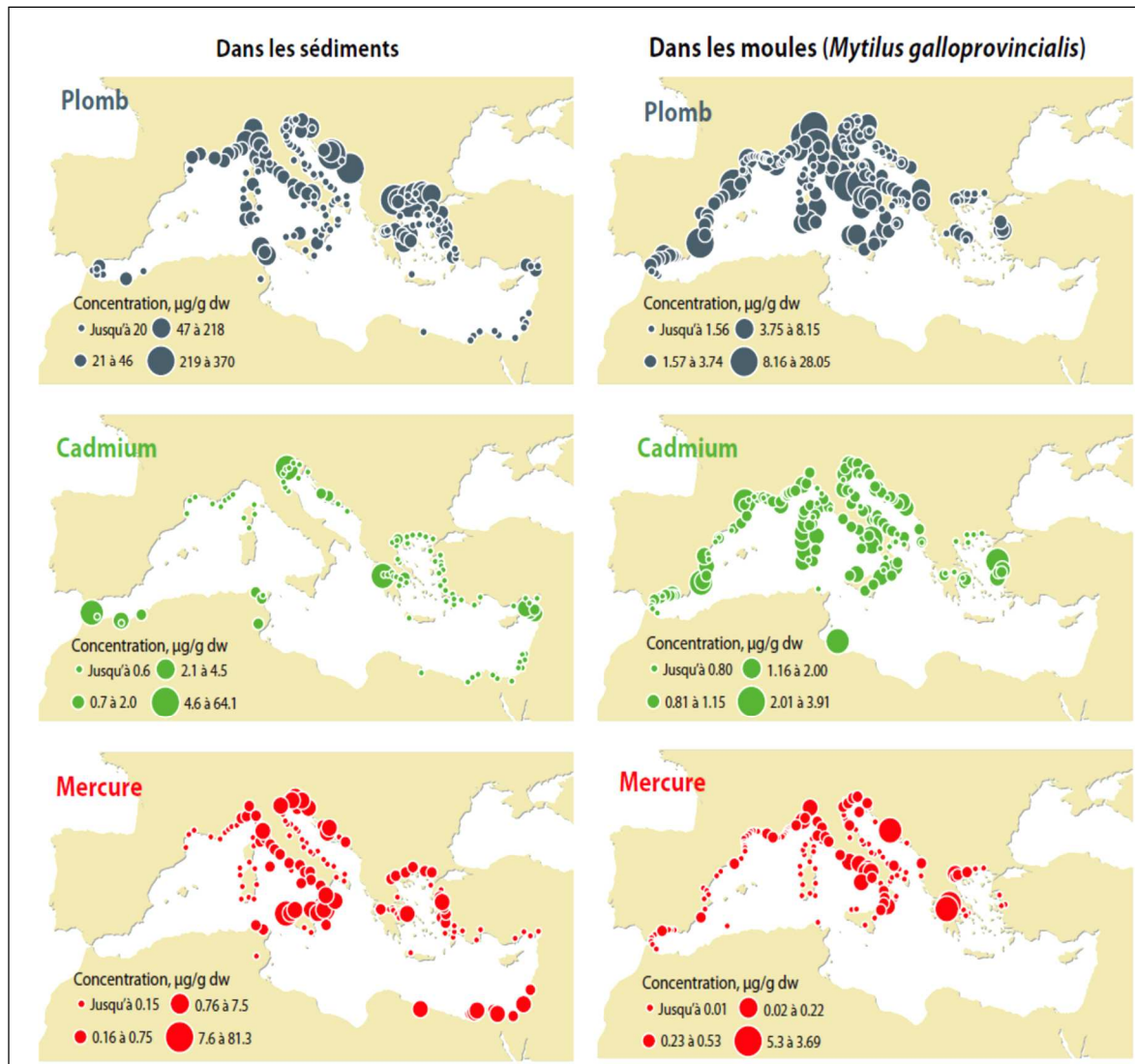


Figure 7 : Répartition des Concentrations des métaux traces (Pb, Cd et Hg) au niveau du sédiment et des tissus de la moule *Mytilus galloprovincialis* sur les côtes méditerranéennes.

Les effets des métaux lourds sur le milieu marin sont considérés comme un grave problème de pollution : En effet, la présence ou l'excès des métaux traces provoque une altération des mécanismes biologiques et peuvent provoquer un effet sur le mécanisme respiratoire et le système nerveux des organismes marins, induire la formation indirecte des radicaux libres (Sensi et Jeng 2004), inhibe l'activité enzymatique de certaines enzymes antioxydants telles que la glutathion réductase et peroxydase (Splittgerber et Tappel 1979).

2.2.2. Les pesticides et les détergents

Les pesticides sont largement employés pour la destruction plus ou moins sélective d'insectes, de champignons, de mauvaises herbes, de micro-organismes ou d'autres agents vecteurs de maladies chez les végétaux. Ils parviennent dans le milieu marin par ruissellement

à partir des parcelles agricoles, par retombées atmosphériques après épandages ou pulvérisations, ou par rejets d'eaux résiduelles d'usines. Les pesticides sont extrêmement toxiques pour les invertébrés aquatiques, en particulier pour les formes larvaires et juvéniles.

Parmi ces herbicides, le diuron et l'isoproturon ont été classés par la 'Directive Cadre sur l'Eau' 2000/60/CE (DCE) comme des substances à étudier de manière prioritaire, car ce sont des carcinogènes, et des perturbateurs endocriniens. Les pesticides organochlorés (OC), tels que le dithiothréitol (DDT), le lindane et la dieldrine, sont classés comme des Polluants Organiques Persistants (POP), du fait de leurs caractères toxique, bioaccumulable, mutagène et tératogène. Le DDT est aujourd'hui interdit à la vente. Cependant, il est toujours détecté par le réseau de surveillance ROCCH dans la chair des huîtres. Les pesticides organophosphorés et les carbamates, ont un effet neurotoxique chez les organismes et agissent en inhibant les activités enzymatiques de l'acétylcholinestérase (AChE) et des carboxylestérases (Cs) (Cooreman et al., 1993).

Les effets sublétaux de ces molécules sont innombrables. Chez les poissons de nombreux effets sur le comportement natatoire, d'évitement, d'apprentissage, de recherche du préférendum thermique, nutritionnel, etc. ont été décrits. Les effets sur la respiration semblent être l'un des premiers symptômes d'intoxication des poissons par les pesticides. Il en résulte en général une augmentation de l'activité respiratoire suivie en phase terminale d'une baisse marquée. Au niveau de la reproduction, des anomalies dans la croissance des gonades ont été observées associées à des modifications hormonales de la synthèse des stéroïdes, ainsi que des perturbations de fécondité des femelles, de la fécondation, du développement embryonnaire et l'apparition d'anomalies ou de mortalités chez les embryons, les larves ou les jeunes (Theodorakis et al., 2000).

2.2.3. Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont des composés chimiques dont la structure des molécules comprend au moins deux anneaux aromatiques fusionnés, chacun composé de cinq ou six atomes de carbone. Les deux origines majeures sont : 1) la source pyrolytique *via* la combustion incomplète de la matière organique à haute température (par les éruptions volcaniques, la combustion du carburant automobile, du charbon ou du bois, entre autres), aboutissant à leur émission dans l'atmosphère, et 2) la source pétrogénique due aux déversements naturels ou d'origine anthropique de pétrole dans le milieu naturel. Certains

HAPs tels que le naphthalène, l'anthracène et le fluoranthène font partie de la liste des polluants prioritaires de l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (US EPA) et ont été classés par la Directive Cadre sur Eau (DCE) comme des substances dangereuses prioritaires du fait de leur caractère toxique aigu ou chronique, ou bien de leur effet mutagène (génotoxique) chez les vertébrés et les invertébrés. En effet, plusieurs travaux sur des bivalves marins dans le milieu naturel ont montré qu'il existe des corrélations entre la teneur en HAPs et différentes activités enzymatiques telles que les enzymes liées au cytochrome P450, la NADPH-P450 réductase, la SOD, et la CAT (Porte et al., 1991 ; Sole et al., 1994 ; Fisher et al., 2003).

2.2.4. Les polychlorobiphényles (PCBs)

Les PCBs représentent une large famille de 209 composés organochlorés de haut poids moléculaire. Ces composés sont extrêmement stables chimiquement, ininflammables, et très peu solubles dans l'eau. Ils sont largement utilisés pour leurs propriétés isolantes comme diélectriques dans les transformateurs et les condensateurs, comme lubrifiants dans les turbines et pompes, ou comme fluide isolant, entre autres.

Les PCBs et notamment les PCBs 47, 153 et 77 ont des effets sur différents paramètres hématocytaires chez les bivalves marins (Canesi et al., 2003). De plus, des corrélations ont été établies sur le terrain entre la présence de PCBs et la densité des hémocytes, le lysozyme, l'activité bactéricide, l'activité β -glucuronidase, la déstabilisation de la membrane des lysosomes et le contenu en GPx chez différents bivalves marins (Sole et al., 1994 ; Fisher et al., 2000 ; Lowe et Fossato 2000 ; Oliver et al., 2001 ; Oliver et al., 2003).

2.2.5. Les alkylphénols-polyéthoxylés

Les alkylphénols et alkylphénols-polyéthoxylés sont des tensio-actifs organiques non ioniques, molécules amphiphiles comportant au moins un groupement polaire hydrophile (assurant la solubilité dans l'eau) et une chaîne carbonée apolaire (lipophile). L'une des principales sources d'alkylphénols est la biodégradation des alkylphénols-éthoxylés (APEO). Les APEO sont formés par réaction d'une molécule d'alkylphénol avec une ou plusieurs molécules d'oxyde d'éthylène en présence d'un catalyseur (hydroxyde de potassium) et sont commercialisés essentiellement en tant qu'adjuvants de formulations de pesticides, détergents

dans l'industrie textile, pour les traitements de surface, comme additif de désencrage dans l'industrie papetière, et comme émulsifiant.

La toxicité des alkylphénols et alkylphénols-polyéthoxylés dépend essentiellement de la structure chimique de ces molécules. En effet, le caractère hydrophobe (Saarikoski et Viluksela, 1982) et électrophile (Cronin et al., 2001) de ces composés sont les paramètres responsables de leur toxicité. Les alkylphénols sont répertoriés parmi les perturbateurs endocriniens (Colborn et al., 1993). En effet, ils peuvent avoir des effets oestrogéniques sur les organismes en se liant directement avec le récepteur aux oestrogènes et en mimant le mécanisme d'action du 17- oestradiol (White et al., 1994).

Chez les organismes aquatiques, O'halloran et al. (1999) ont montré que des expositions prolongées au nonylphénol réduisaient la diversité zooplanctonique. De plus, des perturbations endocrines (réduction de la fertilité/augmentation de la fertilité, augmentation de l'incidence des cas d'hermaphrodisme, perturbations du métabolisme stéroïdien) ont été observées chez différentes espèces de crustacés (*Daphnia magna*, *Corophium volutator*, *Elminius modestus*, *Balanus amphitrite*) et de mollusques (*Crassostrea giga*) suite à des expositions au nonylphénol à des concentrations allant de 0,1 à 100 µg.l⁻¹ (Forget et al., 2003 ; Vazquez et al., 2005). Des expositions à de fortes concentrations en nonylphénol (44 µg.l⁻¹) ont par ailleurs montré le caractère embryotoxique de ce composé chez les daphnies (LeBlanc et al., 2000). Des phénomènes d'inter-sexe ont également été rapportés chez les Medaka japonais suite à des expositions chroniques au nonylphénol (Gray et Metcalfe, 1997). Enfin, des effets mutagènes du nonylphénol ont été décrits chez des crustacés par Atiezar et al. (2002) pour des concentrations de 0,1 à 10 µg.l⁻¹.

2.2.6. Les composés pharmaceutiques

Les principales voies d'entrée des substances pharmaceutiques destinées à l'utilisation humaine, dans l'environnement, proviennent des usages personnels, à domicile ou de l'hôpital, mais également dans un degré moindre de l'élimination des composés périmés. Les produits ingérés sont excrétés dans les urines et les matières fécales sous forme de composés parents, de métabolites, sous forme libre ou conjuguée et sont traités au niveau des stations d'épuration où ils sont partiellement ou entièrement dégradés.

Par ailleurs, les données concernant l'écotoxicité des substances pharmaceutiques sont limitées jusqu'à ce jour. Des études sont toutefois disponibles pour quelques composés sur un nombre réduit d'espèces. Ainsi, des valeurs de DL 50 de la carbamazépine sont disponibles pour différentes espèces. Selon Ferrari et al. (2003), des DL 50 de 77,7 mg.l⁻¹ et > 13,8 mg.l⁻¹ ont été mesurées respectivement chez *Ceriodaphnia dubia* et chez *Daphnia magna*. De plus, Oetken et al. (2002) ont démontré la toxicité à long terme de la carbamazépine chez *Chironomus riparius* selon un mode d'action dose dépendant. Plusieurs études ont par ailleurs mentionné le potentiel de perturbateur endocrinien du 17 α -éthynyloestradiol. Ainsi, Halbeck et al. (2004) ont montré une féminisation de *Gasterosteus aculeatus* suite à des expositions au 17 α -éthynyloestradiol. Par ailleurs, Jobling et al. (2004) ont montré que des expositions à des faibles concentrations de 17 α -éthynyloestradiol induisaient une augmentation de la production d'embryons chez des mollusques (*Potamopyrgu antipodarum*) alors que des expositions à fortes doses l'inhibaient.

B. La surveillance biologique et chimique dans le milieu marin

I. Les programmes de surveillance en Méditerranée Nord Occidentale

1. Evolution du cadre réglementaire de la surveillance

Construite depuis une quarantaine d'années sur la base des conventions internationales pour la protection de l'environnement des substances dangereuses, la surveillance biologique et chimique des côtes européennes de la Méditerranée a évolué au début des années 2000 vers une directive cadre sur l'eau (DCE) puis une directive cadre sur le milieu marin (DCSMM). La Convention OSPAR est l'instrument légal actuel qui guide la coopération internationale pour la protection de l'environnement marin de l'Atlantique du Nord-Est depuis 1992. La convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution a été adoptée à Barcelone en 1976 et modifiée en 1995. Au fil du temps, son mandat s'est élargi pour inclure la planification et la gestion intégrée de la zone côtière. Les conventions européennes d'Oslo et Paris pour l'Atlantique Nord-Est (OSPAR) et Barcelone pour la Méditerranée constituent un des fondements majeurs de la surveillance biologique et chimique qui est mise en place aujourd'hui dans les directives européennes (DCE et DCSMM) et dans le bassin méditerranéen en général. Elles sont notamment à l'origine de l'approche intégrée chimie et biologie aujourd'hui préconisée dans le programme de surveillance MEDPOL qui a été créé en 1975 et qui est la composante environnementale du plan d'action coordonné par l'UNEP (United Nations Environment Program) en Méditerranée.

Les interconnexions entre les conventions OSPAR et Barcelone sont préconisées par les conventions elles-mêmes mais aussi et surtout par la France et l'Espagne, deux pays possédant des façades maritimes sur l'Atlantique et la Méditerranée. L'organisation des programmes de surveillance devrait l'avenir tendre très progressivement vers une harmonisation. Les stratégies d'échantillonnage, le choix d'espèces modèles, les exigences de qualité de mesure et la validation des résultats devraient progressivement être similaires. Ces choix auront des répercussions directes sur le programme MEDPOL de surveillance international en Méditerranée.

2. Directive cadre sur l'eau (DCE)

En 2000 l'Europe a adopté une directive-cadre sur l'eau (DCE). L'objectif général est d'atteindre d'ici 2015 le bon état écologique des eaux de surface et un bon état chimiques des

eaux souterraines. Le « bon état » correspond à des milieux dont les peuplements vivants sont diversifiés et équilibrés. Il se rapporte aussi à une qualité des milieux aquatiques permettant la plus large panoplie d'usages : eau potable, irrigation, usages économiques, pêche... (Comité de bassin Loire Bretagne, 2004). Ce bon état est défini comme un écart "léger" à une situation de référence, correspondant à des milieux non ou très peu impactés par l'homme. Lorsque les caractéristiques morphologiques ont été irréversiblement bouleversées par les aménagements (les masses d'eau dites "profondément modifiées"), on recherche alors "un bon potentiel" (Roche et al., 2005).

Pour les eaux superficielles (cours d'eau, lacs, littoraux et plans d'eau), le « bon état » consiste à la fois en un « **bon état chimique** » de l'eau ; l'état chimique est l'appréciation de la qualité d'une eau sur la base des concentrations en polluants incluant notamment les substances prioritaires. L'état chimique comporte deux classes : bon et mauvais. Le bon état chimique d'une eau de surface est atteint lorsque les concentrations en polluants ne dépassent pas les normes de qualité environnementale. Un « **bon état écologique** » apprécié selon des critères biologiques notamment. L'état écologique est l'appréciation de la structure et du fonctionnement des écosystèmes aquatiques associés aux eaux de surface. Il s'appuie sur ces critères appelés éléments de qualité qui peuvent être de nature biologique (présence d'êtres vivants végétaux et animaux), hydromorphologique ou physico-chimique.

L'état écologique comporte cinq classes : très bon, bon, moyen, médiocre et mauvais. Pour chaque type de masse de d'eau il se caractérise par un écart aux conditions de références qui sont les conditions représentatives d'une eau de surface pas ou très peu influencée par l'activité humaine. Les conditions de références peuvent être concrètement établies au moyen d'un réseau de référence constitué d'un ensemble de sites de référence. Si pour certains types de masses d'eau il n'est pas possible de trouver des sites répondant aux critères ci-dessus, les valeurs de référence pourront être déterminées par modélisation ou avis d'expert. Le très bon état écologique est défini par de très faibles écarts dus à l'activité humaine par rapport aux conditions de référence du type de masse d'eau considéré. La notion d'écart de la contamination chimique ou de la qualité biologique comparée à une situation de référence est essentielle pour la mise en œuvre de la DCE. La détermination de normes de « qualité environnementale » pour caractériser une situation de référence doit ainsi s'appuyer sur des « niveaux seuils » qui sont définis pour chaque contaminant chimique dans les matrices eau, sédiment et biote. La détermination des seuils constitue aujourd'hui un enjeu scientifique.

3. La directive-cadre « stratégie pour le milieu marin » (DCSMM)

L'objectif de cette directive est de prendre toutes les mesures nécessaires pour réaliser ou maintenir un bon état écologique du milieu marin au plus tard en 2020, en appliquant à la gestion des activités humaines une approche fondée notamment sur la notion d'écosystème. Il s'agit également de prévenir le déclin de la biodiversité.

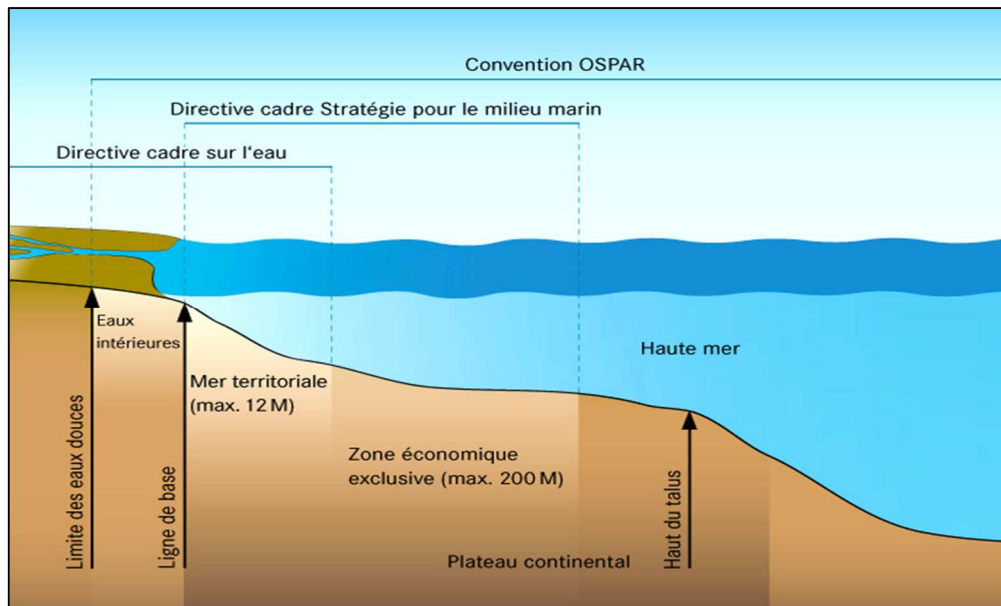


Figure 8 : Zones juridictionnelles de la Convention des Nations Unies sur le droit de la mer, de la Convention OSPAR, de la Directive cadre sur l'eau (DCE) de l'UE et de la Directive cadre Stratégie pour le milieu marin (DCSMM) de l'UE. Les droits juridictionnels des états côtiers sur le plateau continental portent sur les fonds et le sous-sol marins et peuvent s'étendre au-delà de 200 milles marins (M) de la ligne de base (OSPAR 2010).

En France, la directive s'applique aux eaux marines métropolitaines, depuis les lignes de base jusqu'à la limite des eaux sous juridiction (200 milles marins), y compris le sol et le sous-sol. Il apparaît clairement une zone de recouvrement entre DCE et DCSMM dans la zone de ma mer territoriale des 12 miles. Ce recouvrement nécessitera une harmonisation des paramètres de surveillance (Figure 8).

L'objectif majeur de la DCE et DCSMM est la protection générale de l'environnement aquatique dans son intégralité suivant une approche écosystémique. Cette nouvelle approche met l'accent sur la nécessité d'une évaluation intégrée des risques pour l'environnement. Pour la surveillance biologique et chimique, cette approche s'appuie sur l'intégration de mesures d'effets biologiques et la quantification des contaminants chimiques.

Cet objectif pose ainsi le cadre général de ce sujet de thèse, pour l'intégration des biomarqueurs chez la moule dans un programme de surveillance et pour l'enjeu de détermination des seuils de qualité ou niveau de base pour chaque biomarqueur chez la moule et dans un habitat spécifique.

La stratégie de surveillance OSPAR coordonnée suivant le programme de surveillance intitulé « CEMP : Coordinated Environmental Monitoring Program », se base sur l'évaluation des concentrations des contaminants dans le sédiment et le biota, et sur leurs effets biologiques. Le programme inclut un engagement qui consiste à suivre les recommandations et les procédures d'assurance qualité établies par la commission OSPAR. Le but est de garantir une qualité des données de surveillance analogues sur toute la région OSPAR. Ceci a mené progressivement le CEMP à développer un manuel de surveillance qui rassemble tous les aspects techniques de la surveillance et en particulier, le choix, la conservation et l'analyse des échantillons. Pour que le suivi d'un contaminant ou d'un biomarqueur soit intégré dans le CEMP, il doit répondre à différents critères 1) une méthode d'analyse standard, 2) une démarche d'assurance qualité et 3) un seuil ou niveau de base défini. Ces trois critères garantissent la validité de l'analyse et une interprétation standardisée des données de surveillance.

4. Le Plan d'Action pour la Méditerranée et le programme MEDPOL

Le plan d'action pour la méditerranée (PAM) a été mis en place par le programme des nations unies pour l'environnement (PNUE) en 1975. Le PAM avait pour objectifs majeurs d'aider les gouvernements à évaluer et maîtriser la pollution marine et à formuler des politiques nationales en matière d'environnement. Pour lutter contre la pollution d'origine terrestre le PAM par le biais du MEDPOL la composante d'évaluation et de maîtrise de la pollution marine a élaboré un protocole extrêmement important 'le Protocole tellurique'.

Ce programme est responsable de suivi des travaux liés à la mise en œuvre d'un protocole relatif à la protection de la mer Méditerranée contre la pollution d'origine anthropique. Ainsi le MEDPOL aide les pays méditerranéens à formuler et mettre en œuvre des programmes de surveillance continue de la pollution, y compris des mesures de maîtrise de la pollution, et à élaborer des plans d'action visant à éliminer la pollution d'origine tellurique.

II. Concept d'une approche intégrée chimie-biologie en écotoxicologie

1. L'approche chimique : détection et quantification des polluants

L'évaluation de la qualité du milieu aquatique qu'il soit marin ou dulçaquicole repose depuis une quarantaine d'année sur double approche chimique et biologique. Les analyses chimiques effectuées dans divers compartiments (colonne d'eau, sédiments) ne peuvent à elles seules décrire l'état de santé d'un écosystème. En effet, l'analyse chimique est spécifique à un contaminant et ne peut pas prendre en compte la complexité d'un mélange de contaminants. Elle ne permet pas non plus de déterminer si ces contaminants ont un effet toxique sur les organismes vivants, ni les conséquences adverses du polluant pour l'écosystème aquatique. C'est pourquoi l'évaluation et le suivi de la qualité du milieu aquatique s'appuient sur des analyses du biote. Ainsi des compléments des analyses chimiques des indicateurs biologiques ont été développés et ce à divers niveau d'organisation biologique.

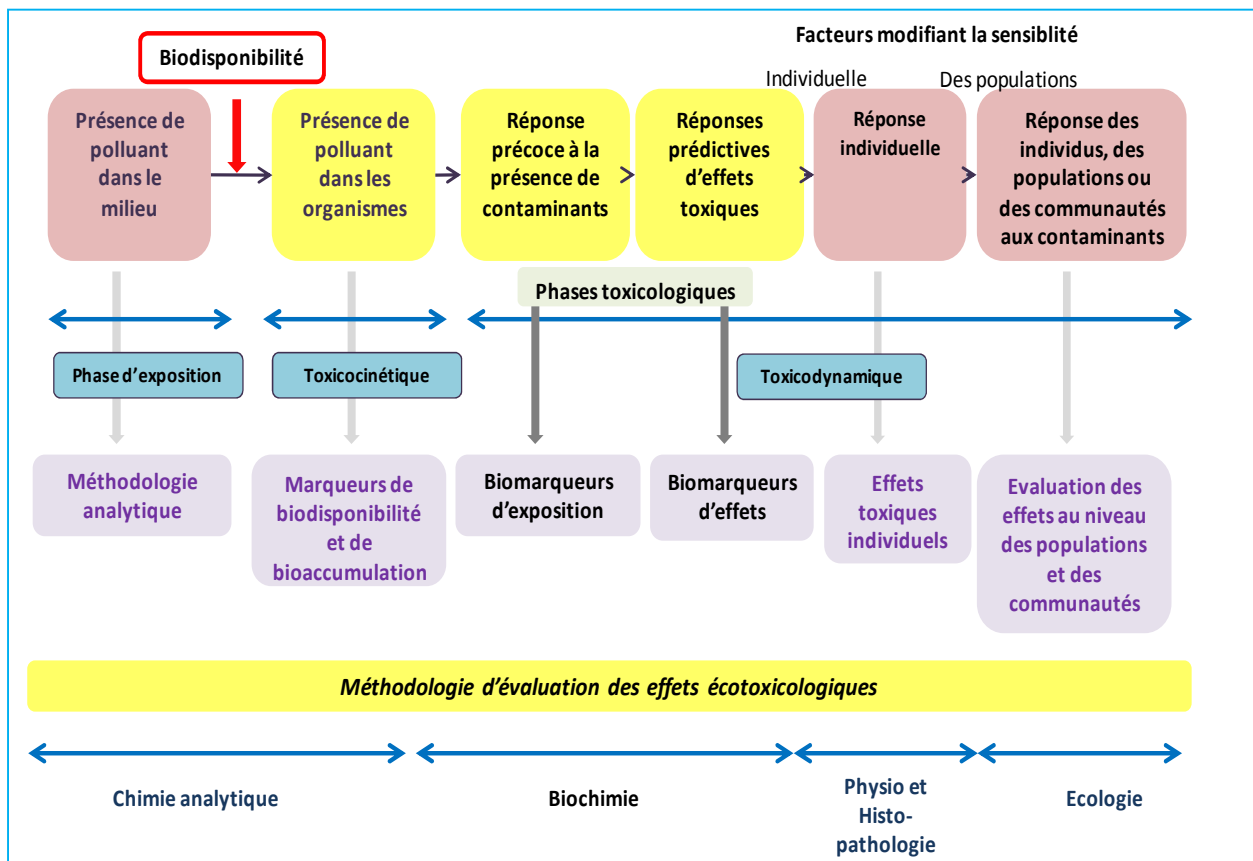


Figure 9 : Représentation schématique des différents types de paramètres mesurables à différents niveaux d'organisation biologique permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques (Lagadic et Amiard, 1997).

La biodisponibilité et les effets toxicologiques et écotoxicologiques de certains contaminants varie selon leur forme chimique, l'existence d'interactions entre contaminants ou entre les contaminants et les autres éléments, abiotiques et/ou biotiques du milieu, ou bien en fonction de l'organisme considéré, de son stade de développement ou de son état physiologique (Figure 9).

2. L'approche biologique : développement méthodologique

L'approche biologique est basée sur l'étude de la réponse biologique des organismes aux polluants, cette méthode répond aux lacunes de l'approche chimique. Elle repose sur la mesure de paramètres biochimiques, physiologiques, moléculaires, cellulaires et comportementales qui se trouvent altérés par l'action des contaminants (Peakall, 1994 ; Rodríguez-Ariza et al., 1992).

Les biomarqueurs ont fait leur apparition en écotoxicologie au cours des années quatre-vingt (Lagadic et al., 1997). Définis comme étant un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant cette définition de Lagadic et al. (1997) est l'une des définitions les plus communément acceptées. Les concepts et paradigmes de recherche des biomarqueurs ont évolués depuis les années 90 (Huggette et al., 1992 ; Timbrell et al., 1994) pour aboutir à un questionnement scientifique intégrant la réponse biologique du gène à la physiologie, en s'appuyant sur des études à partir de l'individu jusqu'aux populations (Van der Oost et al., 2003) (Figure 10).

Actuellement, les méthodes de biosurveillance faisant appel au suivi de la réponse biologique des organismes soumis dans leur environnement à différents degrés de pollution sont en plein essor. Cette évaluation repose sur deux concepts complémentaires, à savoir les bioindicateurs et les biomarqueurs. L'utilisation des biomarqueurs repose sur la connaissance des mécanismes physiologiques et biochimiques qui précèdent les modifications visibles au niveau des organismes et des populations. De ce fait, l'utilisation d'une approche multiparamétrique combinant une batterie de biomarqueurs avec des contaminants chimiques constitue la base d'une approche pertinente permettant l'évaluation de l'état de santé d'un écosystème.

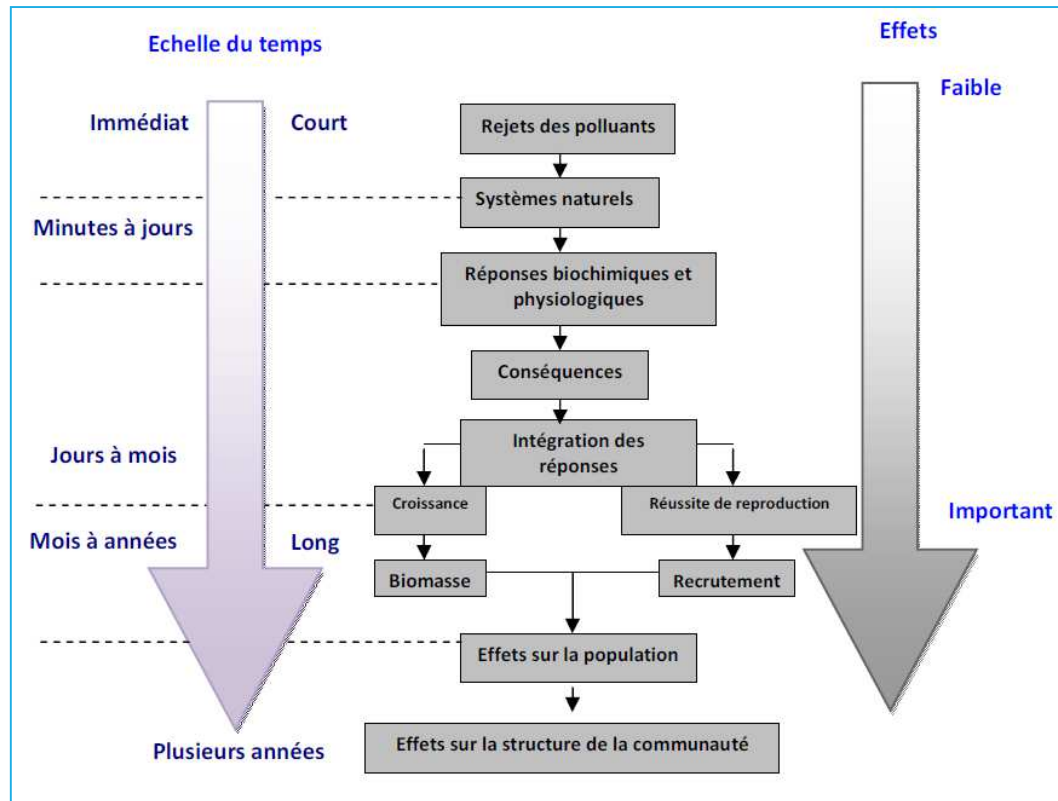


Figure 10 : Représentation de l'ordre chronologique des différentes atteintes induites au sein de l'organisation des systèmes biologiques. (Von Der Oost et al., 2003).

L'étude de biomarqueurs précoces apporte l'avantage d'une évaluation intégrée dans le temps et dans l'espace des polluants biodisponibles. Combinés à des marqueurs physiologiques comme la performance de reproduction, la croissance et le comportement, les biomarqueurs apportent des informations utiles à l'évaluation des effets des contaminants à différents niveaux d'organisation biologiques. Une bonne évaluation de l'impact écotoxicologique des contaminants nécessite souvent une approche multifactorielle c'est-à-dire utilisant plusieurs types de marqueurs biologiques (Minier et al., 2000 ; Roméo et al., 2003). Au niveau biochimique, il existe différents types de biomarqueurs regroupés selon leur fonction au niveau cellulaire. Les principaux biomarqueurs utilisés sont des marqueurs enzymatiques comme la catalase, la glutathion peroxydase, la glutathion- S transférase, et l'acétylcholinestérase (Durou et al., 2007). Les enzymes du système de détoxification sont aussi beaucoup étudiées puisque leurs activités sont susceptibles d'être fortement modifiées après une exposition. Ces enzymes sont généralement divisées en trois groupes, les monooxygénases à cytochrome P450, les glutathion-S-transférases et les carboxylestérases et constituent une voie de recherche importante. Certaines protéines comme les métallothionéines, qui ont la propriété d'être induites par les métaux lourds et d'autres

facteurs de stress sont aussi largement retenues comme indice de contamination métallique (Damiens et al., 2006).

3. Les biomarqueurs : utilisation et application dans les programmes de biosurveillance

3.1. Application dans les programmes de biosurveillance

L'utilisation des biomarqueurs pour l'évaluation de l'état de l'environnement par le programme MEDPOL, a débuté par un renforcement des capacités techniques des laboratoires notamment ceux de la rive sud de la méditerranée (MAP, 1993). Une formation individuelle a été organisée pour quatre techniques recommandées par un groupe d'experts : stabilité de la membrane lysosomale, les altérations de l'ADN, la teneur en métallothionéines et l'activité EROD. Des exercices d'inter comparaison entre les différents laboratoires participants autour de la méditerranée pour la stabilité de la membrane lysosomale, la teneur en métallothionéines et l'activité EROD ont donné de bons résultats (Viarengo et al., 2000). Les organismes indicateurs utilisés étaient le loup de mer *Dicentrarchus labrax* et la moule *Mytilus galloprovincialis*.

L'évaluation des effets biologiques des contaminants est un élément clé dans le programme JAMP « Joint Assessment and Monitoring Program » (OSPAR / ICES 1995) et qui a été identifié comme un sujet d'intérêt commun pour plusieurs organisations européennes, y compris le Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM), l'Agence européenne pour l'environnement, la convention Helsinki, le programme de l'évaluation et la surveillance de l'Arctique, et le Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE-MED). L'utilisation des biomarqueurs au sein JAMP illustre un aspect important qui a restreint l'application des biomarqueurs comme un outil de biosurveillance dans d'autres programmes internationaux ; c'est la nécessité d'un programme d'assurance qualité afin d'assurer la comparaison des données (Stagg 1998). Plusieurs programmes ont été lancés pour développer une application standard des biomarqueurs et procéder à des comparaisons inter-laboratoires en réponse à ce déficit. Par exemple, l'Assurance de la qualité dans les programmes de surveillance (BEQUALM), un Projet financé par l'UE, a été mis en place pour développer l'assurance qualité et des procédures de contrôle pour les mesures concernant les effets biologiques chez les organismes marins. Chez les mollusques, les biomarqueurs recommandés dans le cadre OSPAR et le CIEM sont répertoriés.

Il est clair que l'utilisation de biomarqueurs est en pleine expansion. Toutefois, ce progrès est lent, et de nombreuses préoccupations sont encore limitant ou interdisant les biomarqueurs d'être incorporé dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental. Ce progrès est principalement limité par le choix des biomarqueurs les plus pratiques, importants et pertinents.

3.2. Avantages et limites de l'utilisation des biomarqueurs

Les biomarqueurs sont des outils mis en œuvre pour établir un diagnostic de risque environnemental. Ils constituent un signal précoce de l'effet de la contamination sur les organismes. Leurs usages et leur intérêt dans la détermination du risque environnemental sont devenus incontournables surtout depuis que la directive cadre européenne sur l'eau a imposé la surveillance de l'état écologique des cours d'eau. Toutefois le manque de connaissance sur les mécanismes physiologiques et fonctionnels et le comportement de certains organismes aquatiques sentinelles utilisés limitent fortement l'utilisation optimale de ces outils.

L'utilisation des biomarqueurs peut s'avérer très pertinente dans certaines conditions, mais pas dans d'autres induisant ainsi à un diagnostic erroné. Un biomarqueur unique ne permet pas de rendre compte de l'ensemble des contaminants présents dans les écosystèmes et susceptible de perturber l'état de santé des organismes qui y vivent. Afin de prendre en compte la grande diversité des contaminants et la multiplicité de leurs effets, il est apparu nécessaire de recourir à une approche multi-biomarqueurs basée sur la mesure de plusieurs biomarqueurs complémentaires (Blaise et al., 2002 ; Galloway et al., 2004).

Les biomarqueurs sont plus particulièrement conçus pour l'évaluation d'un risque écotoxicologique, ils visent à rechercher la signature biologique de l'impact ou de la présence d'un contaminant dans une structure vivante. Le biomarqueur parfait et universel n'existe pas. Un biomarqueur peut s'avérer très pertinent dans certaines conditions, mais ne pas répondre dans d'autres, voire induire un diagnostic erroné. Ces conditions varient en fonction de plusieurs paramètres, qu'il est inconcevable de présumer de la pertinence d'un biomarqueur dans toutes les situations possibles, parfaitement claires et définies.

Les mélanges de substances et les contaminations multiples impliquent de potentiels synergies et antagonismes, ce qui complexifie déjà grandement la compréhension des faits.

Néanmoins, de nombreux autres facteurs sont susceptibles d'influencer la physiologie d'un organisme et donc la réponse d'un biomarqueur.

Parmi eux, il est possible de distinguer notamment des facteurs intrinsèques, tels que l'âge, le sexe, le statut reproducteur ou les caractéristiques génétiques de l'espèce sentinelle. Enfin, d'autres facteurs extrinsèques exercent une influence sur la réponse des biomarqueurs, qu'il s'agisse d'interactions biotiques (compétition intra- ou interspécifique, prédation, parasitisme...) ou encore de facteurs abiotiques tels que la température ou la salinité (Amiard et al., 1998).

Si l'influence de ces facteurs peut être en partie limitée ou, à défaut, correctement appréhendée en conditions contrôlées, l'interprétation de la réponse des biomarqueurs devient extrêmement plus délicate en milieu naturel (Amiard et al., 1998). Ainsi, les efforts soutenus de standardisation sont généralement restés vains, tant la définition de la gamme de réponses pouvant être considérée comme « normale » pour un organisme s'avère difficile, voire impossible à établir (Brown et al., 2004).

C. Les biomarqueurs choisis pour l'étude de la lagune de Bizerte

1. L'acétylcholinestérase : un biomarqueur de neurotoxicité

L'acétylcholinestérase (AChE : EC 3.1.1.7) est une enzyme impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux à travers l'organisme. En effet, au niveau des jonctions neuromusculaires et inter neuronales, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, permettant ainsi la transmission de l'influx nerveux.

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 tels que les métaux lourds provoque une transmission permanente de l'influx nerveux, laquelle conduit généralement à la tétanie musculaire suivie par la mort de l'organisme (Matozzo et al., 2005).

L'analyse de l'activité acétylcholinestérase dans les organismes marins a été montrée comme une méthode très adaptée pour évaluer l'exposition des milieux aquatiques aux

contaminants neurotoxiques. En général, ces méthodes développées sont sensibles et permettent de détecter l'effet neurotoxique des contaminants présents dans les eaux. La mesure de l'activité AChE, est une méthode applicable à un large éventail d'espèces qui permet de détecter et de quantifier l'exposition à des substances neurotoxiques, sans identifier le contaminant présent.

Connu comme un indicateur d'effet neurotoxique, l'activité de l'AChE est utilisée dans les travaux d'écotoxicologie comme un biomarqueur spécifique d'exposition aux pesticides de type organophosphorés (OP) et carbamates (Cs) (Bocquené and Galgani, 1998 ; Printes and Callaghan, 2004 ; Hogue et al., 2007). En outre, il a été démontré que l'activité enzymatique de l'AChE peut être inhibée en présence des métaux lourds, des détergents et des hydrocarbures dans l'environnement marin (Zinkl et al., 1991 ; Payne et al., 1996 ; Guilhermino et al., 1998 ; Brown et al., 2004).

L'exposition aux organophosphorés et aux carbamates, provoque l'inhibition de l'AChE qui se traduit par une accumulation de l'acétylcholine dans la fente synaptique provoquant ainsi une transmission permanente de l'influx nerveux conduisant à une tétanie musculaire suivie par la mort de l'animal (Bocquené et al., 1997). D'autant plus, des travaux ont montré que l'induction des effets inhibiteurs de l'activité AChE peuvent se manifester même après exposition à de très faibles concentrations d'insecticides (0.1 à $1 \mu\text{g.l}^{-1}$) (Habig et al., 1986).

2. Les biomarqueurs de stress oxydatif

Plusieurs contaminants chimiques, ou leurs métabolites, exercent leur toxicité en générant la production des espèces réactive de l'oxygène (ERA) (Figure 11). Le système antioxydant intervenant dans la protection cellulaire contre ce stress oxydatif induit lors de pollution, plusieurs enzymes antioxydants ont été utilisées en tant que biomarqueur précoce comme la Catalase, la Superoxyde dismutase (SOD) ou la Glutathion peroxidase (GPx) (Stegeman et al., 1992 ; Filho, 1996). De plus, plusieurs effets biochimiques ont été associés à l'augmentation de flux des ERA qui ont mené au développement de biomarqueurs d'effet oxydatifs comme la peroxydation lipidique (Stegeman et al., 1992 ; Hageman et al., 1992), la capacité oxydante totale (TOSC) (Winston et al., 1998 ; Regoli et al., 2000) ou l'oxydation de l'ADN (Chipman et al., 1998). Dans ce travail, on va étudier la variation de la catalase et de la peroxydation lipidique comme biomarqueurs de stress oxydatif.

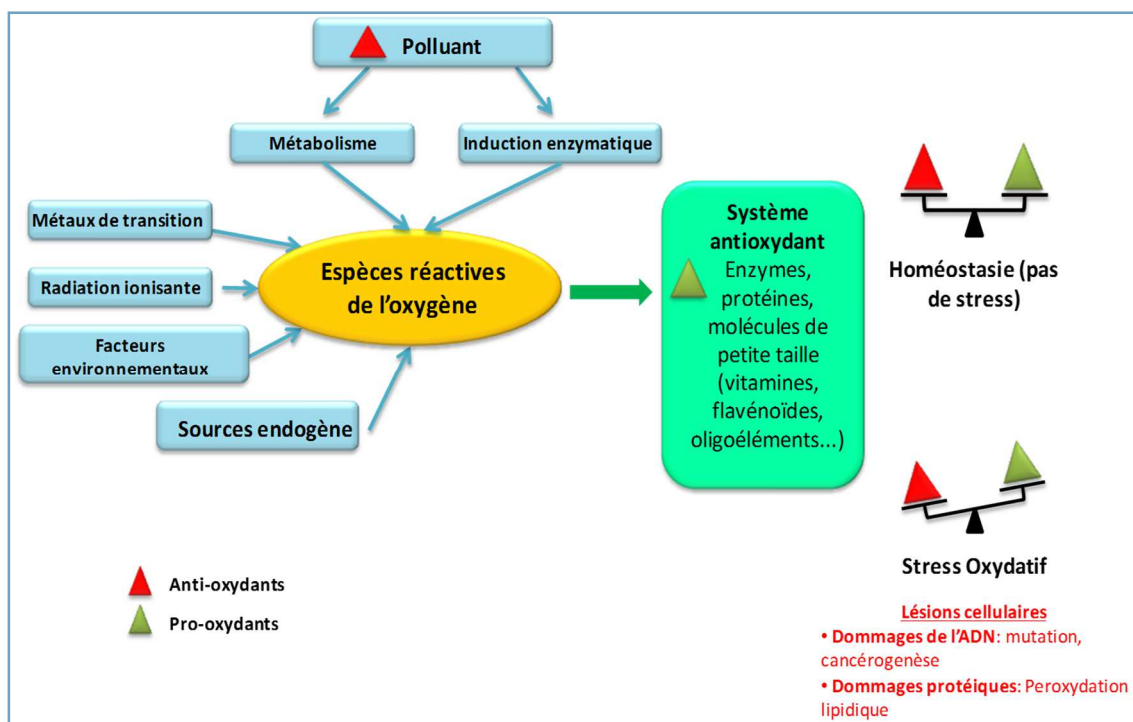
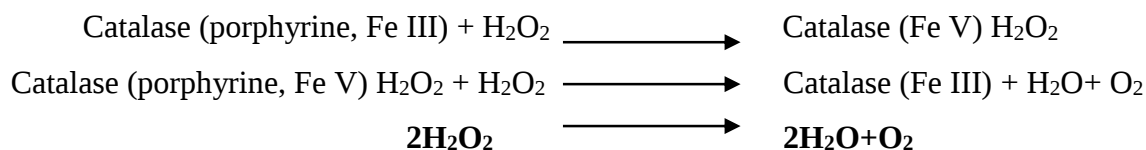


Figure 11 : Sources entraînant une augmentation des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule et les dommages cellulaires associés et intervention du système antioxydant.

1.1. La catalase

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 ; Stegeman et al., 1992). 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 H_2O_2 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). La réaction catalysée par la catalase se déroule en deux étapes :



L'activité catalase est largement étudiée chez plusieurs espèces et différents groupes 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).

1.2. La peroxydation lipidique

Une augmentation importante de flux de molécules oxydantes peut entraîner un dépassement des capacités antioxydantes des organismes et générer des dommages au niveau des macromolécules. La mesure de certaines altérations subcellulaires constitue un biomarqueur pertinent qui reflète l'effet de l'exposition à des molécules oxydantes.

Parmi les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène au niveau des macromolécules biologiques figure la peroxydation des acides gras polyinsaturés (lipoperoxydation). La dégradation des lipides se produit principalement au niveau des phospholipides membranaires car leurs chaînes d'acides gras constituent la cible des attaques radicalaires. Les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction appelée peroxydation lipidique, forme une réaction en chaîne car le radical peroxy formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué.

La peroxydation lipidique consiste en trois réactions de type radicalaires : initiation, propagation et terminaison (Figure 12) :

∅ *Etape d'initiation* : se manifeste par le captage d'un atome d'hydrogène au niveau d'un groupement allylique CH_2 d'un acide gras polyinsaturé par une espèce hautement réactive, en l'occurrence un radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), alkoxy ($\text{RO}\bullet$) ou peroxy ($\text{ROO}\bullet$) pour donner un radical alkyle ($\text{R}\bullet$). Il s'ensuit un réarrangement moléculaire permettant l'obtention d'un diène conjugué. Ce dernier réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxy très réactif ($\text{ROO}\bullet$).

∅ *Etape de propagation* : le radical peroxy instable favorise l'attaque successive des phospholipides voisins donnant naissance à un nouveau alkyle et un hydroperoxyde lipidique (ROOH).

∅ *Etape de terminaison* : le processus de peroxydation se poursuit jusqu'à ce que deux radicaux réagissent entre eux.

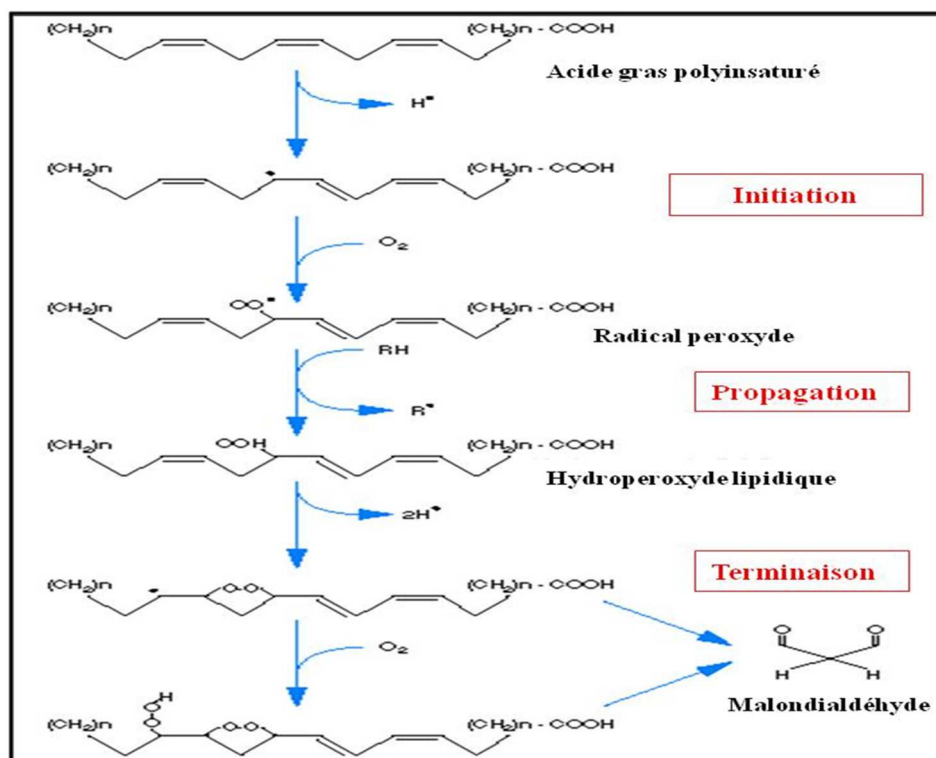


Figure 12 : Peroxydation lipidique : voie de synthèse du malondialdéhyde à partir des acides gras polyinsaturés.

Les hydroperoxydes ainsi formés vont se décomposer par clivage de leur chaîne carbonée en un mélange complexe de molécules comprenant des alcanes (pentane et éthane...) et des aldéhydes (malondialdéhyde (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal, dienal) (Dotan et al., 2004 ; Lackner, 1998). Ainsi le MDA forme une expression de la lipoperoxydation (Pompella et al., 1987 ; Sunderman et al., 1987), cette dernière est le résultat de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène générées dans certaines conditions de stress, en particulier avec des contaminants organiques (HAPs, PCBs, pesticides) et inorganiques (métaux de transition). Toutefois, la lipoperoxydation présente aussi une variation en fonction de l'espèce, de l'âge, de la saison, des conditions abiotiques et du tissu étudié (Kappus, 1987 ; Viarengo et al., 1990), de plus elle peut constituer un phénomène physiologique naturel qui intervient dans la dégradation de nombreux métabolites cellulaires (hormones, acides gras...) (Sani, 2007).

La lipopéroxydation peut être mesurée grâce au dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), tel que le MDA qui est considéré comme un biomarqueur de stress oxydatif en général, et de peroxydation lipidique en particulier.

3. Les métallothionéines : biomarqueur de stress métallique

Les métallothionéines (MT) ont été utilisées en tant que biomarqueur d'exposition à des contaminations métalliques, ces protéines sont impliquées dans la régulation des métaux se propageant dans l'organisme (Roesijadi et Robinson, 1994 ; Viarengo et al., 2000).

Elles jouent un rôle fondamental dans la régulation des éléments métalliques essentiels (Cu, Zn) et dans la détoxification des métaux lourds toxiques (Cd, Hg). Diverses études mettent en évidence leur implication dans l'augmentation de la résistance des individus à un stress métallique basée sur des mécanismes physiologiques (court terme) et génétiques (long terme) (Klerks et Levinton, 1989 ; Tanguy et Moraga, 2001 ; Knapen et al., 2004). L'induction des MT peut laisser en cela présager d'altérations potentiellement importantes à des niveaux supérieurs d'organisation. Cependant, d'autres structures moléculaires sont impliquées dans l'homéostasie métallique intracellulaire et ce n'est que lorsque les capacités de séquestration des MT sont dépassées qu'un effet toxique pour l'organisme peut apparaître (Roesijadi, 1992). L'induction des MT est donc difficile à traduire en termes d'effets toxiques et son utilisation restreinte à la bioindication (Handy et al., 2003). Il est possible que les MT soient impliquées dans des processus autres que l'homéostasie métallique. Chez les mammifères, et de manière moins évidente chez les poissons, ces protéines ont la capacité de piéger les radicaux libres tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Cajaraville et al., 2003).

4. Les biomarqueurs du mécanisme de biotransformation

4.1. La benzopyrène hydroxylase : enzyme de phase I

L'exposition de mollusques à des xénobiotiques (pesticides, métaux, détergents, hydrocarbures aromatiques polycycliques et autres toxiques), induit une activation des mécanismes de détoxification. Parmi ces mécanismes, le cytochrome P450 isoforme 1A1 est une oxydase qui permet la métabolisation de nombreux xénobiotiques (c'est la phase I de la détoxification dite, phase de fonctionnalisation).

L'activité enzymatique de la benzopyrène hydroxylase (BPH) est l'une des principales enzymes de la phase I de fonctionnalisation présente majoritairement dans l'hépatopancréas et dont le rôle est d'introduire un groupement fonctionnel au sein d'un xénobiotique généralement hydrophobe. Le métabolite obtenu devenu plus hydrophile sera directement

excrété de la cellule ou sera pris en charge par une enzyme de Phase II pour une deuxième transformation nécessaire à son élimination.

Dans le cas de l'activité benzo[a]pyrène hydroxylase () le groupement ajouté par cette enzyme sur le substrat benzo[a]pyrène est le groupement hydroxyle OH :



Parmi les substrats de la BPH, les plus connus sont les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) : ce sont des polluants très dangereux à la fois pour l'homme et pour l'environnement, puisque certains sont cancérigènes et qu'ils sont rémanents au sein des écosystèmes.

Chez les vertébrés, il a été montré que le métabolisme des hydrocarbures est supporté par les cytochromes P450. Chez les bivalves marins, l'existence d'un système enzymatique apparenté à celui des cytochromes P450 des vertébrés est avancée, dans lequel l'activité BPH pourrait être supportée par un cytochrome de type CYP 1A (Wootton, 1995). D'autres hypothèses suggèrent que l'activité BPH pourrait être associée à plusieurs complexes enzymatiques chez les invertébrés marins ce qui pourrait expliquer le fait que le système de métabolisation soit moins efficace chez les invertébrés marins que chez les mammifères ou chez les poissons (Stegeman, 1985). L'activité BPH est actuellement un des biomarqueurs utilisé pour rendre compte du degré d'exposition des organismes marins et pour l'évaluation du risque écotoxicologique dans les études de terrain. Que ce soit *in situ* ou *in vivo* plusieurs études ont montré qu'il existait une relativement bonne corrélation entre l'activité BPH mesurée chez les bivalves et la concentration en HAPs dans le milieu (Akcha et al, 2000 ; Michel et al, 1994).

4.2. La glutathion-S transférase : enzyme de phase II de biotransformation

Le glutathion est un tripeptide (glutamate, cystéine, glycine) présent en concentration assez élevée (1×10^{-10} mM) dans les cellules des animaux, des plantes et des champignons. Grâce à la fonction thiol de la cystéine, le glutathion joue un rôle important dans le maintien de l'état réduit de la cellule. Cette fonction thiol peut aussi interagir avec des molécules électrophiles et intervient dans les mécanismes de détoxification des cellules vis-à-vis de nombreux contaminants.

Plusieurs enzymes sont impliquées dans le métabolisme du glutathion, notamment la glutathion-S-transférase, et sont régulées selon les besoins de la cellule. 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).

Une grande variété de composés chimiques induit les GST, parmi lesquels certains inducteurs des cytochromes P450 tels que les HAPs et les PCBs. Ainsi des études *in situ* et expérimentales ont montré que les GST pouvaient être induites par différentes classes de contaminants. Ainsi, Damiens et al. (2004) ont montré que des expositions au malathion et au carbofuran induisaient l'expression de la GST chez des larves d'huîtres. De plus, il a été démontré que l'expression de la GST au niveau de la glande digestive et des branchies d'un mollusque bivalve est proportionnelle à la concentration en HAPs dans les tissus (Gowland et al., 2002 ; Rocher et al., 2006).

4.3.La résistance aux multixénobiotiques (MXR) : Protéine de phase III de biotransformation

La résistance multixénobiotique ou multidrogues est un phénomène qui résulte de l'activation des pompes membranaires capables d'expulser les composés organiques hors de la cellule. Chez l'homme le phénomène de résistance multi-drogues (MDR) est l'un des principaux facteurs d'échec de la chimiothérapie. Chez les populations naturelles (les bivalves), la résistance multixénobiotique incarne un système de protection contre l'action toxique d'une grande variété de xénobiotiques organiques.

Le gène MDR code pour une protéine responsable d'efflux cellulaire actif et énergie dépendant appelé glycoprotéine P (Pgp). Le gène MDR est très conservé lors de l'évolution des espèces (Homme, bactéries, parasites, mollusques, végétaux...). Chez l'homme le gène

MDR1 est transcrit en ARNm de 4.5Kb et est exprimé par une protéine transmembranaire, la glycoprotéine P qui fonctionne alternativement comme un canal de transport de chlore ou comme une pompe effluente dépendante de l'ATP, permettant ainsi la diminution de la concentration intracellulaire de certaines substances toxiques.

Tableau 3 : Les méthodes d'évaluation de l'activité des mécanismes de défense multixénobiotiques chez les bivalves (Parant et al., 2003).

Techniques	Principe
Indirectes	<u>Mesure de la fixation des substrats</u> : consiste à mesurer le taux de liaison d'un substrat radioactif sur les récepteurs membranaires permettant de quantifier les sites de fixation accessibles, et donc d'estimer la quantité de protéines impliquées dans l'activité des MXR (Horio et al., 1988). <u>Mesure immunochimique</u> : se base sur l'utilisation d'un anticorps (monoclonal ou polyclonal) anti-Pgp, dirigé contre une séquence épitope située dans la région cytoplasmique de la moitié C-ter de la Pgp. L'anticorps le plus utilisé est l'Ac monoclonal C219 qui permet la détection des protéines MDR/MXR chez plusieurs organismes allant des mammifères jusqu'à une grande variété d'invertébrés et même d'organismes végétaux. Chez les bivalves, l'utilisation d'Ac anti-Pgp est principalement exploitée par l'intermédiaire du Western blot, de plus une autre technique dite le Dot blot permettant la quantification des protéines détectées par la mesure de la densité optique des spots obtenus a été mis au point par Galgani et al. (1996). <u>Mesure de l'activité ATPasique associée à l'activité MXR</u> : le transport actif des substrats par la voie des mécanismes de défense multixénobiotiques s'accompagne par la production de phosphate inorganique (Pi) consécutive à l'hydrolyse de l'ATP. Cette activité ATPasique peut être évaluée par une méthode colorimétrique (Parant et al., 2001), permettant ainsi de mesurer de manière indirecte l'activité des voies MXR en évaluant la quantité de Pi produite.
Directes	<u>Mesure de l'accumulation d'un substrat</u> : cette méthode est couramment utilisée chez les bivalves et consiste à exposer les tissus ou les cellules à un substrat radioactif ou fluorescent et de visualiser par la suite l'accumulation du substrat dans les cellules, en se référant à la mesure effectuée en présence d'un inhibiteur des MXR. <u>Mesure de l'efflux d'un substrat</u> : consiste à exposer les tissus ou les cellules à un substrat fluorescent (Rhodamine B123) qui s'accumule en grande quantité dans les cellules, et d'effectuer par la suite un lavage et de remettre les cellules dans un milieu propre, les cellules rejettent alors le colorant qu'elles ont accumulés auparavant de manière proportionnelle à l'activité des voies de résistance aux multixénobiotiques, cette activité peut être évaluée soit mesurant l'augmentation de la fluorescence dans le milieu (Stimal et al., 1998) ou sa diminution dans les cellules (Galgani et al., 1996).

☞ *Les MXR chez les organismes aquatiques (Aspect moléculaire et biochimique) :* Chez les bivalves, la présence des MXR a été mise en évidence au niveau des tissus particulièrement exposés à la pollution de leur milieu (branchies et manteau) ou impliqué dans la détoxification des contaminant assimilés par les organismes (glande digestive) (Kurelec et al., 1989; Minier et al., 1995).

☞ *Les méthodes d'évaluation des MXR chez les mollusques bivalves :* Il existe plusieurs méthodes qui permettent l'évaluation et la mesure de l'activité de mécanismes des MXR qui ont été mis au point, et qui sont résumés dans le tableau suivant (Tableau 3).

5. Les biomarqueurs de génotoxicité

Dans toutes les cellules vivantes, la structure moléculaire dépositaire du patrimoine génétique est l'acide désoxyribonucléique (ADN). De par sa fonction informative, l'ADN est une macromolécule dont l'intégrité est essentielle à la survie de la cellule. Cette macromolécule a une structure complexe qui peut être modifiée par des agents dits « génotoxiques ». Ces modifications peuvent être observées par l'analyse directe de la structure de l'ADN ou par la détection de leurs traductions fonctionnelles.

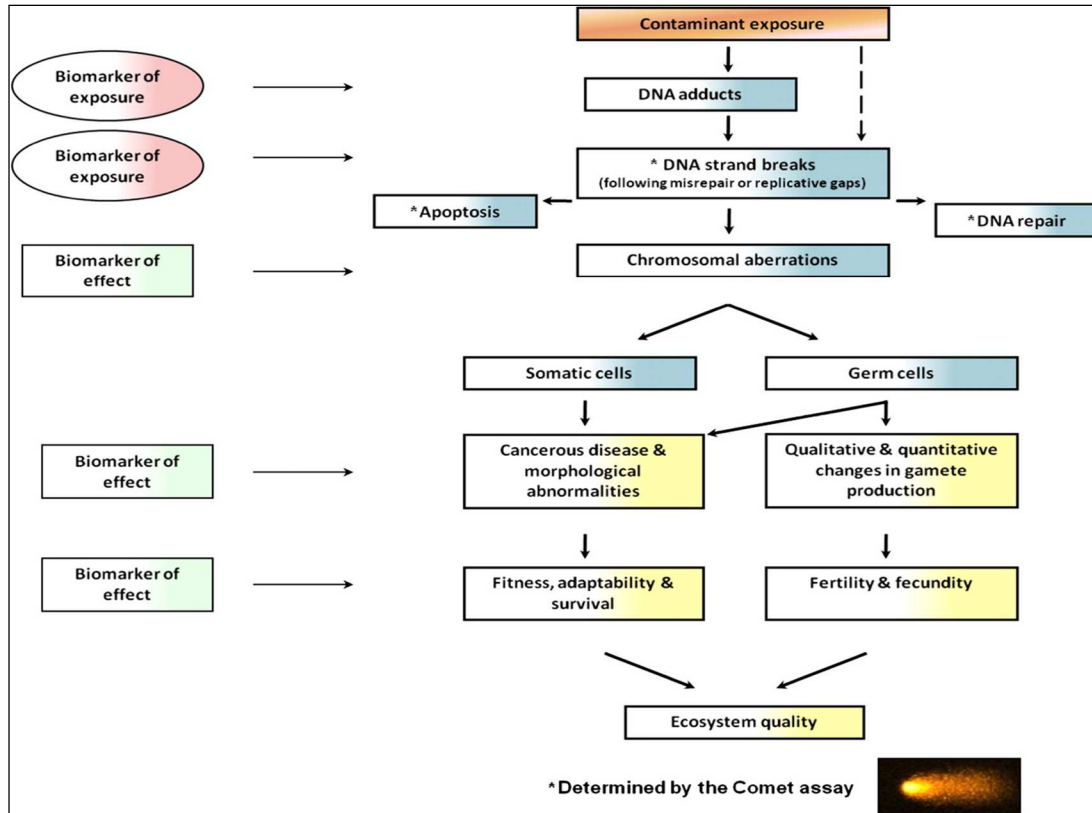


Figure 13 : Les conséquences des altérations au niveau de l'ADN (Jha, 2008).

Les xénobiotiques à caractère génotoxique peuvent induire suivant les cas deux types d'altérations susceptibles d'être utilisées comme biomarqueurs. La première correspond à la formation de produits d'addition entre le xénobiotique et les nucléotides, appelés adduits. La deuxième correspond à des cassures au niveau d'un seul brin, ou des deux brins, d'ADN conduisant parfois à la formation de micronoyaux (Figure 13).

5.1. Le Test des Comètes

Le test des comètes est une méthode sensible et rapide pour détecter les dommages primaires à l'ADN, il permet de détecter et de mesurer des cassures simples et double brin au niveau de l'ADN ainsi que les sites abasiques instables en milieu alcalin et qui génèrent une cassure. Son utilisation s'est très rapidement généralisée pour évaluer la génotoxicité des polluants au laboratoire et sur le terrain.

Le test des comètes à suspendre des cellules dans un gel d'agarose puis après une étape de lyse de faire migrer les noyaux dans un champ électrophorétique. L'ADN chargé négativement va migrer vers le pôle positif du champ d'électrophorèse. Les noyaux intacts migrent de façon homogène et apparaissent sous la forme de spot après révélation de l'ADN par un fluorochrome (Bromure d'éthidium (BET) ou le Gel Red (GR)). Au contraire, l'ADN endommagé par des coupures prend l'aspect d'une comète avec une tête correspondant à l'ADN intact et une queue formée par l'ADN lésé, étiré sous l'effet du champ électrique (Figure 14).

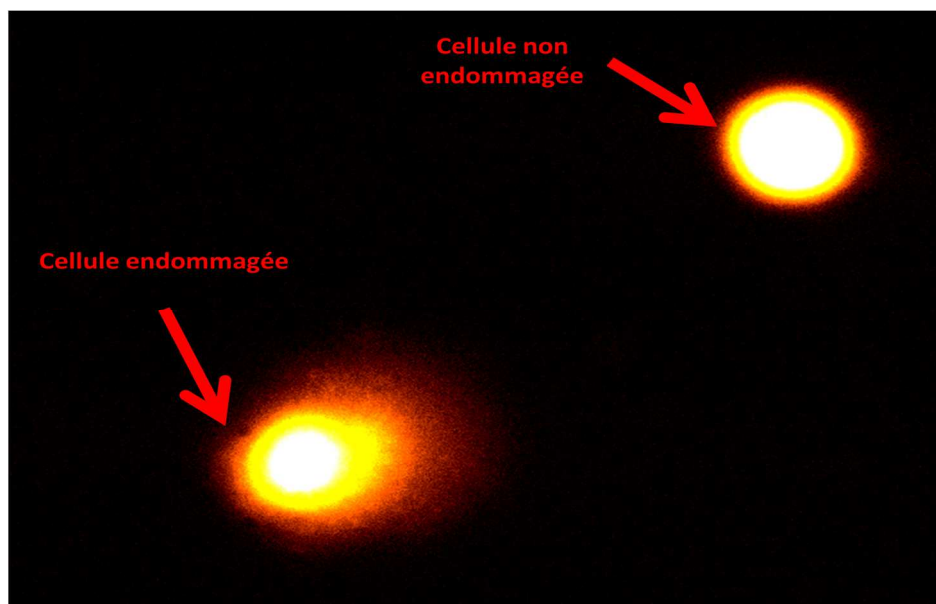


Figure 14 : Exemple de noyaux de cellule d'hémolymphe endommagée et non endommagée. Hémoplymphe prélevée chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, marquage des noyaux par GR.

Le test des comètes apparaît aujourd'hui comme une technique efficace et sensible pour étudier les dommages à l'ADN dans le domaine de l'écotoxicologie. En effet, de part sa sensibilité et sa rapidité de mise en œuvre, ce test est utilisé dans des études de terrain pour déterminer le potentiel génotoxique d'un milieu dans des conditions environnementales. Ainsi, il est possible d'expliquer des phénomènes complexes intervenant sur la réponse biologique à un stress génotoxique comme l'influence de facteurs abiotiques (température, photopériode...) (Andrarde et al., 2004 ; Rank et al., 2007) et biotique (âge, sexe...) (Akcha et al., 2004) ainsi que l'influence des cycles saisonniers (Bocchetti et al., 2008).

5.2. Le Test des micronoyaux

L'exposition à certains agents génotoxiques peut induire des cassures chromosomiques ou un dysfonctionnement du fuseau mitotique, qui est normalement impliqué dans la répartition du matériel génétique de la cellule mère, de façon égalitaire entre les deux cellules filles, au moment de la transition entre la métaphase et l'anaphase de la mitose. Ce dysfonctionnement ou la perte d'un fragment de chromosomes entraînent la formation de micronoyaux (Figure 15).

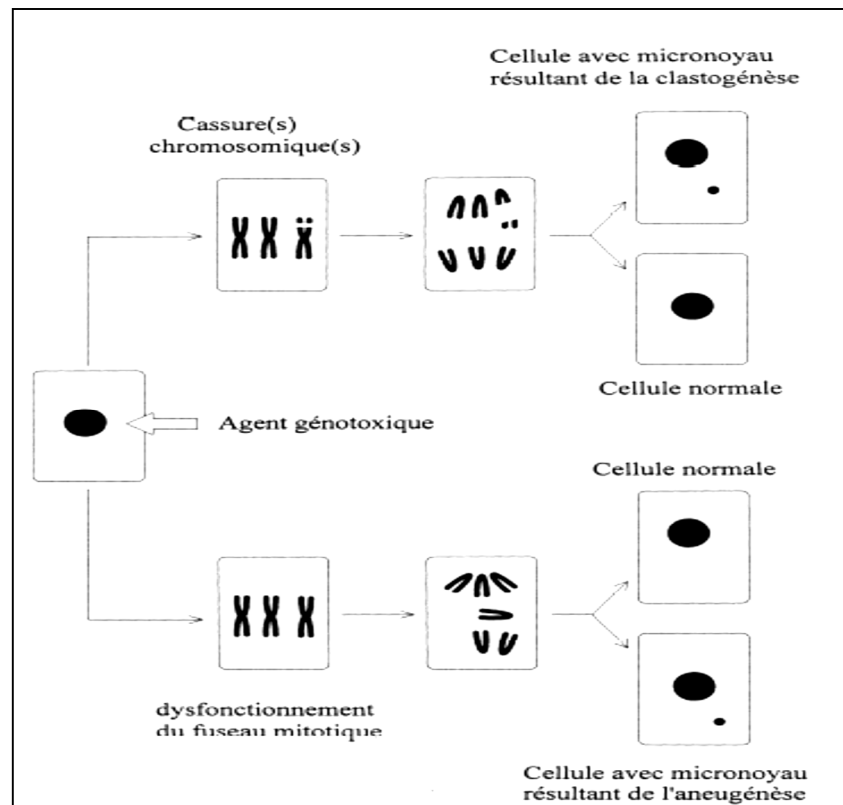


Figure 15 : Les deux mécanismes possibles à la formation d'un micronoyau suite à l'exposition à un agent génotoxique (Fenech 1997).

L'observation des micronoyaux en tant qu'indicateur de génotoxicité est apparue dans les années 1940, mais c'est dans les années 1970 que ce test a été développé sur un grand nombre d'organismes (Godet et al., 1993). Un micronoyau est défini dans le « Glossary of Genetics and Cytogenetics » de Rieger et al. (1968) comme « un petit noyau surnuméraire séparé du noyau principal de la cellule, formé pendant la télophase mitotique ou méiotique et constitué de chromosomes entiers ou de fragments acentriques d'ADN résultant de modifications structurales, spontanées ou expérimentales des chromosomes ».

Suite à l'action de substances clastogènes et/ou aneugènes, des micronoyaux peuvent apparaître dans le cytoplasme des cellules. Le test MN est basé sur le comptage de micronoyaux pour 1000 cellules. Outre la détection de micronoyaux, ce test permet aussi la détection d'autres types d'aberrations nucléaires indiquant des dysfonctionnements cellulaires, les cellules binucléées sont dues au blocage de la cytodiérèse ou à la fusion cellulaire (Rodilla 1993), les noyaux bourgeonnants sont dus à l'élimination de l'ADN amplifié (Miele et al., 1989 ; Shimizu et al., 1998 ; Shimizu et al., 2000) ou encore à l'élimination des complexes de réparation de l'ADN (Haaf et al., 1999). En plus de ces anomalies, ce test permet la détection des cellules apoptotiques (Izquierdo et al., 2003). Le test des Micronoyaux (MN) met en évidence les effets mutagènes potentiels de composés toxiques. Contrairement au test Comète, révélant des lésions primaires de l'ADN, le test MN met en évidence des effets plus stables et irréversibles, qui requièrent une division cellulaire pour apparaître.

6. La stabilité des membranes lysosomales (SML)

∅ *Fonction biologique des lysosomes* : Les lysosomes dont le nom signifie corpuscule lytiques ou digestifs, sont des organites d'environ 0.5µm de diamètre, délimités par une membrane semi perméable lipoprotéique. Ils renferment une soixantaine d'enzymes (Barrett et Heath, 1977) capables de dégrader en produits de faibles poids moléculaires toutes les classes de macromolécules d'origine intracellulaire et extracellulaire, à savoir les acides nucléiques, les protéines, les lipides et les polysaccharides. Les lysosomes sont quasiment présents dans toutes les cellules animales (à l'exception des érythrocytes), végétales, fongiques et les levures (Holtzman, 1989).

∅ *La SML comme biomarqueur* : L'implication des lysosomes dans le maintien de l'homéostasie cellulaire fait de l'intégrité lysosomale un bon indicateur de l'intégrité fonctionnelle de la cellule tout entière (Moore et Icarus Allen, 2002). En effet, les lysosomes participent à la protéolyse (et donc à remise à disponibilité d'acides aminés pour de nouvelles

synthèse protéiques, ce qui inclut notamment les enzymes et protéines de détoxification), au recyclage d'autres macromolécules, au renouvellement tissulaire, à la mobilisation des réserves énergétiques et à la fonction immunitaire. Toutes ces fonctions peuvent être mises à profit pour lutter contre le stress environnemental. Notamment, l'autophagie (dégradation lysosomale des constituants cellulaires endommagés), interviendrait en seconde position derrière la première ligne de défense de l'organisme (les transporteurs de xénobiotiques, les enzymes antioxydantes et de biotransformation), et dans une troisième ligne de défense (en cas d'insuffisance des deux premières) par autophagie ce qui induit la mort de plusieurs types cellulaires (apoptose, autophagie, nécrose) pour préserver l'intégrité de l'organe.

Les lysosomes jouent également un rôle dans certains processus de détoxification par la dégradation et/ou la séquestration de nombreux xénobiotiques. Ils sont notamment capables d'accumuler de grandes quantités de métaux et de polluants organiques, les isolants ainsi du cytoplasme et ce dans les limites des capacités de stockage. Certaines substances en excès peuvent exercer des effets toxiques sur le système lysosomal, tels qu'une déstabilisation de la membrane lysosomale et un éventuel relargage des hydrolases acides ainsi que des substances toxiques accumulées, à l'origine d'effets cytotoxiques (Viarengo et al., 1981 ; Carajaville et al., 1995 a).

La stabilité de la membrane lysosomale a été adoptée par l'UNEP pour évaluer l'impact néfaste de la pollution dans la Méditerranée dans le cadre du MED POL (MED POL Phase IV). Ce biomarqueur peut également être utilisé dans le pronostic pour prédire des dommages hépatiques chez différentes espèces de poissons (Broeg et al, 1999a, b ; Köhler et al, 2002 ; Köhler, 2004), et la dégénérescence hépatopancréatique chez les mollusques (moules bleues et vertes, les bivalves d'eau douce, huîtres), ainsi que le recyclage des protéines (autophagie lysosomale) suite à une attaque par les radicaux libres (Allen et Moore, 2004 ; Kirchin et al., 1992 ; Köhler et al., 2002 ; Moore et al., 2004a ; 2006a ; Nicholson et Lam, 2005 ; Svendsen et Weeks, 1995 ; Svendsen et al., 2004).

Chez les moules, la stabilité des membranes lysosomales et d'autres biomarqueurs lysosomales comme l'accumulation des lipofuscines sont fortement corrélées à la concentration tissulaire des HAPs, qui sont des contaminants omniprésents (Moore, 1990 ; Viarengo et al, 1992 ; Cajaraville et al., 2000).

D'autant plus, il a été démontré que la stabilité des membranes lysosomales chez les moules et les poissons provenant de différentes zones géographiques reflète clairement le niveau de contamination dans l'eau et le sédiment par un mélange de contaminants chimiques (da Ros et al, 2002 ; Pisoni et al., 2004 ; Schiedek et al., 2006 ; Barsiene et al., 2006), et permet même de déterminer de nouveaux "Hot Spots" de pollution (Bressling, 2006).

Matériel et Méthodes

A. Choix de l'espèce sentinelle : La moule *Mytilus galloprovincialis*

I. Classification, morphologie et écologie

La moule *Mytilus galloprovincialis* appartient au :

Règne : Animal

Embranchement : Mollusques

Classe : Bivalves (**Pélecypodes**)

Sous-classe : Ptériomorphes

Ordre : Mytiloidés

Famille : Mytilidés

Genre : *Mytilus*

Espèce : *galloprovincialis*

Mytilus galloprovincialis est un **Mollusque** (corps mou non segmenté) **Lamellibranche** (à branchies lamelleuses) ou **Pélecypodes** (pied en forme de hache) à masse viscérale (masse des viscères) aplatie transversalement. La moule a une coquille équivalve, très inéquilatérale, de contour généralement ovale allongé, subtrigone à cylindrique, avec fréquemment une mince fente byssale ventrale. L'extérieur est pratiquement lisse ou avec des costules radiales ; sculpture souvent plus forte dans les zones postéro-dorsales et antérieure des valves. Le périostracum est bien développé, lisse, lamelleux ou hérissé de soies. Le ligament subinterne est fixé au bord dorsal postérieur de la coquille par une bande calcifiée blanchâtre, compacte ou finement ponctuée. La charnière est dépourvue de dents ou avec quelques dentelons ou crénelures.

Mytilus galloprovincialis est un animal benthique grégaire fixé aux substrats solides dans les anfractuosités des rochers battus et éclairés de l'étage médiolittoral qui sont favorables à l'installation de moulières naturelles. Sensible à la pollution chimique et bactérienne, la moule concentre les polluants et constitue un bon indicateur de la qualité des eaux. La moule est capable de supporter une longue émergence grâce à une réserve d'eau entre les deux valves. En Tunisie, la moule occupe la façade nord du pays depuis Tabarka jusqu'à la pointe du cap-Bon, qui semble la limite orientale de son aire de répartition (Dellali et al., 2001).

1. Anatomie et physiologie de la moule

La moule comme tous les lamellibranches est caractérisée par : Une coquille bivalve allongée noire, permettant la sauvegarde de la masse viscérale (Figure 16). L'anatomie et la fonction physiologique des différents organes de *Mytilus galloprovincialis* sont détaillées ci-dessous :

Le pied et le byssus : Le pied, linguiforme, permet le déplacement et l'enfouissement de l'animal dans le sable. IL peut se replier sous l'action de deux muscles rétracteurs. A sa base se trouve la glande du byssus. Elle synthétise des filaments (byssus) qui fixent la moule à son substrat. Une fois qu'ils sont sécrétés, les filaments se solidifient au contact de l'eau de mer.

Les branchies sont une caractéristique majeure des lamellibranches. Elles consistent en de grands organes en feuillet opérant deux séries de phénomènes, la respiration et la filtration de la nourriture à partir de l'eau. Deux paires de branchies sont localisées sur chaque côté du corps.

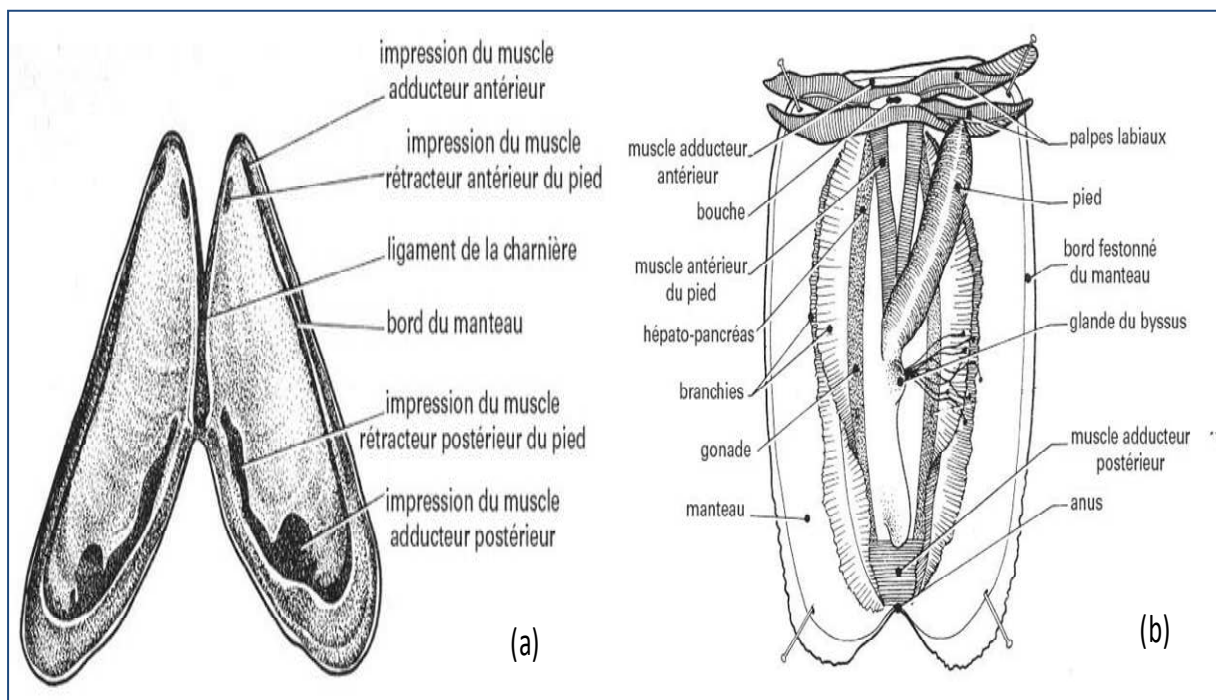


Figure 16 : Morphologie interne des valves (a) et anatomie du corps mou de la moule (b).

Le muscle : la fermeture générale des valves est assurée par deux muscles adducteurs (antérieur et postérieur). Ces muscles sont antagonistes du ligament, qui grâce à son élasticité assure l'ouverture de la coquille.

La glande digestive : (ou hépatopancréas) elle assure la digestion et l'absorption des aliments captés par les branchies. Cet organe est encore appelé hépatopancréas car il joue chez cet invertébré un rôle analogue au foie des Vertébrés (Pagliassoti, 1994).

Le manteau enveloppe l'ensemble de la masse animale et assumant à la fois la sécrétion de la coquille et le rôle de support des gonades.

L'hémolymphe : c'est l'équivalent du plasma des Vertébrés. Chez la moule, ce compartiment correspond essentiellement du point de vue de sa composition saline à l'eau de mer environnante (Lubet, 1969). Il contient aussi quelques protéines et des lipides, circulant sous forme de globules ou de vésicules (Martin et al, 1970).

Les hémocytes : ce sont les cellules circulant dans l'hémolymphe et présentant des caractéristiques de certains leucocytes des Vertébrés. Ce sont des cellules totipotentes, elles interviennent dans les processus de régénération de la coquille et des tissus en cas de blessure et joue un rôle important dans le système immunitaire (immunité non spécifique) en phagocytant de petites particules et des microorganismes (Fisher, 1988).

Le système respiratoire : Les échanges d'oxygène se font par l'intermédiaire des branchies. L'eau chargée en oxygène dissout pénètre dans la cavité palléale via le siphon inhalant. Elle est filtrée par les filaments des deux paires de branchies lamelleuses avant d'être évacuée par le courant exhalant. L'oxygène ainsi capté pénètre dans l'hémolymphe pour être distribué dans tout l'organisme. Lorsque la moule se retrouve à l'air libre, elle ferme sa coquille et passe à une respiration anaérobie (respiration réalisée par certains organismes en l'absence d'oxygène).

Le système circulatoire : L'appareil circulatoire est relativement simple. On y trouve un cœur dorsal (enveloppé par le péricarde) qui comprend deux oreillettes latérales et un ventricule. L'hémolymphe (mélange de sang et de lymphe), chassée dans deux aortes, est distribuée aux différentes parties de l'organisme par un réseau de vaisseaux sanguins. Ce système artériel aboutit à des espaces libres sans parois propres : les lacunes. L'hémolymphe n'est plus, à ce moment, canalisée en un système de vaisseaux individualisés. Elle gagne ensuite les reins, où elle est purifiée, avant de pénétrer dans les branchies. Dans ces organes, elle s'enrichit alors en oxygène (O₂) et se décharge en gaz carbonique (CO₂). Une fois oxygénée, l'hémolymphe rejoint les oreillettes du cœur.

A ce circuit principal se superpose un circuit accessoire. En effet l'hémolymphe qui circule dans le manteau a la possibilité de suivre une voie de retour directe au cœur sans passer par les reins ni les branchies. Lors du passage dans le manteau, un échange d'oxygène et de gaz carbonique a lieu également.

Le système nerveux : Le bord du manteau est tapissé de cellules nerveuses sensibles à la température, aux substances chimiques et à la lumière. Le système nerveux central des mytilidés est principalement constitué de ganglions cérébroïdaux, pédieux et viscéraux. Ce système nerveux diffus possède la capacité de sécréter des neurohormones, notamment de nature peptidique. Les cycles de neurosécrétion ont été étudiés chez les Mytilidés ; Lubet (1959) a mis en évidence une corrélation significative entre les étapes du cycle de reproduction et l'activité des cellules neurosécrétrices chez *Mytilus edulis*. L'activité de certaines cellules des ganglions cérébroïdes (cellules dites piriformes) augmente de manière significative lors de la maturation sexuelle et l'ablation de certains ganglions nerveux (cérébroïdes ou viscéraux) peut inhiber la ponte chez *Mytilus edulis* (Lubet, 1959).

2. Le cycle sexuel de la moule

Chez les moules, la gonade est diffuse dans le manteau et la masse viscérale. Elle est formée par des acini qui aboutissent à des gonoductes constitués par un épithélium cilié. L'absence de formations musculaires autour de ces gonoductes, montre que l'évacuation des produits génitaux se fait uniquement par des mouvements ciliaires (Lubet, 1959). Il a été démontré que la gamétogenèse chez le genre *Mytilus* se déroule en quatre étapes (Chipperfield, 1953 ; Lubet, 1959).

Stade I : période de repos sexuel : C'est la phase de régénération, caractérisée par l'absence de follicules fonctionnels dans la gonade et l'accumulation de plusieurs produits de réserves dans le manteau et la masse viscérale. Au niveau de la paroi folliculaire, il n'existe que quelques cellules mères (oogonies et spermatogonies) qui vont donner naissance à des gonies de taille plus petite et qui se tassent les unes contre les autres, à l'intérieur des acini gonadiques comprimés. Ce sont ces gonies primaires qui constituent pendant les mois de repos sexuel le matériel à partir duquel se reconstituera la gonade. Pour la moule *Mytilus galloprovincialis*, provenant de la lagune de Bizerte (partie septentrionale de la Tunisie), la période de repos sexuel coïncide avec la période de l'année où les eaux sont les plus chaudes notamment en juillet et août (entre 25 et 28°C) (Banni et al., 2011).

Stade II : multiplication des gonies : C'est la phase de l'évolution génitale où dominent les oogonies ou les spermatogonies (accroissement, multiplication, genèse des gonies terminales). A ce stade le manteau est envahi par de nombreux follicules qui résultent de la multiplication des gonies, ces dernières effectuent une croissance qui s'accompagne par des changements dans la morphologie nucléaire (le nucléole grossit et la chromatine devient dense). A la fin de cette phase le réseau folliculaire est visible et montre la présence d'éléments germinaux à différents stades d'évolution (cellules mères, oogonies primaires, oogonies terminales) et dans les follicules les plus avancés quelques oocytes en prévitellogenèse. Cette phase de « multiplication des gonies » se déroule à des dates variables suivant les stations et la date du premier cycle sexuel.

Stade III : oogenèse et spermatogenèse : A ce stade, l'aspect du manteau devient caractéristique. Le dessin des follicules est apparent et la couleur propre à chaque sexe (femelles, rose saumon ; mâles, blanc-jaunâtre) apparaît vers la fin de ce stade. Chez les femelles, cette période se caractérise par l'accroissement des oocytes qui se manifeste par l'accumulation de vitelline protidique dans le cytoplasme. La forme de l'oocyte change, il devient elliptique et fait largement saillie dans la lumière du follicule. Les inclusions lipidiques deviennent très abondantes et confèrent *in vivo* une couleur jaune orangée aux oocytes, il s'agit de chromolipides. Chez les mâles, les spermatogonies forment dans les acini gonadiques une à deux assises périphériques. Elles entrent en méiose et l'on peut repérer tous les stades de la spermatogenèse qui sont stratifiés en zones successives (spermatocytes I, spermatocytes II et spermatozoïde).

Stade IV : période de ponte : Au cours de cette période, on assiste à une émission des gamètes matures dans l'eau ; il s'agit de vidange partielle ou complète de la gonade. Les spermatozoïdes mobiles dans l'eau de mer sont susceptibles de féconder des oocytes fraîchement pondus. Cette période se distingue aisément des stades précédents par l'allure du manteau qui devient translucide et prend une teinte orangée (émission totale). Toutefois, il peut subsister des zones de gamètes mûrs, non émis ou en voie de maturation, formant des îlots épais, orangés chez les femelles et blanc chez les mâles. Le suivi du cycle sexuel chez *Mytilus galloprovincialis* dans la lagune de Bizerte a permis d'identifier deux périodes de pontes en mars et en juin (Banni et al., 2011).

II. Intérêt de la moule comme espèce sentinelle

En général, le choix d'une espèce sentinelle pour analyser différents biomarqueurs repose sur les critères classiques suivants : la large répartition géographique sur la zone étudiée, la sédentarité, la représentativité dans l'écosystème étudié, et la facilité de capture.

L'espèce choisie dans ce travail est la moule *Mytilus galloprovincialis* car elle répond aux critères évoqués précédemment avec de plus, une grande capacité d'accumulation des contaminants. Elle est sédentaire, assez facile à collecter et à manipuler, aisément utilisable dans le cadre des expérimentations de transplantation. Ces caractéristiques en font un organisme très utilisé dans les programmes de surveillance de la pollution des écosystèmes côtiers du type ((*Mussel Watch*), Farrington. ; 1991) comme le RNO en France (Bayne, 1989 ; Claisse, 1990) ou BIOMAR, pour la Mer Baltique. De plus, la moule a été fréquemment utilisée comme modèle dans des études expérimentales d'exposition aux contaminants environnementaux en laboratoire. Les mécanismes de toxicité de ces contaminants ainsi que les systèmes de biotransformation utilisés comme biomarqueurs commencent à être bien connus (Narbonne & Michel, 1997).

B. Etude expérimentale

Evaluation de l'effet combiné de l'élévation de la température et d'une dose subléthale du B[a]P sur les biomarqueurs de stress oxydatif chez *Mytilus galloprovincialis*

La variation de la température influence divers processus chimiques et biologiques. Chez les organismes marins, les fluctuations de la température provoquent des modifications au niveau de la respiration, du cycle de reproduction et les périodes de ponte, l'assimilation et la bioaccumulation des substances toxiques (Aiken et Waddy, 1990). C'est dans cet objectif, que nous avons évalué l'effet de la fluctuation de la température combiné avec l'exposition à une dose de benzo[a]pyrène (B[a]P) dans des conditions expérimentales chez la moule *Mytilus galloprovincialis*.

I. La substance testée : le benzo[a]pyrène

1. Structure et caractérisation chimique

Le benzo[a]pyrène est un composé de formule $C_{20}H_{12}$ appartenant à la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) qui se présente sous la forme d'un solide cristallin jaune. Il est formé de cinq cycles fusionnés (Figure 17). Le B[a]P a une température de fusion de 179°C . C'est un composé très peu volatile dans l'air et très peu mobile dans les sols et l'eau. Le B[a]P est peu dégradable : sa demi-vie dans le sol en condition aérobie varie d'après Coover et Sims (1987) de 57 à 530 jours (pour des variations de température de 10 à 30°C). La solubilité du B[a]P dans l'eau de mer est fortement dépendante de la salinité. La solubilité du B[a]P apparaît cependant comme étant plus faible en eau de mer qu'en eau douce (Turner et Rawling, 2002). Le benzo[a]pyrène est omniprésent dans l'environnement, il est issu de la combustion des fossiles et de la combustion incomplète. Sa présence dans l'environnement est majoritairement d'origine anthropique : raffinage du pétrole, du schiste, du charbon, les revêtements routiers, la fumée de cigarette, etc... Les sources naturelles d'émissions sont les éruptions volcaniques et les feux de forêts.

2. Toxicité du B[a]P

Le benzo[a]pyrène B[a]P est un composé ubiquiste très représentatif des HAPs dans le milieu marin. Il s'agit d'un hydrocarbure aromatique polycyclique à cinq cycles dont les propriétés mutagènes et cancérogènes ont été largement étudiées chez les animaux aquatiques, aussi bien les vertébrés que les invertébrés (Gravato et Santos, 2002). On pense même que certains métabolites du B[a]P peuvent interférer dans les processus chimiques cellulaires.

Cette interférence pourrait conduire à l'induction de cancers par altération du processus génétique et du processus de division cellulaire lors de la combinaison avec l'ADN (Lin et al., 2008). La toxicité est la capacité inhérente à une substance de produire des effets délétères sur un organisme. Les HAPs n'ont pas tous les mêmes propriétés toxiques ni les mêmes effets toxiques. Le B[a]P est le HAP le plus étudié en raison des importantes propriétés toxiques de ses métabolites. Le B[a]P est principalement connu pour ses effets mutagènes, génotoxiques et cancérigènes. Des effets immunotoxiques du B[a]P ont également été rapportés chez le poisson (Carlson et al., 2002).

II. Protocole expérimental

Les moules qui ont servi pour cette expérience proviennent d'une station conchylicole dans la lagune de Bizerte. Les individus qui ont servi à l'expérience ont été acclimatés aux conditions du laboratoire pendant 15 jours. Le nettoyage des bacs et le renouvellement de l'eau est quotidien. Après cette période d'acclimatation, les moules ont été subdivisées en 10 groupes de 20 individus (1.5l d'eau de mer/ individu) et placées dans des bacs thermostatés (18, 20, 22, 24 et 26°C). Les conditions expérimentales sont résumées dans la figure 17. Les moules ont été exposées à un gradient croissant de température (18, 20, 22, 24 et 26°C) avec une dose subléthale de B[a]P ($19\mu\text{g.l}^{-1}$) pendant 7 jours.

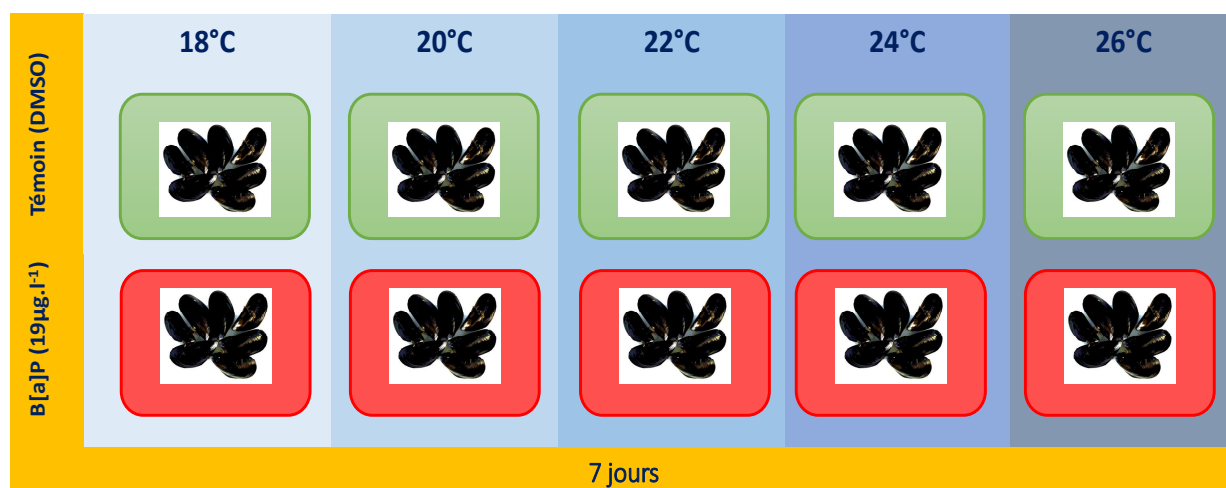


Figure 17 : les différentes conditions de l'exposition de la moule au B[a]P et au gradient de température.

Après 7 jours d'exposition, les moules sont retirées des bacs et nettoyées. Par la suite les moules sont disséquées, la glande digestive de chaque individu est vite plongée dans l'azote liquide jusqu'au moment des analyses biochimiques. Les glandes digestives qui ont servi pour le dosage chimique sont conservés à -20°C.

C. Etude *in situ*

Application d'une approche multi-biomarqueurs chez *Mytilus galloprovincialis* pour la biosurveillance de la lagune de Bizerte

I. Choix du site d'étude

La lagune de Bizerte est située au nord-est de la Tunisie (latitude : 37°8'-37°14' N, longitude : 9°46'-9°56' E). Elle s'étend sur une superficie de 128 km² (la largeur maximale est de 11 km et la longueur maximale est de 13 km). Elle communique avec la mer par un goulet de 6 km de longueur. La profondeur moyenne de la lagune est de 7 m. Les régions profondes sont le centre de la lagune (9 m) et le goulet (12 m). La lagune est reliée dans sa partie ouest à un second plan d'eau, le lac Ichkeul, par l'intermédiaire du canal Tinja d'environ 5 km de long et de quelques mètres de profondeur (3 mètres en période de crue). Le canal est actuellement équipé d'écluses permettant de gérer les échanges entre le lac Ichkeul et la lagune de Bizerte. Des villes en expansion urbaine et industrielle (Bizerte, Menzel Jemil, Menzel Abderrahmen et Menzel Bourguiba) jonchent le pourtour de la lagune.

La lagune de Bizerte est en communication directe avec la mer Méditerranée d'une part et le lac Ichkeul d'autre part. La lagune est nommée patrimoine international, vue sa position géographique qui lui confère un intérêt économique mais qui a laissé des séquelles environnementales assez évidentes sur ce milieu devenu actuellement fragile (Kamens et al., 1984 ; Pengelly et al., 1998 ; Mosbahi, 2002 ; Srarfi et Shimi, 2004 ; M.A.E.R.H, 2005).

1. Hydrologie et spécificités de la lagune

Les apports en eau de la lagune de Bizerte sont en fonction de la pluviométrie, et du coefficient de ruissellement du bassin versant du lac Ichkeul. Dans le bilan hydrologique de la lagune de Bizerte l'oued Tinja est un exutoire naturel du lac Ichkeul (Kallel, 1989), joue un rôle prépondérant, surtout en hiver avec un débit annuel d'évacuation dans la lagune de 438 Mm³ (Chaumont, 1956).

Le bilan hydrologique de la lagune de Bizerte est sous influence saisonnière. En hiver, les eaux circulent du lac vers la lagune de Bizerte, avec des flux liquides et solides respectivement estimés à 418 (± 28) Mm³ et (28 ± 5) x 10³ (t), l'apport direct des précipitations est estimé à 120 (± 8.8) Mm³. Ces apports massives en eau dans la lagune

créent un excès de $534 (\pm 26) \text{ Mm}^3$, cet excès sera acheminé vers la mer (Figure 18 a) (Ben Garali et al., 2009).

Durant la période estivale, les apports pluviométriques directes sont d'environ $6 (\pm 0.81) \text{ Mm}^3$, les apports hydrologiques par le lac Ichkeul sont nuls, par contre l'évaporation de ce plan d'eau est importante se traduisant par un volume $90 (\pm 3.3) \text{ Mm}^3$, ces conditions provoquent l'incursion des eaux marines vers la lagune avec un volume estimé à $84 (\pm 2.5) \text{ Mm}^3$ (Figure 19.b) (Ben Garali et al. 2009).

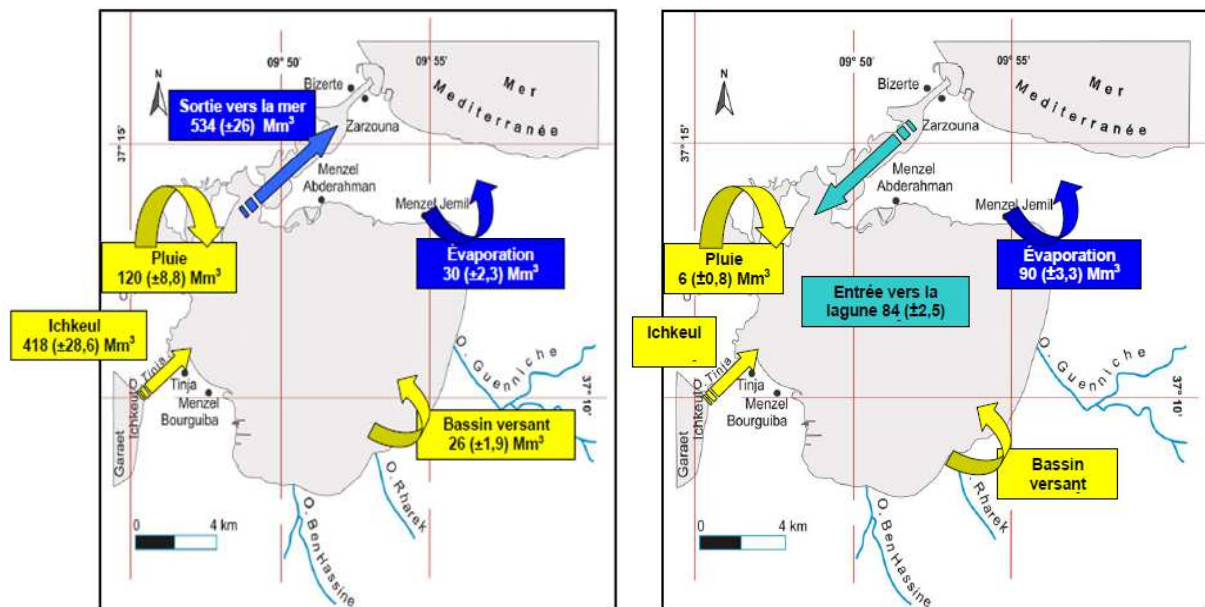


Figure 18 : Bilan hydrologique de la lagune de Bizerte durant la saison hivernale (a) et la saison estivale (b) (Ben Garali et al, 2009).

2. Sources majeures de pollution de la lagune

La région de Bizerte compte une population de plus de 273 milles habitants et constitue un pôle de développement socio-économique à caractère national concentré autour de la lagune. Elle est caractérisée par des activités industrielles, agricoles, de pêche, portuaire et commerciale. Selon (Trabelsi et Driss, 2005) le développement économique de la région de Bizerte qui se manifeste par l'installation de plusieurs unités industrielles, utilisent la lagune de Bizerte comme réceptacle finale de divers types de rejets (macro et micro polluants). En effet, l'activité industrielle sur le pourtour de la lagune étant très développée et diversifiée (industries pétrolières, aciéries, cimenteries...), ceci rend la lagune exposée de manière

chronique à des xénobiotiques tels les HAPs, les métaux lourds et les antibiotiques (Yoshida *et al.* 2002 ; Trabelsi et Driss 2005) (Tableau 4).

La pollution par les métaux lourds constitue une menace assez importante dans les problèmes environnementaux de la région. En effet, le bassin versant de la lagune abrite plusieurs unités de métallurgie, une sidérurgie (Ben Guirat, 1997 ; Pengelly *et al.*, 1998), aussi une ancienne mine de Plomb et de Zinc (Sainfeld, 1952) Il a été démontré que les sédiments de la lagune de Bizerte sont fortement contaminés par de multiple éléments potentiellement toxiques, cette contamination est due à l'urbanisation et aux activités industrielles situés sur le pourtour de la lagune. Cinq régions constituent les sources majeurs de pollution de la lagune de Bizerte ont été identifiées, on cite ; la région de Menzel Bourguiba, Bizerte, les rejets de Menzel Abdelrahmen, la zone industrielle de Menzel Jemil et la région agricole située au sud de la lagune (Yoshida *et al.*, 2002).

Tableau 4 : Contribution des différentes sources de pollution de la lagune de Bizerte (Rapport Phase I, 2003).

	Débit (m ³ /jr)	MES (kg/jr)	Nitrates (kg/jr)	P totaux	HC totaux	As (kg/jr)	Cd (kg/jr)	Hg (kg/jr)	Pb (kg/jr)	Zn (kg/jr)	Fe (kg/jr)
Rejets industriels	31886	5343.06	19.21	29.43	3162.45	15.24	2.21	0.06	1.62	2.41	1305.63
En %	61.22	45.40	31.38	76.29	99.25	97.39	69.62	76.01	68.89	63.58	99.19
Rejets domestiques	19996	3146.21	41.80	9.12	23.47	0.41	0.96	0.02	0.62	0.9	6.51
En %	38.39	26.73	68.27	23.65	0.75	2.61	30.25	23.99	26.17	23.73	0.49
Rejets de lixiviats	164	3275.74	0.21	0	0	0	0	0	0.12	0.48	4.18
En %	0.31	27.83	0.34	0	0	0	0.13	0	4.94	12.7	0.32
Rejets des activités portuaires	40	3.50	0.01	0.02	0.11	0	0	0	0	0	0
En %	0.08	0.03	0.02	0.05	0	0	0	0	0	0	0
Total (T/jr)		11.768	0.061	0.039	3.15	0.016	0.003	0	0.002	0.004	1.316
Total (T/an)	2E+07	3530.55	18.368	11.572	945.01	4.7	0.95	0.02	0.71	1.14	394.89

De plus l'utilisation intensive d'engrais chimiques azotés et phosphatés, participent activement à la pollution des eaux de la lagune. Actuellement on assiste à une altération progressive des caractères physico-chimiques liés à l'augmentation des apports en nutriments des eaux à la lagune qui serait responsable de la régression de la diversité biologique et de la production halieutique. L'importance de ces apports en nutriments azotés et phosphatés

inorganiques dissous dans les eaux de la plupart des oueds se déversant dans la lagune est liée aux conditions hydroclimatiques et aux aménagements hydroagricoles du bassin versant de la lagune.). Le lessivage des sols apporte aussi la limonite et la goethite (Kamens et al., 1984).

3. Localisation des sites de prélèvements

Le choix des sites et des contaminants étudiés s'est basé principalement sur la présence des moules et a tenu compte des résultats travaux antérieurs (Ben Khedher et al., 2012 ; Mahmoud est al., 2010 ; Khessiba et al., 2004 ; Dellali et al., 2001, 2004). Seulement 2 sites ont été sélectionnés dans la lagune.



Figure 19 : Localisation des sites d'étude.

La première station est considérée comme un site pollué **Site 1 : Menzel Abdelrahmen**, ce site est principalement affecté par les rejets provenant de la station d'épuration, les déchets issus des activités portuaires (port de pêche de Menzel Abdelrahmen) et les rejets urbains sous forme solide et liquide (Mahmoud et al.2010). Le deuxième site est peu contaminé **Site 2 : Baie des carrières** localisé au niveau du canal qui relie la lagune avec la mer méditerranéenne, ce site est localisé à proximité de plusieurs industries et est caractérisé par une courantologie assez importante.

II. Méthodologie d'échantillonnage

L'échantillonnage est réalisé dans l'objectif d'étudier les variations temporelle et spatiale des différents paramètres choisis. Pour ceci, une centaine de moule *Mytilus galloprovincialis* est prélevée mensuellement à partir de chaque site d'étude et ramenée directement au laboratoire là où les moules sont traitées immédiatement.

30 individus sont soumis aux conditions de *stress on stress*, dans une enceinte thermostatée ajustée sur 16°C. 30 individus ont servis pour les mesures biométriques et la détermination du sexe. La stabilité des membranes lysosomales a été suivie sur les hémocytes fraîches de 10 individus. 60 moules sont disséquées, les branchies, la glande digestive et le manteau sont directement plongée dans l'azote liquide et y sont conservés jusqu'à leur utilisation pour les mesures biochimiques et chimiques. Le prélèvement de l'hémolymph a été fait pour 20 individus, les hémocytes récupérés après centrifugation sont conservés dans une solution (RPMI, SVF et de DMSO) et congelés dans l'azote liquide pour l'utilisation dans le test comète.

III. Mesures des paramètres biométriques

1. L'indice de condition

L'indice de condition est le rapport du poids de chair sur le volume interne de la coquille, et représente le premier indicateur du taux de remplissage de la coquille par les tissus mous. Cet indice est généralement utilisé pour évaluer les variations saisonnières des réserves nutritives ou de la qualité des tissus, aussi bien que pour suivre les effets délétères de divers contaminants et/ou maladies (Crosby & Gale, 1990).

Pour ceci, les valves sont nettoyées de tout dépôt de sédiment et de tout épibionte à l'aide d'un scalpel et de papier absorbant humidifié. La longueur (L), hauteur (H) et épaisseur (E) maximales de la coquille de la moule sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse, à la précision 0,01 mm.

Trente animaux par modalité d'exposition sont ouverts (par section des muscles adducteurs à l'aide d'un scalpel introduit entre les deux valves au niveau de la face ventrale), les tissus mous sont soigneusement détachés des valves et l'excès d'eau est évacué sur du

papier absorbant selon des gestes et un temps constants (4 retournements sur une portion sèche de papier, durant 12 secondes au total). Les tissus mous ainsi égouttés sont alors immédiatement pesés, de même que les valves convenablement essuyées. Les gonades sont pesées à part pour pouvoir déterminer par la suite l'indice gonadique. La totalité du tissu mou est placé sur une petite feuille de papier aluminium marqué individuellement et séché pendant 48 à 70°C. L'indice de condition calculé selon la formule développée par Lucas et Beninger (1985) :

$$IC = \text{poids des tissus frais} / (\text{poids total} - \text{poids sec}) * 100$$

2. Indice gonado-somatique

La présente étude ne concerne que des individus matures, ayant déjà réalisé une première gamétogenèse. L'indice gonado-somatique (IGS) est habituellement exprimé comme le rapport entre le poids des tissus gonadiques et le poids du corps. Chez les moules, les gonades sont principalement contenues dans les lobes du manteau et, pour cette raison, le poids du manteau peut servir d'approximation du poids des gonades.

Les tissus gonadiques ainsi que l'ensemble des tissus frais ont été alors pesés et l'indice gonado-somatique (GSI) calculé selon la formule :

$$GSI = (\text{poids frais de la gonade} / \text{poids des tissus frais})$$

D. Dosages des biomarqueurs

Les fractions subcellulaires (fraction post-mitochondriale et microsomes) des différents tissus et organes prélevés, nécessaires au dosage des biomarqueurs, sont préparées extemporanément.

Sept marqueurs biochimiques ont été dosés au niveau des branchies ou de la glande digestive : le taux des MTs, de MDA, les activités enzymatiques de la BPH, la CAT, la GST et l'AChE et l'expression des MXR : la mesure des activités BPH et l'AChE, a été réalisée au Laboratoire d'écotoxicologie de l'IFREMER à Nantes. L'évaluation de l'activité des MXR a été mesurée au Laboratoire d'écotoxicologie - Milieux Aquatiques (LEMA) à l'université du Havre.

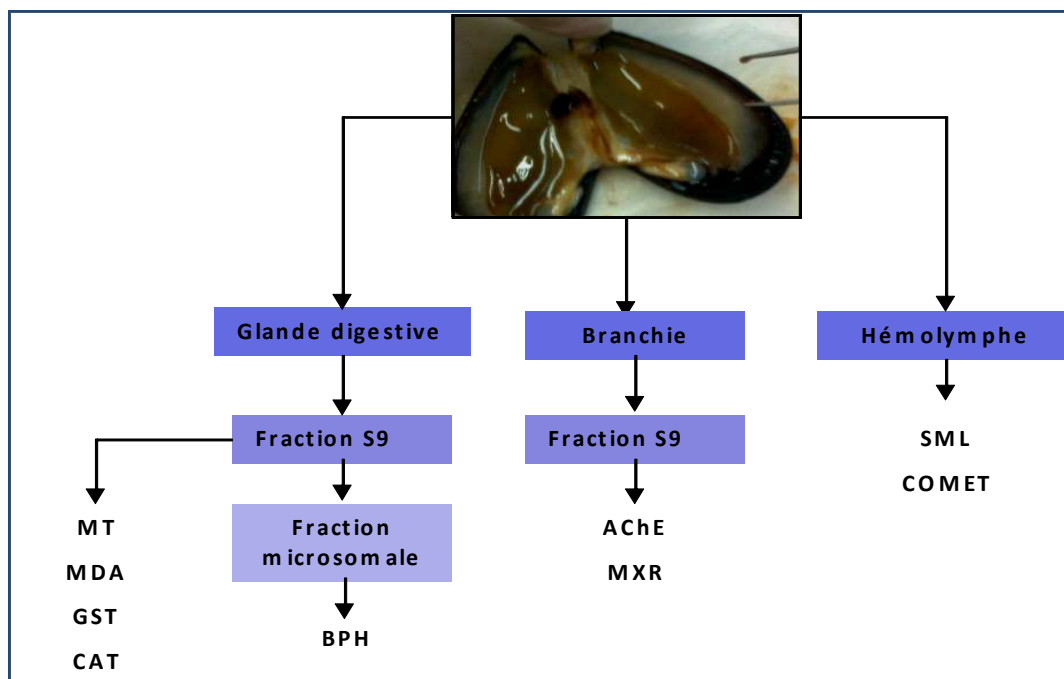


Figure 20 : Utilisation des tissus de *Mytilus galloprovincialis* pour la mesure des biomarqueurs.

1. Mesure de l'activité acétylcholinestérase

L'AChE a été mesurée dans la fraction post-mitochondriale (S9) de branchies selon la méthode Ellman et al. (1961) modifiée et adoptée pour le dosage par microplaques par Boquené et al. (1993).

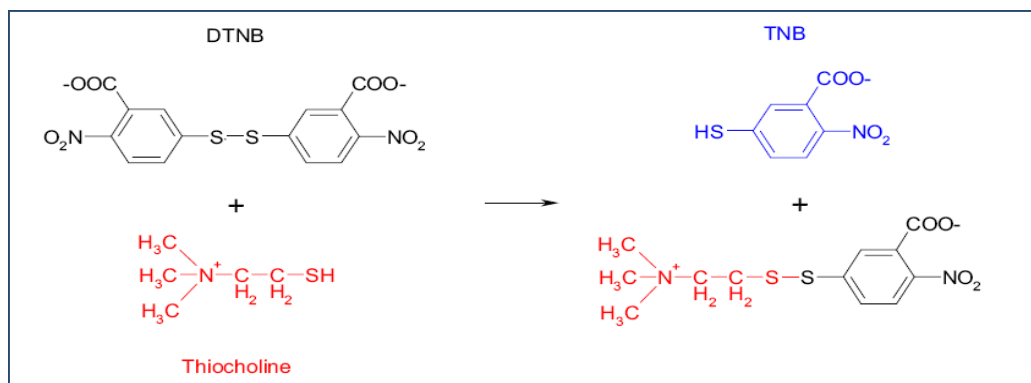


Figure 21 : Hydrolyse de la thiocholine en présence de DTNB.

Cette méthode se base sur l'hydrolyse d'un ester de choline (Figure 21) ; l'acétylthiocholine (ACh) par l'acétylcholinestérase (AChE). La thiocholine (TH) libérée réagit avec le 5-5'-dithio-bis (2-nitrobenzoate) (DTNB) pour former le 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB), produit de couleur jaune qui absorbe à une longueur d'onde de 412 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente dans le milieu.



La variation de la densité optique est suivie à un intervalle de 5 minutes pendant 30 minutes à 412 nm contre une solution ne contenant pas l'échantillon à doser (blanc). Les résultats sont exprimés en $\text{nmole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines totales.

3. Dosage de l'activité enzymatique de la Benzopyrène Hydrolase

Principe : L'exposition de mollusques à des xénobiotiques (pesticides, métaux, détergents, hydrocarbures aromatiques polycycliques et autres toxiques), induit une activation des mécanismes de détoxification. Parmi ces mécanismes, le cytochrome P450 isoforme 1A1 est une oxydase qui permet la métabolisation de nombreux xénobiotiques (c'est la phase I de la détoxification dite, phase de fonctionnalisation). Chez les mollusques, l'activité dépendante du cytochrome P450 peut être déterminée indirectement par la capacité d'un extrait de glande digestive à biotransformer un polluant organique (dans notre cas, le benzo[a]pyrène).

Préparation des microsomes : Les échantillons de glandes digestives sont homogénéisés (1:2) au potter dans la glace dans un tampon Tris (Tris-HCl 10 mM pH 7,6 ; KCl 0,15 M ; Sucrose 0,5 M, Dithiotréitol 1mM). 200 μl de Leupeptine ($1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) sont ajoutés

à ce broyat. Les broyats sont ensuite transférés dans des tubes Eppendorf puis centrifugés 15 minutes à 9000 g à 4°C. Les surnageants sont ensuite ultracentrifugés pendant 1 heure à 100 000 g à 4°C. Le culot de microsomes est repris dans 1 ml de tampon (EDTA disodique 1 mM, glycérol 20% (v/v), Tris HCl pH 7,6 8 mM, KCl 0,12 M, Dithiotréitol 0,8 mM). Les protéines de la fraction microsomales sont quantifiées à l'aide de la méthode Bradford (kit Biorad protein assay) afin de pouvoir exprimer l'activité BPH en relatif par rapport à la quantité de protéines microsomales présentes dans l'extrait.

Dosage de l'activité BPH : L'activité BPH est ensuite déterminée à partir de la cinétique de formation d'un des métabolites du B[a]P : le 3 OH-B[a]P. Pour la réaction, 0,5 mg de protéines microsomales sont déposés sur une microplaque 96 puits dans 240 µl d'un tampon EDTA disodique 1 mM, glycérol 20% (v/v), Tris HCl (pH 7,6 ; 8 mM), KCl 0,12 M, Dithiotréitol 0,8 mM. La cinétique démarre après l'ajout de 0,1 mM de NADPH et 2mM de B[a]P. Une mesure de 5 minutes (avec une mesure toutes les 15 secondes) est réalisée à l'aide d'un spectrofluorimètre Safire TECAN à une longueur d'onde d'excitation de 430 nm et une longueur d'onde d'émission de 510 nm (correspondant au maximum d'émission du 3OH B[a]P).

Expression des résultats par rapport à un étalon externe de 3OH-BaP : Une gamme étalon externe allant de 0 à 100 µM est réalisée à partir d'un standard de 3OH-B[a]P (Promochem). L'activité BPH est calculée d'après la pente de la cinétique dans sa partie linéaire. Elle est exprimée en pmole de 3OH-B[a]P générée.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines microsomales.

4. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase

Principe : L'activité de la Glutathion S-transférases (GST) est mesurée sur les fractions post-mitochondriales des branchies et de la glande digestive par la technique spectrophotométrique de Mannervik et Danilson (1988). Le principe du dosage est basé sur la mesure de la cinétique d'apparition du thioéther formé lors de la conjugaison du substrat 1-chloro 2, 4-dinitrobenzène (CDNB) avec le glutathion réduit (GSH) utilisé comme cofacteur. La solution réactionnelle (GSH 1 mM, CDNB 1mM, tampon Tris 100mM, pH 7.4) est ajoutée à chaque échantillon. La densité optique est mesurée à 340 nm.

Suivi de l'activité enzymatique : Dans les cuves, on introduit dans l'ordre : 1 ml du tampon Tris ; 50 µl de la solution de CDNB, 50 µl de l'extrait brut contenant l'enzyme et enfin 50 µl de glutathion réduit (GSH) pour déclencher la réaction. La variation de la densité optique est suivie pendant 2 minutes à un intervalle de 30 secondes contre une solution ne contenant pas l'échantillon à doser (blanc).

Détermination de l'activité de la GST : L'activité spécifique de la GST est exprimée en µmole. minute⁻¹. mg⁻¹ de protéines totales, elle est donnée par la formule suivante :

$$\text{Activité spécifique } (\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ P}) = (\Delta \text{ DO} / \text{mn} \times 1000) / (\epsilon * V * P)$$

$\Delta \text{ DO} / \text{mn}$ = DO essai – DO blanc

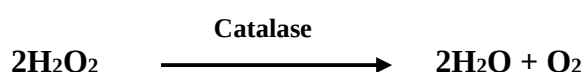
V: volume de l'échantillon en ml.

P: mg de protéines par ml de la fraction à doser.

ϵ : Coefficient d'extinction molaire de GSH est égale à 9,6 mM.cm⁻¹.

5. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase

Principe : Les catalases sont des enzymes qui interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydatif en éliminant les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) toxique pour la cellule en eau et en oxygène. La technique utilisée est celle décrite par Clairborne (1985), elle consiste à suivre la disparition de l'eau oxygénée par action de la catalase selon la réaction suivante:



Suivi de l'activité enzymatique : Dans une cuve en quartz on introduit dans l'ordre 1. 50 ml de tampon phosphate (100 Mm, pH 7.4, à 25°C), 200µl H₂O₂ (500mM), et enfin 20µl de l'extrait brut contenant l'enzyme. On suit la diminution de la densité optique pendant 30 secondes à un intervalle de 5 secondes à une longueur d'onde 240 nm.

Détermination de l'activité de la catalase : L'activité spécifique de la catalase est exprimée en nmole. min⁻¹. mg⁻¹ de protéines et est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Activité Catalase (nmole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ P}) = (\Delta \text{ DO} / \text{mn} \times 1000) / (\epsilon * V * P)$$

$\Delta \text{ DO} / \text{mn}$ = DO essai – DO blanc

V : volume de l'échantillon en ml.

P : mg de protéines par ml de la fraction à doser.

ϵ : Coefficient d'extinction molaire de peroxyde d'hydrogène 0.04 M.cm⁻¹.

6. Le taux d'accumulation des malondialdéhydes

Principe : Le dosage du malondialdéhyde est effectué selon la méthode de Sunderman (1985) qui utilise le test à l'acide thiobarbiturique (TBA). Cette mesure est basée sur les propriétés de certains composés comme le malonedialdéhyde, de réagir avec le TBA pour régénérer un produit coloré qui absorbe à une longueur d'onde de 532 nm. Cette technique relativement simple, suscite cependant quelques interrogations, en particulier, sur son manque de spécificité car le thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) réagit également avec d'autres composés présents tels que les alcadiénals (Kikagawa et al., 1990).

Dosage du malondialdéhyde : La glande digestive et les branchies ont été pesées ensuite broyées à froid dans trois volumes de tampon Tris 100mM, pH 7.4. L'homogénat est ensuite centrifugé à 14000 tours/min pendant 20 minutes. Le surnageant obtenu appelé S9 obtenue va servir pour le dosage du MDA.

Dans un tube à essai, on introduit 2 ml de la solution H₃PO₄ 1%, TBA 30mM ; KCl 154mM et 200 μ l de l'échantillon à étudier, le mélange a été mélangé ensuite incubé pendant 45 minutes à 95°C. La réaction entre le TBA et le malondialdéhyde donne un dérivé TBA-MDA (Figure 22) de couleur rose qui absorbe à 532 nm.

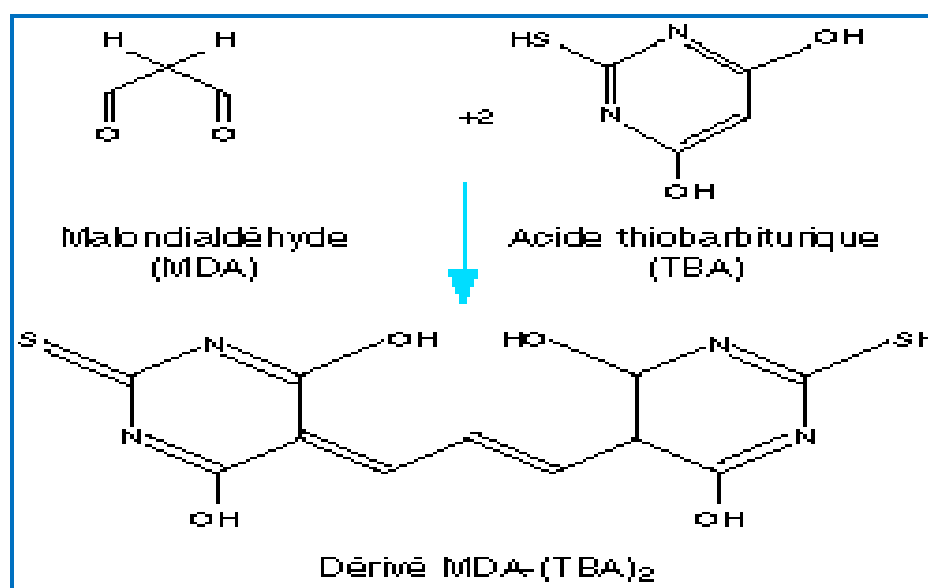


Figure 22 : Réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique.

Gamme étalon du Tétraméthoxypropane (TMP) : Le contenu en MDA est évalué en utilisant le 1, 1, 3,3- Tétraméthoxypropane (TMP), comme standard de référence. Pour cela une gamme étalon a été réalisée avec une solution de TMP de concentration 2.96nM dans une solution H₃PO₄ 1%, TBA 30mM ; KCl 154mM.

Détermination de la quantité en malondialdéhyde : Pour quantifier le contenu en malondialdéhyde, on extrapole les valeurs obtenues à partir des échantillons étudiés sur la courbe de référence du TMP. La quantité de MDA exprimée en nmole. mg⁻¹ de protéine est donnée par la formule suivante :

$$\text{nmole MDA.mg}^{-1} \text{ P} = (\text{DO 532} \times \text{dilution}) / (\text{Pente} \times \text{mg de protéines totales})$$

DO 532 : densité optique de la fraction purifiée en métallothionéines.

Pente : pente de la courbe gamme TMP.

7. Le dosage des métallothionéines

Principe : Le dosage des métallothionéines se base sur l'évaluation du contenu en résidus -SH par une méthode spectrophotométrique utilisant le réactif d'Ellman (DTNB : 5,5 dithiobis 2 acide nitro benzoïque) (Ellman, 1959). Une gamme étalon est préparée au préalable en utilisant comme référence plusieurs concentrations de la forme réduite de glutathion portant un groupement thiol -SH (Viarengo et al., 1997).

Etant donné que les métallothionéines contiennent un nombre important de cystéines (environ 20 à 30 %), la détermination des MTs est fondée sur la détection des groupements SH permettant une évaluation plus sélective de ces métalloprotéines. La réaction entre le DTNB et les groupements -SH des protéines produit des quantités stoechiométriques de TNB (thionitrobenzoate), un composé de couleur jaune qui absorbe à 412 nm.

Préparation de la fraction enrichie en métallothionéines : Les branchies et les glandes digestives sont broyées à froid dans trois volumes d'une solution de lyse constituée d'un tampon Tris-HCl 20 mM ; pH 8,6 ; sucrose 0,5M ; PMSF 0,5 M ; 0,01 mM β-mercaptoéthanol comme agent réducteur.

- ✓ L'homogénat obtenu est centrifugé à 30 000 g pendant 20 minutes à -4°C.
- ✓ Le surnageant obtenu traité par 1.05 ml d'éthanol absolu froid (-20°C) et 80 µl de chloroforme, pour faire précipiter les protéines de haut poids moléculaire subit une nouvelle centrifugation à 9000 g pendant 10 minutes.

- ✓ Un volume de 40 µl de HCl 37%, 10 µl d'une solution RNA (1mg/10 µl) et trois volumes d'éthanol absolu froid seront ajoutés au surnageant qui sera centrifugé à 9000g pendant 10 minutes et incubé pendant une heure à -20°C.
- ✓ Le culot obtenu et de nouveau centrifugé après lavage avec une solution d'Ethanol /Chloroforme/tampon d'homogénéisation (87 :1 :12 v/v) froid à -20°C.
- ✓ Une dernière centrifugation à 9000 g pendant 10 minutes.

Remise en suspension de la fraction enrichie en métallothionéines : Ajouter au culot 150µl d'une solution NaCl 0.25 M et 150 µl d'une solution composée de HCl 1 N contenant 4 mM d'EDTA (solution de déstabilisation). Agiter jusqu'à la remise en suspension complète de l'échantillon.

Détermination des concentrations en protéines totales : La concentration en protéines totales est déterminée selon la méthode de Bradford (1976), en utilisant le bleu brillant de coomassie. Ce réactif réagit avec les protéines en donnant des complexes de coloration bleue qui absorbent à une longueur d'onde de 595 nm. La gamme étalon est réalisée avec une solution mère d'albumine bovine sérique (BSA) de concentration 1mg.ml⁻¹.

Dosage spectrophotométrique des métallothionéines : Le contenu en groupements thiols (-SH) des métallothionéines est évalué en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme standard de référence. Pour cela, une gamme étalon a été réalisée avec une solution GSH de concentration de 1 mg.ml⁻¹ dans du NaCl 0,25 M, selon le tableau 5 :

Tableau 5 : Gamme étalon du glutathion réduit (GSH).

	Solution mère de GSH	NaCl 0.25 M	HCl 1M, EDTA 4 mM	Solution de DTNB	Volume final
Echantillons à analyser	-	150 µl	150 µl	4.2 ml	4.5 ml
Blanc	-	150 µl	150 µl	4.2 ml	4.5 ml
Standard 20	20 µl	130 µl	150 µl	4.2 ml	4.5 ml
Standard 40	40 µl	110 µl	150 µl	4.2 ml	4.5 ml
Standard 80	80 µl	70 µl	150 µl	4.2 ml	4.5 ml
Incubation à température ambiante pendant 5 minutes					
Lecture de densité optique à 412 nm					

Détermination quantitative du contenu en métallothionéines : Pour quantifier le contenu en métallothionéines, on extrapole les valeurs obtenues à partir des échantillons étudiés sur la courbe de référence de GSH. En considérant les caractéristiques moléculaires de

la métallothionéine et le volume final de la réaction avec le DTNB, la quantité des métallothionéines exprimée en $\mu\text{g.mg}^{-1}$ de protéine est donnée par la formule suivante:

$$\text{Quantité en } \mu\text{g MTs. mg}^{-1} \text{ P} = (\text{DO412} * 7328 * \text{dilution}) / (\text{Pente} * 20 * 1000 * \text{mg de Protéines})$$

DO 412 : densité optique de la fraction purifiée en métallothionéines,

7328 : poids moléculaire en Dalton d'une molécule de métallothionéines,

Pente : pente de la courbe gamme GSH,

23 : nombre de résidus cystéines d'une molécule de métallothionéines chez *Mytilus galloprovincialis*.

Ces méthodes de dosage sont des techniques de cinétique enzymatique utilisant la variation de la densité optique du milieu réactionnel pour le calcul des activités. Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford et *al.* (1976) à un maximum d'absorption de 595 nm. La quantité de protéines est ensuite déterminée en se référant à une gamme d'albumine sérique de bovin (BSA).

8. Evaluation des cassures d'ADN : le test des comètes

La technique de l'essai comet est microélectrophorèse de noyaux de cellules d'hémolymphes isolées sur gel d'agarose en conditions alcalines. A pH=13, le test permet de révéler les dommages simple et double brins et les sites alcali-labiles. Deux étapes sont considérées comme critiques. La première est l'étape de l'obtention des suspensions cellulaires d'hémocytes qui nécessite des précautions lors de la manipulation pour éviter la formation des agrégats cellulaires ou l'éclatement des membranes cellulaires. La deuxième étape critique est celle de lyse des matrices extracellulaires et de la membrane nucléaire. Le protocole se déroule comme suit :

Préparation des lames : des lames de microscopes sont couvertes d'une couche d'agarose normal à haut point de fusion à 0.5% préparé dans du tampon PBS. Les lames sont laissées toute une nuit à l'air libre pour permettre la polymérisation du gel.

Inclusion des cellules : un gel d'agarose à bas point de fusion à 0.5% dans du PBS est maintenu en surfusion dans un bain marie à 37°C. Les échantillons des hémocytes congelés dans une solution de stockage (RPMI+SVF+DMSO) sont décongelés rapidement à

température ambiante. 30 µl de cette suspension cellulaire est ensuite mélangé avec 225 µl de cet agarose.

85 µl de ce mélange est déposé sur une lame pré-couverte d'agarose, une lamelle couvre cette suspension et la lame est maintenue sur un lit de glace pour permettre la polymérisation de la deuxième couche d'agarose. Une troisième couche d'agarose à faible point de fusion est ajoutée et puis laissée solidifier (cette troisième couche permet de protéger la deuxième couche pour éviter son arrachement).

Lyse cellulaire : à partir de cette étape, tout le reste du protocole se déroule à l'obscurité pour éviter d'induire des dommages à l'ADN lié aux rayonnements.

Après 10 de polymérisation de la 3^{ème} couche d'agarose, la lamelle est retirée avec précaution et la lame est plongée dans une cuve contenant un tampon de lyse (dont la composition est résumée dans le tableau) glacé à pH 10. Cette étape dure 1h.

Tableau 6 : Composition du tampon de lyse.

Composant	Concentration	Rôle
NaCl	2.5 M	Dégradation des protéines
Tris base	0.01 M	Assure les conditions alcalines
Na ₂ EDTA	0.1 M	Inhibition des nucléases en complexant les cofacteurs métalliques
DMSO	10%	Antioxydant
N-sarcosinate	1%	Détergents assurant la
Triton X100	1%	destruction des membranes cellulaire et nucléaires

Déroulement de l'ADN : Les lames sont sorties de la cuve de lyse et elles sont installées dans une cuve à électrophorèse horizontale et sont immergées par le tampon d'électrophorèse (NaOH 0.03 M ; EDTA 0.001 M ; pH13) pendant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité.

Electrophorèse : l'électrophorèse est réalisée sous un champ électrique de 23V pendant 20 minutes. L'ADN chargé négativement migre vers l'anode. Les fragments libres se détachent du nucléotide et forment les figures caractéristiques des comètes.

Neutralisation : à la fin de l'électrophorèse, les lames sont sortie de la cuve électrophorétique, elles sont rincées 3 fois avec un tampon de neutralisation pendant 5

minutes chaque fois. Cette étape permet de rétablir l'appariement de l'ADN en double brins, ce qui permet ultérieurement la fixation du fluorochrome (Gel Red), agent intercalant, utilisé pour la lecture des lames.

Déshydratation et conservation : les lames sont déshydratées au moins 15 minutes dans l'éthanol absolu puis séchées à l'air libre. Cette étape permet de conserver les lames jusqu'à l'étape de lecture.

Lecture des lames : les lames sont colorées avec 70 µl de Gel Red au 1/10000 et couvertes d'une lamelle 22 x 22 mm, pendant au moins 1h à 4°C. Elles sont observées à un grossissement x 400 sous un microscope à épifluorescence équipé d'une caméra monochrome. Les cellules sont traitées individuellement à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image Komet. Cinquante cellules par lames sont comptées et 2 lames pour chaque échantillon. Après avoir vérifié la cohérence entre les différents paramètres mesurés, les résultats ont tous été exprimés par l'OTM.

9. Détermination de la fréquence des micronoyaux

Les micronoyaux sont de petits corps contenant de l'ADN qui peuvent être présents près du noyau de la cellule à l'interphase, résultant à la fois d'une cassure des chromosomes et d'un mauvais fonctionnement du fuseau.

Le type de mutations qui pourraient contribuer à la production de micronoyaux inclut :

- ✓ Des mutations des protéines du kinétochore, des centromères et de l'appareil du fuseau qui peuvent conduire à une distribution inégale des chromosomes ou à une perte du chromosome entier à l'anaphase,
- ✓ Des ruptures non réparées du brin d'ADN induites par des agents génotoxiques de l'environnement et endogènes, ce qui pourrait induire des fragments de chromosomes acentriques.

Les études montrent que l'apparition de micronoyaux peut fournir une information sur l'altération génétique accumulée au cours de l'évolution de la vie des cellules même lors de courtes phases de contamination. Ces considérations montrent l'aptitude de ce test à suivre, de façon intégrée dans le temps, l'étendue de l'altération génétique chez les organismes marins.

Le protocole suivant a été établi afin d'estimer la fréquence des micronoyaux dans les cellules de la glande digestive.

Le test MN a été réalisé sur des cellules de la glande digestive selon la méthode décrite par Bolognesi et al. (1999).

Préparation de la suspension cellulaire : La glande digestive est prélevée et les cellules sont isolées par digestion enzymatique avec une solution de Dispase (Boehringer Mannheim, Allemagne), $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ dans la solution modifiée (20‰) équilibrée par une solution Hanks pendant 10 minutes à 37°C . La suspension cellulaire obtenue par filtration est centrifugée à 1000 rpm pendant 10 minutes.

Préparation des lames : Les aliquotes de culot cellulaire sont fixés dans le méthanol : acide acétique (3 :1) pendant 20 minutes, étalés sur les lames, séchés et colorés avec du Giemsa 3%. Les lames sont par la suite codées et comptées.

Observation des lames : pour chaque échantillon, deux mille cellules avec un cytoplasme en bon état sont comptées sous immersion à huile à un grossissement de 1000x. Les critères suivants doivent être réunis lors du comptage : seules les cellules intactes doivent être considérées, la structure de la chromatine et l'intensité de couleur doivent être équivalentes à celle du noyau principal, les MN doivent être sur le même plan optique que le noyau principal, doivent être ronds ou ovales, et ne doivent pas être fragmentés (afin d'exclure les petites particules colorées et les cellules apoptotiques).

10. Evaluation de la stabilité des membranes lysosomales : Test de rétention du rouge neutre

Le rouge neutre est un colorant lipophile qui traverse librement la membrane cellulaire. A l'intérieur des cellules, le composé est piégé par protonisation dans les lysosomes et est accumulé dans ces organelles où il peut être visualisé par un microscope optique. Le degré d'emprisonnement de ce marqueur lysosomotrope dépend du pH du lysosome autant que de l'efficacité de la pompe à protons associée à la membrane (Segien, 1983).

Le test de rétention du rouge neutre est sensible aux classes majeures de polluants chimiques (Lohse, 1990). Le protocole suivant a été spécialement adapté pour être utilisé sur les moules.

Préparation de la suspension cellulaire : choisir une dizaine de moules de taille équivalente, sur la face ventrale (le côté d'où sort le byssus), insérer la lame de scalpel ou la pointe des ciseaux de manière à écarter légèrement les deux valves, vider le liquide intervalvaire, insérer la seringue dans le muscle adducteur et aspirer 0.2 ml d'hémolymphe dans un volume égal d'une solution saline (Hepes 20 mM ; NaCl 436 mM ; MgSO₄ 53 Mm ; KCl 10 mM ; CaCl₂ 10 mM), vider doucement le contenu de la seringue dans microtube de 1.5 ml.

Préparation des lames : déposer au centre d'une lame 50µl de la suspension d'hémocytes, laisser adhérer les cellules sur la lame dans une chambre humide pendant 15 minutes puis ajouter le même volume de rouge neutre (ceci constitue le temps T0).

Observation des lames : se fait au grossissement x 200 puis x 400, la lecture se fait toutes les 15 minutes pendant la première heure puis toutes les 30 minutes, en remettant rapidement les lames dans la chambre humide entre chaque lecture pour éviter le dessèchement. Le dernier temps de lecture noté + est retenu comme le temps de rétention maximal.

11. Dosage immunologique des protéines de résistance aux multixénobiotiques

Principe : Les protéines apparentées aux P-glycoprotéines dont les MXR ont été recherchée par immunochimie directement sur une membrane de nitrocellulose (slots Blot) (Towbin et al., 1979) à l'aide d'un anticorps monoclonal primaire (Anti-P glycoprotéine C219) reconnaissant toute les protéines apparentées dont la séquence génique est connue (George et al., 1990). Un deuxième anticorps (Anti-Mousse IgG) spécifique à l'anticorps C219 a été ajouté.

Préparation des extraits protéiques : les branchies ont été homogénéisés dans un tampon d'extraction (Tris 0.5M ; Sucrose 0.5M ; KCl 0.15M ; β-mercaptoéthanol 1.4M) contenant des anti-protéases (Leupeptine 2µM ; Aprotinin 3.2µM ; PMSF 2 mM) et un détergent triton X-100 (0.1% du volume final) afin de solubiliser les protéines membranaires. La partie soluble a été alors séparée par centrifugation 6000g à 4°C pendant 12 minutes. La concentration des protéines a été mesurée par la méthode de Bradford (1976).

Dépôt sur membrane et révélation : La première étape consiste à déposer 2 µg de protéines dans chaque puits. Après cette étape de dépôt, on procède à la saturation de la membrane par une solution TBS-BSA 1% pendant une heure à 37°C. Un lavage avec du TBS est obligatoire pour éliminer le BSA.

Incuber la membrane dans une solution contenant l'anticorps monoclonal Anti-P glycoprotéine C219 (1 µg.mL⁻¹) pendant une heure à température ambiante. Une série de lavages successives avec du TBS-Tween 20. La troisième incubation dure également une heure avec l'anticorps secondaire Anti-mouse IgG dilué au 1/1000 dans une solution TBS-BSA 0,5%.

La révélation se déroule à température ambiante en trempant la membrane dans un tampon à pH 9,5 contenant 100 µg.mL⁻¹ de 5'-bromo-chloro-indolyl-phosphate (BCIP) (substrat) qui en présence de la phosphatase va subir une oxydation et donnera un précipité de couleur bleu/violet le nitro blue tetrazolium (NBT).

Après une demi-heure de lavages, les slots sont séchés à l'air libre et gardé à 4°C jusqu'à lecture.

L'acquisition des slots a été réalisé par un Multi-Imager de type Chemi XRS Gel Documentation qui permet par la suite de mesurer l'absorbance en se référant une gamme réalisée par une lignée de cellules tumorales mammaires « Michigan Cancer Foundation » ou les cellules MCF⁺ (figure 23).

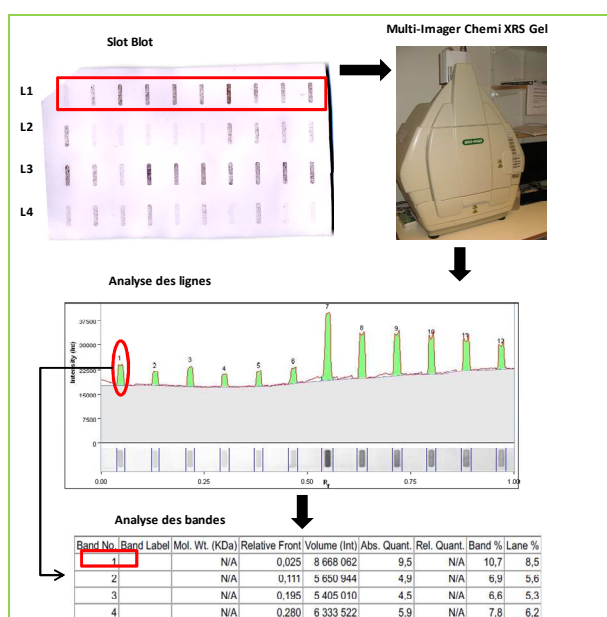


Figure 23 : Acquisition des slots par Multi-Imager et détection des bandes par absorbance.

E. Analyses chimiques

Comme pour les dosages biochimiques, à chaque échantillonnage les glandes digestives des moules sont prélevées, égouttées, lavées avec de l'eau ultra pure, puis mis en pool de 3 et conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

Cinq pools ont servi pour le dosage de quatre métaux traces les plus répandus dans la lagune de Bizerte notamment le Cuivre (Cu), le Cadmium (Cd), le Zinc (Zn) et le Nickel (Ni). Trois pools ont servi pour doser 13 HAPs avec une chromatographie gazeuse couplé à un à un spectromètre de masse (GC-MS). Et les trois derniers pools ont servi pour le dosage de 12 composés de PCB par chromatographie gazeuse couplé à un détecteur à capture d'électron (GC-ECD).

I. Détermination des teneurs en métaux traces

La technique utilisée pour le dosage des métaux (Cd, Cu, Zn et Ni) est la spectrométrie d'absorption atomique (SAA). Avant chaque dosage, les échantillons à analyser subissent une digestion par l'acide nitrique à 80°C (Amiard et al., 1987), pendant 24 heures.

Dosage de l'élément cadmium (Cd) et l'élément plomb (Ni) : Les concentrations en cadmium et en nickel ont été déterminées par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) avec correction Zeeman (SAA type VARIAN 220 Zeeman) suivant la méthode de l'UNEP/IAEA/FAO (1994). L'appareil est équipé d'un passeur automatique d'échantillons (VARIAN AA 400), l'atomisation du métal se fait dans un four graphite pyrolytique (modèle GTA96).

Dosage de l'élément zinc (Zn), cuivre (Cu) : La détermination des concentrations en Zn, Cu a été effectuée par spectrophotométrie d'absorption atomique avec flamme (SAAF, flamme : air-acétylène, Varian AA20) selon la méthode de l'UNEP/IAEA/FAO, (1984). La correction du bruit de fond spectral pour les longueurs d'onde spécifiques (λ Zn = 213,9 nm, λ Cu = 324,8 nm) s'opère grâce à une lampe de deutérium.

Assurance qualité des analyses des métaux : Le contrôle de la qualité est appliqué à toutes les analyses des métaux. Pour chaque métal analysé, un blanc standard et deux matériaux certifiés (IAEA-407/IAEA-437 et IAEA-405/IAEA-433) de concentration connue sont inclus dans les séries analytiques d'une façon systématique. Les matériaux de référence

représentent des outils indispensables dont les laboratoires disposent pour contrôler et évaluer la performance de leurs procédures d'analyses chimiques.

Les échantillons de contrôle sont traités dans les mêmes conditions analytiques que les échantillons à analyser.

II. Détermination des teneurs Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Un nombre de 13 HAPs a été analysé dans les glandes digestives des moules prélevées de la lagune de Bizerte. Le dosage des HAPs, hydrophobes mais solubles dans les graisses ou les phases lipidiques, a été réalisé par saponification à chaud en présence d'hydroxyde de potassium éthanolique (Baumard et al., 1997).

Un HP GC (Hewlett-Packard, Palo Alto, Californie, USA) équipé d'un injecteur split / splitless a été utilisé. Les HAPs ont été quantifiés par rapport aux HAPs perdeutérés (Quilliam et al., 1994 ; Baumard et Budzinski 1997). Les facteurs de réponse des différents composés ont été mesurés par injection d'un standard SRM 2260 (24 hydrocarbures aromatiques dans le toluène) (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA) avec la même solution contenant les HAPs perdeutérés que celui utilisé pour le spiking de la glande digestive de la moule. Les limites de détection pour les congénères des HAPs étaient d'environ 50 µg. g⁻¹.

III. Analyse des Polychlorobiphényles

Douze congénères de PCB (PCB- 18, 28, 31, 52, 44, 101, 149, 118, 153, 138, 180 et 194) ont été analysés selon la méthode de Guo et al. (2008). Les glandes digestives (10 g) ont été lyophilisées au Soxhlet avec du n- hexane : acétone (4:1 , v / v) pendant 16 heures à une vitesse de cinq cycles par heure. L'extrait a été concentré à l'évaporateur rotatif. Un aliquote de 1 ml a été utilisé pour la détermination gravimétrique de la teneur en lipides. Les lipides restants, ont été éliminés par un traitement avec de l'acide sulfurique concentré (4 x 10 ml) après avoir ajouté le BDE- 77 comme étalon interne. En outre, le nettoyage a été effectué sur une colonne (40 x 0,5 cm ID) saturée de 5 g de Florisil activé et surmonté d' 1 g de sulfate de sodium anhydre. L'extrait a été élué avec 50 ml de dichlorométhane et de n -hexane (1:9 , v / v). L'éluat a été finalement concentré dans un Kuderna -Danish à 0,5 ml.

L'analyse des PCB a été réalisée par la suite sur un chromatographe en phase gazeuse (Agilent Model 6890) équipé d'un détecteur à capture d'électrons ^{63}Ni (GC -ECD). Au total, 2 μl d'extrait a été injecté dans une colonne capillaire PTE- 5 (30 m x 0,32 mm de diamètre intérieur, 0,32 épaisseur du film), en utilisant l'hydrogène (H_2) comme gaz porteur avec un débit $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. L'analyse quantitative et qualitative des PCB ont été effectuées par rapport à une norme externe. Les composés analysés par GC -ECD ont été confirmés dans chaque échantillon d'extrait par GC- MS en utilisant une trace instrument MS Finningan, travaillant à impact électronique (EI) en mode d'ionisation, exploité par Xcalibur Software, équipé d'une colonne capillaire DB-5 ms (30 m $\times$ 0,25 mm de diamètre, épaisseur de film 0,25 mm).

F. Traitement des résultats

I. Calcul de l'indice IBR

L'indice « Integrated Response Biomarkers » (IBR) est une méthode pour combiner toutes les réponses des biomarqueurs mesurés en un indice (IBR ; Beliaeff et Burgeot, 2002). La méthode appliquée ici est celle de Beliaeff et Burgeot, 2002 modifiée par Devin et al. (2013). La matrice des valeurs IBR, permet le calcul de la médiane pour chaque site d'étude permettant ainsi la comparaison inter-sites des valeurs IBR.

Les différentes étapes du calcul de l'IBR sont les suivantes :

- ✓ Pour chacun des n biomarqueurs composant l'indice, calcul des valeurs moyennes X_i ($i = 1$ à n) par lot expérimental (par exemple un lot = un couple « date x station »), s'il ne s'agit pas déjà de valeurs individuelles issues de l'analyse de pools ;
- ✓ Calcul de la moyenne générale m et de l'écart type s de l'ensemble des X_i ;
- ✓ Standardisation des X_i selon la formule : $Y_i = (X_i - m) / s$
- ✓ Prise en compte du type de réponse de chaque biomarqueur individuel, en définissant $Z_i = Y_i$ dans le cas d'une activation (ou d'une augmentation de la taille des compartiments et contenus cellulaires dans le cas des paramètres stéréologiques) et $Z_i = -Y_i$ dans le cas d'inhibitions (ou de diminutions d'un paramètre) ;
- ✓ Calcul des scores individuels S_i des biomarqueurs par la formule : $S_i = Z_i + |\min|$ où $|\min|$ représente la valeur absolue du Z_i minimal parmi tous les lots, les S_i ainsi obtenus sont tous positifs ;
- ✓ Représentation des résultats sur des diagrammes en radar (un par lot), dont les coordonnées correspondent aux différents S_i ;

- ✓ Calcul des aires individuelles définies par la connexion des positions de chaque score individuel S_i avec le suivant S_{i+1} ;

Chaque aire A_i est donnée par la formule : $A_i = S_i / 2 \cdot \sin \beta (S_i \cos \beta + S_{i+1} \sin \beta)$ où $\beta = \arctan [(S_{i+1} \sin \alpha) / (S_i - S_{i+1} \cos \alpha)]$ où $\alpha = 2\pi / n$ radians et $S_{n+1} = S_1$

- ✓ Le calcul des A_i est proposée selon la formule suivante : $A_i = \frac{1}{2} \sin (2\pi / n) \cdot S_1 \cdot S_2$
- ✓ Calcul de l'IBR selon la formule : $IBR = \sum_{(i=1 \text{ à } n)} A_i$

II. Analyses statistiques

Les données expérimentales ont été initialement testées pour la normalité et l'homogénéité de la variance, afin de répondre aux exigences statistiques. Les données ont été exprimées en moyenne $\pm$ écart-type (SD). L'analyse statistique des données a été effectuée en utilisant une analyse de variance (ANOVA) et le test de Duncan pour la comparaison de plage multiple ($p < 0,05$) a été considéré comme significatif. Des lettres différentes (a, b) montre des différences significatives entre les groupes. Le coefficient de corrélation de Pearson a également été calculé afin d'étudier les relations entre les données chimiques et biochimiques. Tous les tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel Statistica 6 (StatSoft, États-Unis).

Résultats et Discussion

D'une manière générale, la surveillance environnementale ou écotoxicologique dans un écosystème marin est fondée sur des bio-indicateurs. Cette démarche fait partie de l'évaluation de la qualité environnementale. Dans ce travail deux approches ont été appliquées pour évaluer l'exposition et les effets biologiques des contaminants environnementaux et celui de l'élévation de la température chez la moule *Mytilus galloprovincialis* vivant dans la lagune de Bizerte. Ce chapitre résultats et discussion s'articule en deux e en deux parties :

❖ La première partie concerne les résultats issus d'un modèle expérimental, dans lequel *M.galloprovincialis* provenant de la lagune de Bizerte a été exposée dans des conditions expérimentales à une dose subléthale de benzo[a]pyrène ($19 \mu\text{g.l}^{-1}$) et à des températures croissantes allant de 18 à 26 °C. La variation **des enzymes de biotransformation** au niveau de la glande digestive de la moule (Benzopyrène hydroxylase (BPH) ;enzyme de phase I de biotransformation et la glutathion S-transférase (GST) ; enzyme de phase II de biotransformation), les **biomarqueurs de stress oxydatif** notamment la catalase (CAT) et le taux des malondialdéhydes (MDA), du **biomarqueur de neurotoxicité** évalué par la variation de l'acétylcholinestérase (AChE) ainsi que le niveaux de **génotoxicité** évalué par le test des micronoyaux. Tous ces paramètres ont été évalués chez la moule exposée aux différentes conditions expérimentales. Les résultats de la variation des biomarqueurs étudié sont résumés dans la première partie de ce chapitre. Les résultats issus de ce travail ont été valorisés par un premier article : “*Increased Temperatures Affect Oxidative Stress Markers and Detoxification Response to Benzo[a]Pyrene Exposure in Mussel Mytilus galloprovincialis*. Arch Environ Contam Toxicol. DOI 10.1007/s00244-012-9790-3”.

❖ La deuxième partie présente les résultats issus d'une étude menée *in situ* pendant deux cycles annuels chez la moule *Mytilus galloprovincialis* prélevée de deux sites dans la lagune de Bizerte (site 1 : Menzel Abdelrahmen et site 2 : la baie des carrières). Les résultats montrent les variations saisonnières des **paramètres physicochimiques** de l'eau, la **bioaccumulation** des contaminants chimiques (HAPs, PCBs et métaux traces), et l'évolution mensuelle des **indices physiologiques** et d'une batterie de **biomarqueurs**. D'une manière générale, l'ensemble des résultats reflètent des variations intersites et saisonnières significatives des différents paramètres mesurés. Cette variation spatio-temporelle de la réponse des biomarqueurs chez la moule de Bizerte peut être expliquée par la combinaison de deux facteurs majeurs ; un facteur abiotique qui englobe le changement des conditions environnementales et le niveau de contamination chimique sur chaque site étudié dans la lagune et un deuxième

facteur biotique qui concerne l'état physiologique et le stade de reproduction de la moule sur chacun des sites étudiés. En outre, la fluctuation flagrante des paramètres physiologiques, chimiques et biologiques liée à la variation des facteurs environnementaux de la lagune de Bizerte et à l'élévation de la température pendant la période estivale a fait l'objet d'un deuxième article : *“Effects of increasing temperature on biomarkers responses and accumulation of hazardous substances in rope mussels (Mytilus galloprovincialis) from the Bizerte Lagoon. Environ Sci Pollut Res. DOI 10.1007/s11356-014-2540-5”*.

A. Expérimentations au laboratoire

Evaluation de l'effet combiné de l'élévation de la température et d'une dose subléthale du B[a]P sur les biomarqueurs de stress oxydatif chez *Mytilus galloprovincialis*

Dans cette partie, les expériences effectuées dans des conditions expérimentales nous ont permis d'évaluer chez la moule *Mytilus galloprovincialis* la réponse des biomarqueurs de stress oxydatif (CAT et MDA), de génotoxicité (MN) et de neurotoxicité (AChE) suite à une exposition de sept jours à une dose subléthale de Benzo[a]pyrène (B[a]P) de $19 \mu\text{g.l}^{-1}$ (75 nmoles) et à un gradient croissant de température (18, 20, 22, 24 et 26°C). Le métabolisme de détoxification a été évalué par la mesure des activités enzymatiques ; la BPH comme enzyme de phase I de biotransformation et la GST comme enzyme de phase II de conjugaison. Les individus qui ont servi de témoin lors de cette étude étaient exposés uniquement au même gradient de température et à 0,005% de diméthyle sulfoxyde (DMSO).

Les concentrations de B[a]P ont été mesurées dans les glandes digestives de *Mytilus galloprovincialis* après sept jours d'exposition au B[a]P couplé à un gradient croissant de température (18, 20, 22, 24 et 26°C) (Tableau 7). Chez les individus témoins (exposés uniquement aux différentes températures et au DMSO), les valeurs sont inférieures aux limites de détections. Chez les animaux exposés au B[a]P, les résultats montrent une augmentation de la bioaccumulation du B[a]P au niveau de la glande digestive des moules exposées à 24 et 26°C respectivement avec des valeurs de $28,07 \pm 2,11$ et $31,98 \pm 2,73 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ dw}$. Chez les animaux exposés à une température de 18°C la bioaccumulation du B[a]P est significativement faible avec une valeur de $21,52 \pm 1,85 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ dw}$.

Tableau 7 : Concentration du B[a]P dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* exposée à un gradient croissant de température (18, 20, 22, 24 et 26°C) et à $19 \mu\text{g/l}$ animal de B[a]P.

	18° C	20° C	22° C	24° C	26° C
Témoins	ND	ND	ND	ND	ND
B[a]P	$21,52 \pm 1,85^a$	$21,36 \pm 1,60^a$	$23,95 \pm 2,66^a$	$28,07 \pm 2,11^{ab}$	$31,98 \pm 2,73^{ab}$

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD, les lettres a et b indiquent une différence statistique significative (ANOVA, et Duncan) : a $p < 0,05$; b $p < 0,05 (n=10)$.

1. Mesure des enzymes de biotransformation

La figure 24, a illustre la variation de l'activité enzymatique de la BPH au niveau de la glande digestive de *M. galloprovincialis* après une exposition de sept jours à une de concentration de 75 nmoles de B[a]P et à un gradient croissant de température. Les résultats montrent que l'activité de la BPH est significativement plus élevée ($p < 0,05$) chez les animaux exposés aux températures 18, 20 et 22°C et en présence de B[a]P par rapport au témoin (exposé uniquement à un gradient de température). Aucune différence significative de l'activité de la BPH n'a été distingué entre les individus témoins et ceux exposés au B[a]P à 24 et 26 °C.

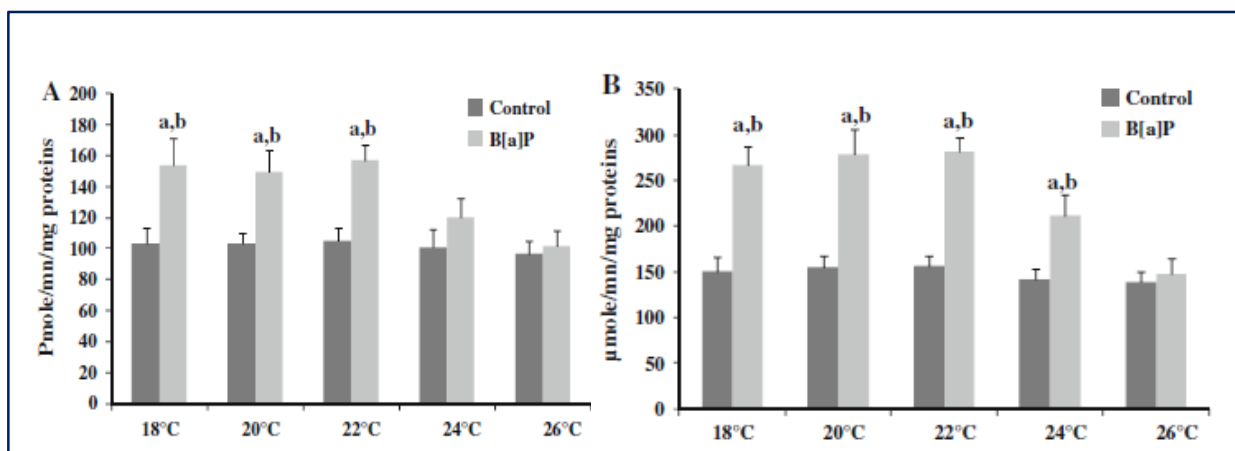


Figure 24 : Variation des enzymes de biotransformation au niveau de la glande digestive des moules *Mytilus galloprovincialis* suite à l'exposition à une dose subléthale de B[a]P ($19\mu\text{g.l}^{-1}$) et à un gradient croissant de température (18, 20, 22, 24 et 26°C) pendant sept jours. (A) variation de l'activité enzymatique Benzopyrène hydroxylase (BPH) ; (B) variation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD, les lettres a et b indiquent une différence statistique significative (ANOVA, et Duncan) : a $p < 0,05$; b $p < 0,05$ ($n=10$).

Ce travail montre que l'exposition des moules au B[a]P couplée au gradient de température pendant sept jours a entraîné une accumulation croissante de ce composé aromatique dans les tissus de la glande digestive. En effet, un maximum de bioaccumulation a été atteint chez les animaux exposés à 26°C. Ce résultat suggère que l'élévation de la température (24 et 26°C) provoque simultanément une augmentation de la bioaccumulation du B[a]P au niveau de la glande digestive de *M. galloprovincialis* et une diminution du mécanisme de phase I de biotransformation. Ceci affirme l'effet négatif de l'élévation de la température sur la capacité de biodégradation des HAPs chez les moules dans des conditions expérimentales.

La figure 24, b présente les résultats de l'activité enzymatique de la GST au niveau de la glande digestive de *M. galloprovincialis* exposée pendant sept jours à une dose subléthale de B[a]P (75 nmoles) et à un gradient croissant de température. Les résultats montrent une induction significative ($p < 0,05$) de l'activité de la GST chez les animaux exposés au B[a]P et aux températures (18, 20, 22 et 24°C) par rapport aux témoins exposés uniquement au gradient de température. A 26°C, l'activité de la GST est significativement ($p < 0,05$) plus faible chez les moules exposées au B[a]P et aucune différence significative n'a été signalé avec le groupe témoin exposé au même gradient de température (26°C). Chez les groupes témoins, les résultats montrent que l'élévation de la température n'a aucun effet significatif sur cette activité enzymatique en absence du B[a]P. L'exposition des moules à une dose subléthale de B[a]P et aux températures allant de 18 à 24°C induit la GST.

2. Les biomarqueurs de stress oxydatif

Le stress oxydatif chez la moule *M. galloprovincialis* exposée pendant sept jours à 75 nmoles de B[a]P et à un gradient croissant de température (18, 20, 22, 24 et 26 °C) a été évalué par la mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) et le taux d'accumulation du malondialdéhyde (MDA) au niveau de la glande digestive et dont les résultats sont présentés dans la figure 25 (a et b).

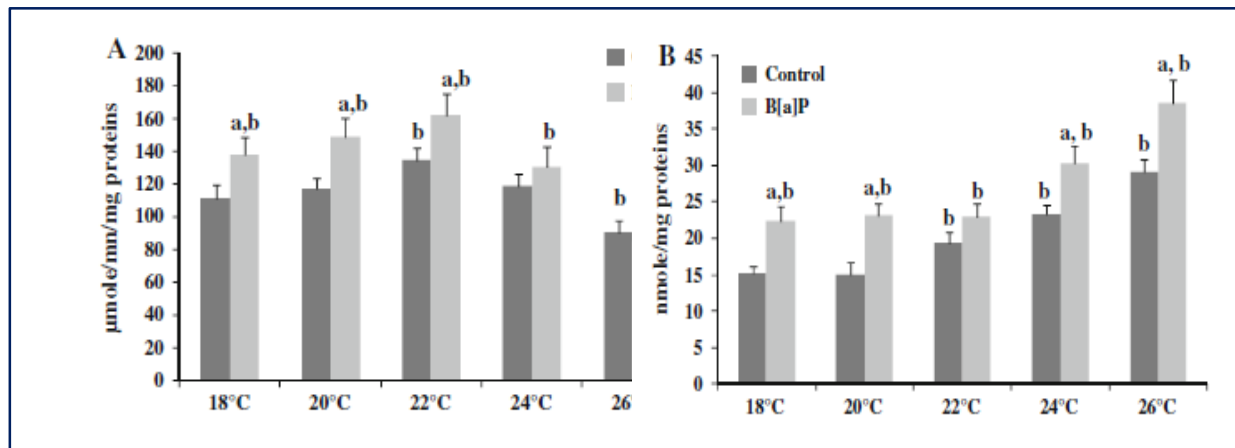


Figure 25 : Réponse des biomarqueurs de stress oxydatif au niveau de la glande digestive des moules *Mytilus galloprovincialis* suite à l'exposition à une dose subléthale de B[a]P ($19 \mu\text{g.l}^{-1}$) et à un gradient croissant de température (18, 20, 22, 24 et 26°C) pendant sept jours. **(A)** variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) ; **(B)** variation du taux d'accumulation des malondialdéhydes (MDA). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD, les lettres a et b indiquent une différence statistique significative (ANOVA, et Duncan) : a $p < 0,05$; b $p < 0,05$ ($n=10$).

Les résultats obtenus montrent que l'activité de la catalase est induite au niveau de la glande digestive des moules exposées à un gradient de température couplé à une dose subléthale de B[a]P en comparaison avec les moules qui sont exposées uniquement à un gradient de température. La peroxydation lipidique évaluée par la mesure du taux d'accumulation des MDA est significativement plus élevée chez les organismes exposés au B[a]P

Le maximum d'induction de l'activité CAT (Figure 25, a) a été enregistré chez les animaux exposés au B[a]P à une température de 22°C avec une valeur de $162,61 \pm 12,93 \mu\text{mole.min.mg}^{-1}$ de protéines. La valeur la plus basse de l'activité enzymatique de la CAT ($85,69 \pm 7,43 \mu\text{mole.min.mg}^{-1}$ de protéines) a été identifiée chez les moules exposées au B[a]P à 26°C. Le taux d'accumulation du MDA au niveau de la glande digestive de *M. galloprovincialis* semble être dépendant de la température et il est significativement ($p < 0,05$) plus élevé chez les animaux exposés au B[a]P que chez les moules exposées uniquement au gradient de température. Le maximum d'accumulation du MDA ($38,62 \pm 3,13 \text{ nmole.mg}^{-1}$) a été observé chez les animaux exposés au B[a]P à 26°C après sept jours d'exposition.

3. Evaluation de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

La réponse de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) au niveau de la glande digestive de moule *M. galloprovincialis* exposée pendant sept jours à un gradient croissant de température allant de 18 à 26°C et à 75 nmoles de B[a]P est représenté dans la figure 26.

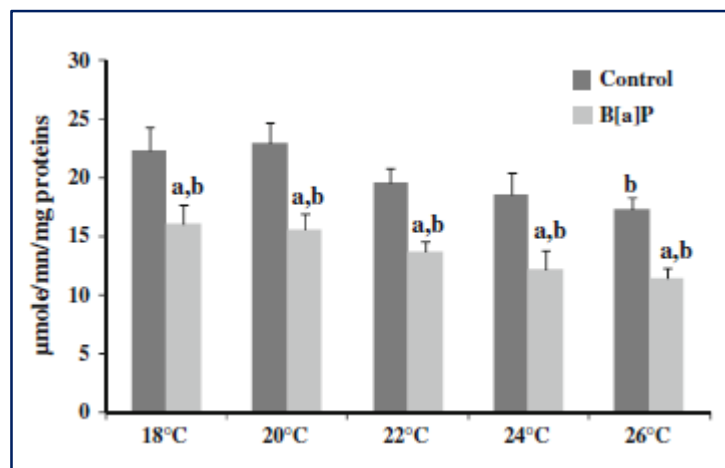


Figure 26 : Evaluation de l'effet d'une dose subléthale de B[a]P et de l'élévation de la température sur l'activité acétylcholinestérase au niveau de la glande digestive de moule *Mytilus galloprovincialis* après sept jours d'exposition. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD, les lettres a et b indiquent une différence statistique significative (ANOVA, et Duncan) : a $p < 0,05$; b $p < 0,05$ ($n = 10$).

Le résultat montre que l'activité AChE est significativement ($p<0,05$) inhibée chez les individus exposés au B[a]P pour toutes les températures testées. La plus forte inhibition de l'activité AChE a été enregistrée chez les moules exposées au B[a]P à 26°C.

L'acétylcholinestérase est une enzyme qui joue un rôle important dans la transmission de l'influx nerveux et elle est fortement sensible à la variation des facteurs biotiques et abiotiques (Dimitridis et al., 2012 ; Greco et al., 2011). Entre autres, des travaux antérieurs ont prouvé qu'une exposition aiguë des moules au B[a]P provoque une inhibition de l'activité AChE (Akcha et al., 2000 ; Banni et al., 2010). Nos résultats sont dans la même optique, en effet on a observé une forte inhibition de l'activité AChE chez les moules après sept jours d'exposition à 75 nmoles de B[a]P et à un gradient croissant de température. Toutefois l'activité AChE chez les individus témoins exposés uniquement au gradient de température n'est inhibée qu'à 26°C. Ce résultat plaide en faveur d'un effet inhibiteur de l'activité AChE par les hydrocarbures aromatiques polycycliques et notamment le B[a]P.

4. La fréquence des micronoyaux (MN) : biomarqueur de génotoxicité

La génotoxicité est une atteinte du matériel génétique par un agent chimique ou physique. La génotoxicité est largement utilisé pour mesurer l'impact de la contamination du milieu, sur des espèces sentinelles en milieu marin (Parry et al., 1976). Dans ce contexte nous avons étudié la fréquence des micronoyaux en tant que biomarqueur de génotoxicité dans les cellules de la glande digestive de moule exposée pendant sept jours au B[a]P et à un gradient croissant de température est représentée dans la Figure 27. Le résultat montre une forte élévation de la fréquence des MN au niveau des cellules des individus exposés au B[a]P, cette augmentation est significative ($p<0,05$) pour toutes les températures testées. Chez les deux groupes étudiés (individus exposés au B[a]P et individus témoins), le nombre le plus élevé de MN a été identifié à 26°C.

L'induction des MN au niveau de la glande digestive des moules montre que l'élévation de la température et l'exposition au B[a]P provoque des dommages chromosomiques même après une courte durée d'exposition.

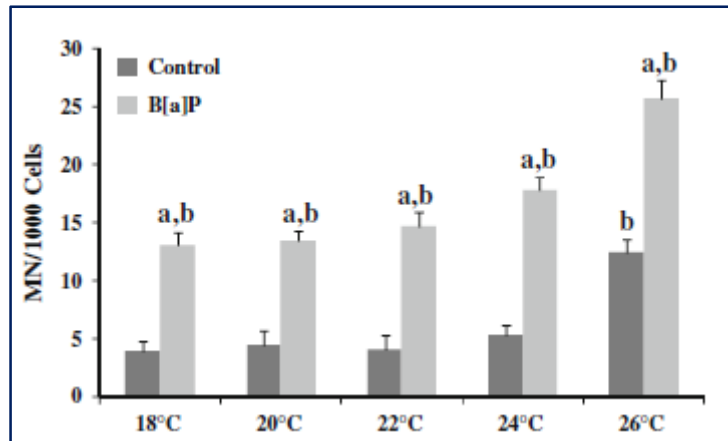


Figure 27 : fréquence des micronoyaux au niveau des cellules de la glande digestive des moules *Mytilus galloprovincialis* exposées pendant sept jours à une dose de B[a]P et à un gradient croissant de température (18, 20, 22, 24 et 26°C). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD, les lettres a et b indiquent une différence statistique significative (ANOVA, et Duncan) : a $p < 0,05$; b $p < 0,05$ (n=10).

Les différentes observations soulignent un effet toxique lié à l'exposition au B[a]P et à l'élévation de la température. Globalement, le stress thermique combiné avec une dose subléthale du B[a]P (75nmoles) provoque des altérations du fonctionnement biologique chez la moule *Mytilus galloprovincialis* qui se traduisent par l'induction des enzymes de biotransformation (cytotoxicité) ; notamment la BPH et la GST, une inhibition de l'activité acétylcholinestérase conduisant à état de neurotoxicité, et par des altérations génétique au niveau de l'ADN (génétoxicité).

Increased Temperatures Affect Oxidative Stress Markers and Detoxification Response to Benzo[a]Pyrene Exposure in Mussel *Mytilus galloprovincialis*

Naouel Kamel · Hajer Attig · Alessandro Dagnino · Hamadi Boussetta · Mohamed Banni

Received: 14 April 2012 / Accepted: 19 July 2012
  Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract The present research work was designed to study mussel's (*Mytilus galloprovincialis*) digestive gland biotransformation and detoxification responses to benzo[a]pyrene (B[a]P) exposure along with heat stress. Mussels were exposed to a sublethal dose of B[a]P [75 nM (19  g/L/animal)] + temperature gradient (18, 20, 22, 24 and 26  C) for 7 days. B[a]P hydroxylase (BPH) and glutathione-S-transferase (GST) activities were assessed in digestive gland tissues as phase I and phase II biotransformation parameters. Catalase (CAT) activity and malondialdehyde (MDA) were measured as potential biomarkers of oxidative stress and lipid peroxidation. The cholinergic system was evaluated using acetylcholinesterase (AChE) activity. DNA damage was assessed using micronuclei (MN) test. BPH and GST activities showed a decreasing trend in B[a]P-exposed animals at 24 and 26  C. CAT activity showed a bell-shaped response in B[a]P-exposed and in heat-stressed organisms at a maximum temperature of 22  C. AChE activity was significantly inhibited in response to B[a]P being more pronounced at a temperature of 26  C. MN in digestive gland cells suggest that B[a]P exposure induced significant DNA alteration with a maximum response in organisms coexposed to B[a]P and a temperature of 26  C. Biomarker data are further discussed in relation B[a]P accumulation in mussels digestive gland. These data should be carefully considered in

view of the biological effects of organic pollutants, particularly in organisms under the challenging effects of extreme temperature fluctuations.

Global warming is an emerging threat to ecosystems worldwide (Byrne 2012; Cebrian et al. 2011; Sylvestre et al. 2010). In intertidal habitats, marine organisms, such as mussels, can challenge and sustain seasonal variations in environmental temperature (Banni et al. 2011). Indeed, they can be exposed to extreme temperature fluctuations, with accompanying wide changes in body temperature, within a short period of time during the hot season (Sokolova 2004). Benzo[a]pyrene (B[a]P), a model polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compound, is classified as a potent carcinogen and/or mutagen (Phillips 1983; Shaw and Connell 1994). Sublethal amounts of B[a]P are commonly found in marine intertidal environments, especially after oil-spill accidents (Volodkovich and Belyaeva 1992).

Mytilus spp. have been used as indicator organisms in environmental-monitoring programmes (Narbonne et al. 1999; Banni et al. 2005, 2007) due to their wide distribution, sedentary lifestyle, tolerance to a large range of environmental conditions and the fact that they are filter feeders with low metabolism, which allows bioaccumulation of many chemicals in their tissues (Widdows et al. 2002). Most studies reported so far have been directed toward studying the effect of a single environmental stressor on mussels. However, for mussels from areas receiving mixed effluents from various sources, studies of the combined effect of two or more stressors would be more appropriate.

The evaluation of oxidative stress and antioxidant balance has been extensively studied in a plethora of marine bivalve tissues at transcriptomic (Farcy et al. 2009) and proteomic levels (Lockwood et al. 2010; Tomanek and Zuzow 2010;

N. Kamel · H. Attig · H. Boussetta · M. Banni ( )
Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology,
Higher Institute of Agronomy, ISA, Chott-Mariem, 4042 Sousse,
Tunisia
e-mail: m_banni@yahoo.fr

A. Dagnino
Department of Environmental and Life Sciences, University
of Piemonte Orientale Amedeo Avogadro, Via Bellini 25 G,
15100 Alessandria, Italy

Published online: 19 August 2012

 Springer

spectrometry (GC–MS) based on a protocol described by Baumard and Budzinski (1997). An HP gas chromatograph (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipped with a split/splitless injector was used. PAHs were quantified relative to perdeuterated PAHs (Quilliam et al. 1994; Baumard and Budzinski 1997). Response factors of the different compounds were measured by injecting a solution of standard reference material [SRM 2260 (24 aromatic hydrocarbons in toluene)] (NIST, Gaithersburg, MD), which was spiked with the same solution containing the perdeuterated PAHs as those used for spiking the digestive gland. The detection limit for B[a]P was approximately 50 pg/g for digestive gland tissues. Analytical confirmation of B[a]P at a concentration of 19 µg/L in reconstituted water was performed by GC–MS based on a protocol described by Chen et al. (2004). Briefly, B[a]P in water was extracted by sonication for 30 min with 250 mL dichloromethane (DCM) added to 250 mL water samples in 500 mL Erlenmeyer flasks with glass caps. The extraction mixture was kept still for 20 min to completely separate the DCM and the water. DCM samples (200 mL) were transferred into cylinder flasks and then rotary-evaporated to dryness at room temperature and negative pressure. Residues were dissolved with 1 mL higher purity-grade methanol and further processed with GC–MS analysis.

Biochemical Analysis

Before biochemical analysis, digestive glands were homogenised in phosphate buffer (0.1 M [pH 7.5]). The homogenate obtained was centrifuged at 100,000×g for microsomal fractions or 9,000×g for cytosolic fractions (S9). The quantities of proteins present in microsomal fractions or in S9 fraction were determined according to the Bradford (1979) method using Coomassie Blue reagent.

BPH activity was assessed in digestive gland microsomes on a microplate reader using the adapted fluorometric method of Michel et al. (1993). After incubation with B[a]P, the reaction was stopped by the addition of 10 % Triton X-100. Fluorescence of the sample was obtained by difference in fluorescence between the respective emission/excitation wavelengths at 492/430 and 510/430 nm. A known amount of 3-OHB[a]P was used as internal standard in all samples to control for quenching. Results were expressed as µmol/min/mg protein.

GST activity was measured in digestive gland cytosol according to the method of Habig et al. (1974) using 10 µg cytosolic protein, CDNB (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO) as substrate, and glutathione reduced-form GSH (1 and 4 mM final concentrations, respectively), in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5). GST activity was determined by kinetic measurement at 20 °C using a Jenway 6105

spectrophotometer (λ = 340 nm). Results were expressed as µmol GSH-CDNB produced/min/mg protein.

CAT was determined according to Clairbone's method (Clairbone 1985). Reaction mixture (final volume 1 mL) contained 0.78 mL 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) and 0.2 mL 0.5 mM H₂O₂. After 30 s of preincubation, the reaction was started by the addition of 0.02 mL of the (S9) solution containing CAT fractions. CAT activity was evaluated by kinetic measurement at 20 °C using a Jenway 6105 spectrophotometer (λ = 240 nm). Results were expressed as µmol hydrogen peroxide transformed/min/mg protein.

Lipid peroxidation was estimated in terms of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) with the use of 1,1,3,3-tetraethoxypropane as standard. The reaction was assessed at 532 nm using TBA reagent as described by Buege and Aust (1978). MDA content was expressed as nmol equivalent MDA/mg protein.

AChE was determined according to Ellman et al. (1961). Reaction mixture (final volume 1 mL) contained 0.85 mL 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5), 0.05 mL 8 mM DNTB (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO) and 0.05 mL of the (S9) solution containing AChE fractions. After preincubation, the reaction was started by addition of 0.05 mL 8.25 mM acetylthiocholine (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO). AChE activity was determined by kinetic measurement at 20 °C using a Jenway 6105 spectrophotometer (λ = 420 nm). Results were expressed as µmol thiocholine produced/min and per/g protein.

Determination of DNA Damage

The MN test was evaluated in the digestive gland cells according to the method described in Bolognesi et al. (1999). Aliquots of the cellular pellet of mussel digestive gland cells were fixed in methanol/acetic acid (3:1) for 20 min and centrifuged at 1,000 rpm for 10 min. The resuspended cells were spread on slides, air-dried and stained with 3 % Giemsa stain. Four thousand cells with preserved cytoplasm/mussel were scored to determine MN frequency. MN were identified according to standardised criteria. They are defined as small round structures (smaller than one-third the diameter of the main nucleus); they must be on the same optical plan as the main nucleus; and their boundary should be distinguishable from that of the nuclei.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SP SS software (SP SS, Chicago, IL on a personal computer (Microsoft, Redmond, WA). Significant differences between means were determined using one-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's test for multiple range comparison; *p* < 0.05 was considered significant.

Verlecar et al. 2007) as response to heat stress. Moreover, it is known that oxidative damage is an important mechanism of toxicity induced by PAHs (Altenburger et al. 2003).

Benzo[a]pyrene (B[a]P) metabolism in mussels has already been documented both in vitro (Martinez and Livingstone 1995) and in vivo (Michel et al. 1995) suggesting a production of B[a]P-reactive species that covalently bind to cellular macromolecules (Michel et al. 1995). Recently, attention has focused on the induction of digestive gland cytochrome P450-dependent monooxygenases (phase I) as a biomarker of mussel exposure to organic contaminants (Stegeman and Hahn 1994; Snyder 2000). Activation of the isoenzyme cytochrome P4501A can be assessed by measuring B[a]P hydroxylase (BPH) activity, which is frequently used as biomarker of exposure to PAH in mussels (Akcha et al. 2000; Banni et al. 2010). The enzymatic activities of glutathione S-transferases (GST), a family of multifunctional enzymes involved in phase II of biotransformation are related to cellular antioxidant defences due to the conjugation of electrophilic xenobiotics and oxidised components with glutathione (GSH) (Fitzpatrick et al. 1995). AChE activity has been described as sensitive biomarker of exposure to organophosphorus pesticides and metals (Banni et al. 2005). However, recent reports indicate an inhibitory effect of PAHs on mussel digestive gland AChE (Akcha et al. 2000; Banni et al. 2010).

The main objective of this study was to evaluate the acute effect of a sublethal B[a]P concentration + temperature gradient on detoxification enzymes, oxidative stress balance, AChE activity and DNA damage in digestive gland tissues of the mussel *Mytilus galloprovincialis*.

Materials and Methods

Chemicals

Chemicals—including 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 5,5'-dithiobis-2-acid nitrobenzoic (DTNB), disodium salt of reduced-form b-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), acetylthiocholine, ultrapure reduced GSH, Triton X-100, 3-OHB[a]P, B[a]P, dimethylsulphoxide and giemsa dye—were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO). Perdeuterated B[a]P was purchased from Supelco (Bellefonte, PA). All other reagents were of analytical grade.

Animals and Treatments

Specimens of *M. galloprovincialis* (Lam), 4–5 cm shell length, were purchased from an aquaculture farm in Bizerta Lagoon (Tunisia) and further acclimatised to aerated and daily renewed clean seawater in an aquarium for 15 days at

18 °C [35 ‰ salinity (1.5 L/animal)]. Mussels were then treated for 7 days under natural light and without any food source. Water was renewed daily. The following 10 different conditions were analysed:

1. Animals under ambient temperatures (18 ± 0.5 °C) with dimethylsulphoxide (DMSO) (control).
2. Animals under ambient temperatures (18 ± 0.5 °C) with B[a]P (19 µg/L).
3. Animals under heat stress (20 ± 0.5 °C) with DMSO.
4. Animals under *n* heat stress (20 ± 0.5 °C) with B[a]P (19 µg/L).
5. Animals under *n* heat stress (22 ± 0.5 °C) with DMSO.
6. Animals under *n* heat stress (22 ± 0.5 °C) with B[a]P (19 µg/L).
7. Animals under *n* heat stress (24 ± 0.5 °C) with DMSO.
8. Animals under *n* heat stress (24 ± 0.5 °C) with B[a]P (19 µg/L).
9. Animals under *n* heat stress (26 ± 0.5 °C) with DMSO.
10. Animals under *n* heat stress (26 ± 0.5 °C) with B[a]P (19 µg/L).

The nominal concentration of B[a]P (19 µL/L) is the equivalent of 75 nM and was reported in previous works by our group to be sublethal (Banni et al. 2009, 2010).

Control mussels were exposed to 0.005 % (v/v) DMSO. B[a]P was dissolved in DMSO. After treatments, a first set of mussel's digestive gland tissue (10 individual fractions/exposure period) were rapidly dissected out, washed in artificial seawater buffered with 20 mM Hepes [pH 7.4], flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until biochemical analysis. A second set of tissues (10 individual digestive glands/exposure period) were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until B[a]P analysis. Digestive gland cells were prepared by mechanical dissociation of the tissue as previously described (Dondero et al. 2003) for micronuclei (MN) test. Briefly, freshly dissected tissue was washed extensively in ice-cold physiological saline solution containing 500 mM NaCl, 12.5 mM KCl, 5 mM di-sodium ethylenediaminetetraacetic acid and 20 mM Hepes (pH 7.4). The tissue was minced using scissors, and the cells were mechanically dissociated by chopping with a razor blade. The cell mixture was resuspended in 10 mL ice-cold physiological saline solution and further filtered through a 100-µm sieve. The volume of the eluate was adjusted to 50 mL.

B[a]P Analysis

The content of B[a]P in digestive gland fractions was determined using gas chromatography coupled with mass

Spearman correlation matrix was also calculated to study the relationships between the different biomarkers measured (Statistica Soft). Factor analysis of the variables analysed was performed by means of principal component analysis (PCA) with orthogonal rotation (Varimax) using Systat 11 software (SYSTAT Software). (Varimax minimises the number of variables that have high loadings on each factor.) PCA analysis was used as an effective technique to simplify the correlation structure through linear transformation of the original variables (Jolliffe 1986).

Results

The amounts of B[a]P in *M. galloprovincialis* digestive gland after 7 days of exposure to PAH along + temperature gradient (18, 20, 22, 24 and 26 °C) are listed in Table 1. Data show increasing B[a]P accumulation in animals exposed to 24 and 26 °C with, respectively, 28.07 ± 2.11 and 31.98 ± 2.73 µg/g dry weight B[a]P. These amounts were significantly lower in animals exposed to B[a]P but were maintained at 18 °C with 21.52 ± 1.85 µg/g dry weight B[a]P. The B[a]P contents were also measured in control animals and DMSO-exposed mussels, and values were lower than the limit of detection.

Results of the measurement of BPH activity in *M. galloprovincialis* digestive gland after exposure to 75 nM B[a]P for 7 days + temperature gradient are listed in Fig. 1a. Digestive gland BPH activity significantly increased in animals coexposed to B[a]P and temperature (18, 20 and 22 °C) compared with controls (temperature only). However, in animals exposed to B[a]P along with increased temperatures (24 and 26 °C), BPH activity was not increased compared with controls.

The effect of B[a]P exposure, along with the temperature gradient, on mussel digestive gland phase II enzyme activity is shown in Fig. 1b. A significant response in control animals was recorded for all temperatures except for animals exposed to 26 °C. A significant decrease in GST activity was recorded in animals coexposed to 26 °C and B[a]P compared with organisms exposed to lower

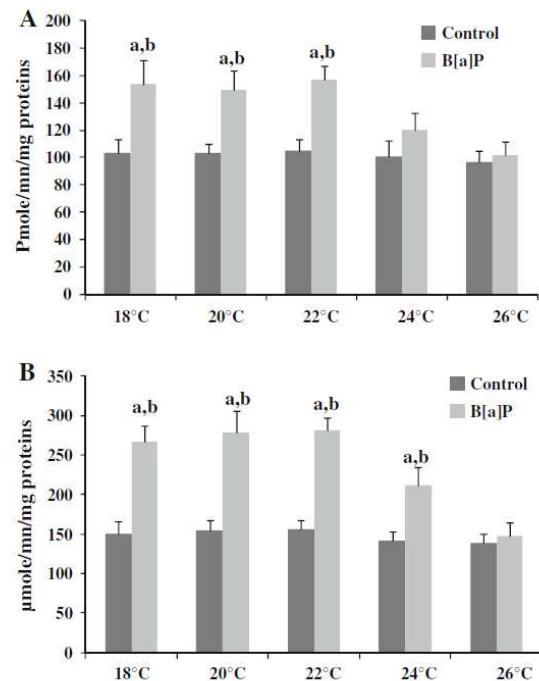


Fig. 1 Detoxification enzymes responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to a daily nominal concentration of 19 µg/L B[a]P/animal + temperature gradient (18, 20, 22, 24 and 26 °C) for 7 days. **a** Digestive gland BPH activity. **b** Digestive gland GST activity. Control mussels were exposed to DMSO. B[a]P retrieval rates were in the range of 91.7–95.4 % of the nominal concentration. Data represent means $\pm$ SDs. Superscript “a” indicates $p < 0.05$ (significant difference by ANOVA, multiple comparison and Duncan’s test versus control ($n = 10$)). Superscript “b” indicates $p < 0.05$ [significant difference by ANOVA, multiple comparison and Duncan’s test versus control group for each temperature ($n = 10$)]

temperatures. In animals exposed only to the temperature gradient, GST activity was unchanged.

Results relative to CAT activity in mussels exposed to B[a]P + temperature gradient are reported in Fig. 2a. Our data indicated that CAT activity maximum response was reached in animals exposed to B[a]P and 22 °C with,

Table 1 Benzo[a]pyrene content (µg/dry weight) in digestive gland tissues of *Mytilus galloprovincialis* exposed to a daily nominal concentration of 19 µg/L B[a]P/animal + temperature gradient (18, 20, 22, 24 and 26 °C) for 7 days

Group	18 °C	20 °C	22 °C	24 °C	26 °C
Control	ND	ND	ND	ND	ND
B[a]P	21.52 ± 1.85^a	21.36 ± 1.60^a	23.95 ± 2.66^a	28.07 ± 2.11^{ab}	31.98 ± 2.73^{ab}

Analyses were performed by means of GC–MS. Data are expressed as means $\pm$ SDs ($n = 10$ individual digestive glands). Digestive gland B[a]P content in control mussels was lower than the limit of detection. ND not detected

^a $p < 0.05$ [significant difference by ANOVA, multiple comparison and Duncan’s test versus control ($n = 10$)]

^b $p < 0.05$ [significant difference by ANOVA, multiple comparison and Duncan’s test versus group exposed to 19 µg/L B[a]P + 18 °C ($n = 10$)]

respectively, 162.61 ± 12.93 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteins. Animals coexposed to 26 °C and B[a]P showed the lowest CAT activity, i.e., inhibited compared with controls (18 °C) (85.69 ± 7.43 and 111.04 ± 10.36 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteins, respectively).

MDA accumulation, evaluated as TBARS in mussel digestive gland after 7 days of exposure to B[a]P + temperature gradient, is shown in Fig. 2b. A temperature-dependent accumulation of MDA was observed to be more pronounced in animals coexposed to B[a]P; a maximum of 38.62 ± 3.13 nmol/mg proteins was reached after 7 days in mussels exposed to 26 °C and B[a]P.

The response of AChE activity in mussel digestive gland after exposure to B[a]P + temperature gradient is reported in Fig. 3. AChE activity was significantly inhibited in mussels exposed to B[a]P for all of the tested temperatures compared with mussels exposed to heat stress only. Exposure at 26 °C rendered a significant inhibition of AChE activity compared with controls (18 °C).

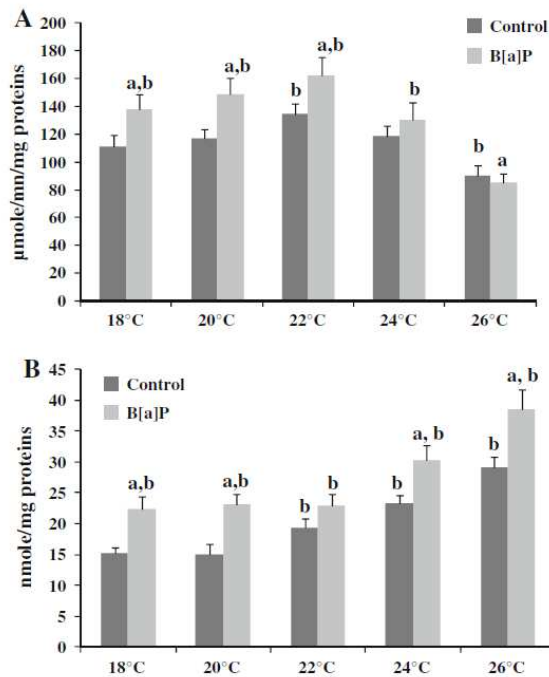


Fig. 2 Response of oxidative stress biomarkers in *M. galloprovincialis* exposed to a daily nominal concentration of 19 $\mu\text{g}/\text{L}$ B[a]P/animal + temperature gradient (18, 20, 22, 24 and 26 °C) for 7 days. **a** Digestive gland CAT activity. **b** Digestive gland MDA content. Control mussels were exposed to DMSO. B[a]P retrieval rates were in the range of 91.7–95.4 % of the nominal concentration. Data represent means $\pm$ SDs. Superscript “a” indicates $p < 0.05$ (significant difference by ANOVA, multiple comparison and Duncan’s test versus control ($n = 10$)). Superscript “b” indicates $p < 0.05$ [significant difference by ANOVA, multiple comparison and Duncan’s test versus control group for each temperature ($n = 10$)]

The DNA-damaging effect, i.e., MN frequency, on nuclei of *M. galloprovincialis* digestive gland cells exposed for 7 days to 75 nM B[a]P + temperature gradient is shown in Fig. 4. A significant increase in MN frequency was registered in animals exposed to B[a]P for all of the tested temperatures and was maximal at 26 °C (25.73 % MN). Interestingly, and for the same temperatures, a significant increase in MN frequency was recorded in non-B[a]P exposed animals with ≤ 12.44 % MN compared with controls (18 °C).

The correlation coefficients obtained between the investigated biomarkers in digestive gland of mussels exposed to (1) temperature gradient only and to (2) B[a]P + temperature gradient are reported, respectively, in Tables 2 and 3. MN frequency, MDA and AChE activity were significantly correlated to the exposure temperature in animals exposed to heat stress (Table 2). However, a significant correlation was recorded between exposure temperature and B[a]P accumulation, i.e., in BPH and GST activities in organisms exposed to PAH + temperature gradient (Table 3). Results from PCA using biomarker data in animals exposed to heat stress showed that the first axis (53.44 % of the overall variance) was mainly influenced by BPH activity, GST activity and MN frequency (Table 2). MDA accumulation and AChE activity mainly comprised the second axis (18.71 % of the variance). This axis appeared to be associated with a heat-specific response because the five exposure temperatures were clearly separated. PCA was also generated from biomarker data in animals exposed to B[a]P + temperature gradient to render a first axis (77.69 % of the variance) that was mainly linked to AChE and CAT activities as well as B[a]P accumulation (Fig. 5b).

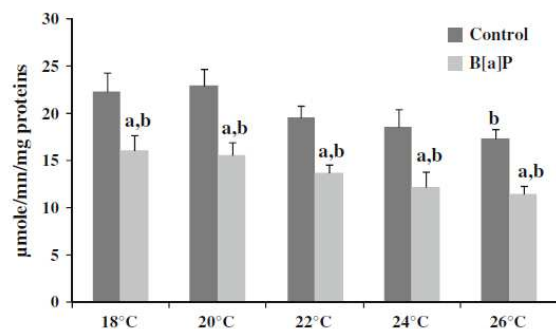


Fig. 3 Digestive gland AChE in *M. galloprovincialis* exposed to a daily nominal concentration of 19 $\mu\text{g}/\text{L}$ B[a]P/animal + temperature gradient (18, 20, 22, 24 and 26 °C) for 7 days. Control mussels were exposed to DMSO. B[a]P retrieval rates were in the range of 91.7–95.4 % of the nominal concentration. Data represent means $\pm$ SDs. Superscript “a” indicates $p < 0.05$ (significant difference by ANOVA, multiple comparison and Duncan’s test versus control ($n = 10$)). Superscript “b” indicates $p < 0.05$ [significant difference by ANOVA, multiple comparison and Duncan’s test versus control group for each temperature ($n = 10$)]

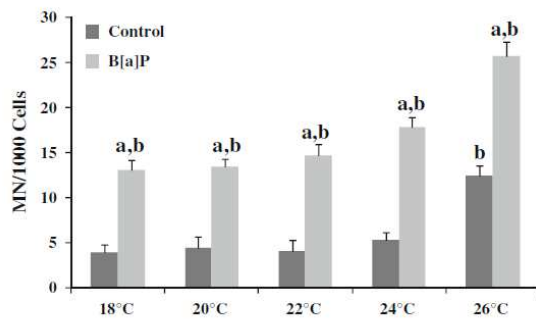


Fig. 4 Frequency of micronucleated cells ($\times 1,000$) in digestive gland cells of *M. galloprovincialis* exposed to a daily nominal concentration of 19 $\mu\text{g/L}$ B[a]P/animal + temperature gradient (18, 20, 22, 24 and 26 $^{\circ}\text{C}$) for 7 days. Control mussels were exposed to DMSO. At least 4,000 cells with preserved cytoplasm/mussel were scored. Each treatment was repeated 10 times. B[a]P retrieval rates were in the range of 91.7–95.4 % of the nominal concentration. Data represent means $\pm$ SDs. Superscript “a” indicates $p < 0.05$ (significant difference by ANOVA, multiple comparison and Duncan’s test versus control ($n = 10$)). Superscript “b” indicates $p < 0.05$ (significant difference by ANOVA, multiple comparison and Duncan’s test versus control group for each temperature ($n = 10$))

Discussion

The ability for an organism challenging stress to regulate cellular processes can allow it to cope with stress-induced damage of macromolecular components and to avoid extreme cellular alteration that can lead to cell death

(Lockwood et al. 2010). In an aquatic environment, interactions between abiotic and biotic factors may occur. Among abiotic factors, thermal stress can constitute a physiological disorder in an aquatic organism, which potentially affects metabolism (Lockwood et al. 2010; Verlecar et al. 2007). B[a]P is a potent carcinogen that is present in many forms of environmental pollution in relatively low amounts (Phillips 1983; Banni et al. 2009). The study of biological responses of aquatic organisms to environmental stressors is considered a successful approach to assess environmental quality (Banni et al. 2007, 2009; Viarengo et al. 2007). Invertebrates, particularly bivalve molluscs such as mussels, are suitable organisms for studying the biological effects of pollutants (Viarengo et al. 1999). A number of studies have described occurrence of B[a]P and B[a]P induction of metabolising enzymes in mussel digestive gland (Akcha et al. 2000; Sole and Livingstone 2005; Banni et al. 2010). However, to our knowledge, this is the first report evaluating the effect of acute B[a]P exposure + temperature gradient on mussel digestive gland biotransformation and detoxification responses.

In the present study, we reported a significant increase of BPH activity in animals coexposed to B[a]P and low temperatures (18, 20 and 22 $^{\circ}\text{C}$) compared with animals exposed only to a temperature gradient. A similar response to that of temperature-exposed animals was observed in mussels stressed with B[a]P at 24 and 26 $^{\circ}\text{C}$. This suggests a decrease of the phase I biotransformation process and

Table 2 Pearson correlation coefficients of studied biomarker and exposure temperature in heat-stressed mussels

Biomarker	Temperature	CAT	BPH	MN	GST	MDA
CAT	−0.28					
BPH	−0.32	0.59*				
MN	0.73*	−0.48	−0.16			
GST	−0.20	0.35	0.37	−0.21		
MDA	0.92*	−0.25	−0.22	0.69*	−0.19	
ACHE	−0.84*	0.25	0.35	−0.59*	0.43	−0.81*

* Significant at $p < 0.01$

Table 3 Pearson correlation coefficients of studied biomarker, B[a]P accumulation and exposure temperature in mussels exposed to B[a]P + temperature gradient

Biomarker	Temperature	B[a]P	CAT	BPH	MN	GST	MDA
B[a]P	0.83*						
CAT	−0.41	−0.43					
BPH	−0.73*	−0.62	0.65				
MN	0.89*	0.89*	−0.40	−0.68			
GST	−0.71*	−0.66	0.61	0.62	−0.67		
MDA	−0.80*	0.76*	−0.54	−0.66	0.77*	−0.78*	
ACHE	−0.90*	−0.75*	0.38	0.68	−0.83*	0.64	−0.69

* Significant at $p < 0.01$

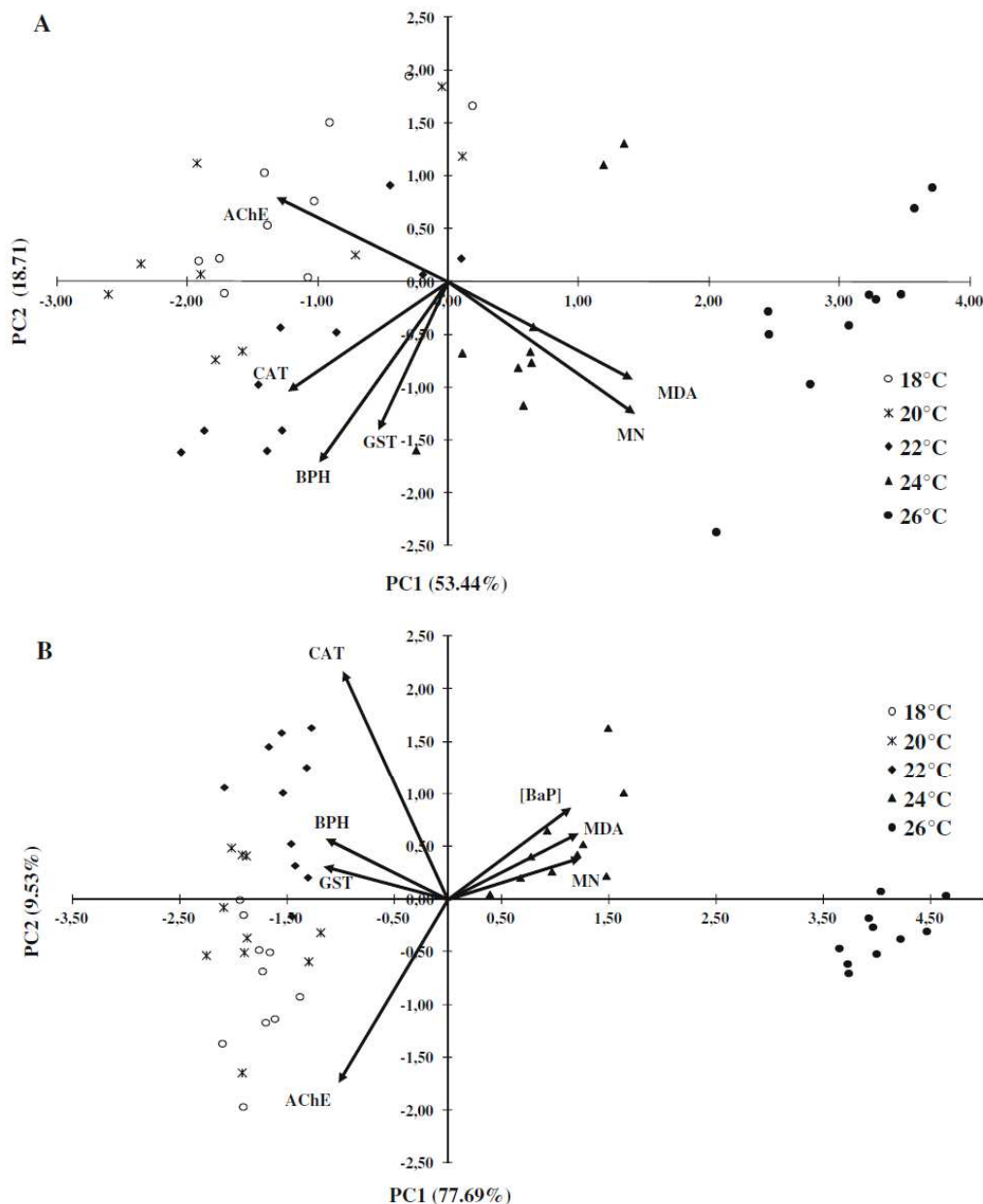


Fig. 5 Biplot from additional PCA of all variables studied. **a** Heat-stressed animals. Animals exposed to B[a]P + temperature gradient (**b**)

hence greater accumulation of the PAH at 24 and 26 °C. Moreover, our investigation shows that exposure to B[a]P for 7 days + temperature gradient resulted in an increasing accumulation of the aromatic compound in mussel digestive gland tissues. Indeed, a maximum was reached in animals exposed to 26 °C. This result indicates a negative effect of higher temperatures on the PAH-biodegradation ability of mussels. This may explain the strong correlation

observed between temperature and MN ($p = 0.89$) recorded in the digestive gland of B[a]P-exposed animals (Table 2). Indeed, the decrease of phase I metabolizing enzyme due to the temperature increase rendered an increase in nonmetabolized B[a]P accumulation, which can further alter the DNA stability of target cells. Moreover, MN frequency was not correlated with BPH activity (Table 3) in mussels exposed to B[a]P + temperature

gradient, suggesting that the DNA alteration pattern is probably due to B[a]P accumulation rather to its metabolites as reported in Akcha et al. (2000) and Banni et al. (2010).

GST activity has already been characterised in mussels (Fitzpatrick et al. 1995, 1997). From data discussed in this study, it appears clear that GST activity was ineffective in decreasing DNA-damaging effects in mussels exposed to B[a]P for all tested temperatures, although significant increases were registered at 18, 20, 22 and 24 °C. This could be due to the greater amounts of bioaccumulated B[a]P as well as the particular metabolism of B[a]P leading to electrophilic intermediates by phase I mixed function oxidases followed by binding of metabolites to nucleophilic sites within DNA (Osborne et al. 1981). Interestingly, the greatest DNA damaging effect was registered in mussels coexposed to B[a]P and 26 °C, thus supporting the hypothesis that higher temperatures alter mussel biotransformation ability (phases I and II).

CAT activity is considered a key cell antioxidant enzymatic activity that catalyses transformation of reactive oxygen species (ROS) hydroperoxide to water. The production of oxyradicals in mussels has been reported to be mediated by a higher range of contaminants, including B[a]P (Altenburger et al. 2003; Martinez and Livingstone 1995). Recent reports indicate the implication of higher temperatures in the enhancement of cellular (ROS) release in mussels, thereby increasing the risk of oxidative alterations (Kefaloyianni et al. 2005; Verlecar et al. 2007; Lockwood et al. 2010). In this study, oxidative alterations were evaluated using TBARS. However, it is already known that MDA measured as TBARS can be overestimated (Mendes et al. 2009). Our data show a bell-shaped response of CAT activity in animals exposed to the temperature gradient alone as well as those exposed to PAH + temperature gradient. This may suggest a potent cytotoxicity effect at higher temperatures (26 °C) probably due to the presence of B[a]P and its metabolites in the cytoplasm as reported in the correlation matrix between the lipid peroxidation biomarker MDA and temperatures ($p = 0.83$) as well as between MDA and B[a]P accumulation ($p = 0.76$). MDA accumulation and MN frequency were significantly increased in animals exposed only to 26 °C. This may suggest genotoxic and cytotoxic effects of acute exposure to higher temperatures even in absence of B[a]P probably due to the greater amounts of generated ROS.

Because of its role in neurotransmission, AChE is considered highly sensitive to biotic and abiotic changes (Dimitriadis et al. 2012; Greco et al. 2011). Moreover, AChE was reported to be inhibited in mussels after acute and subacute exposure to B[a]P (Akcha et al. 2000; Banni et al. 2010). In the present study, we observed a significant inhibition of AChE enzyme in mussels after 7 days of exposure to B[a]P + temperature gradient. However, in

animals exposed to heat stress only, AChE activity was only inhibited at 26 °C. Interestingly, AChE activity was negatively correlated with temperature and B[a]P accumulation with correlation coefficients of ($p = -0.90$; $r^2 = 0.93$) and ($p = -0.75$; $r^2 = 0.88$), respectively (Table 3). Even if little is known about PAH's effects on AChE activity in mussels, our data provide clues about the occurrence of a negative effect of B[a]P, i.e., a nonconventional inhibitor of AChE activity. Furthermore, the higher correlation coefficient between temperature and AChE in animals exposed only to the temperature gradient ($p = -0.83$; $r^2 = 0.92$) (Table 2) confirmed the inhibitory effect of higher temperature on some bivalves' AChE activity (Dimitriadis et al. 2012; Greco et al. 2011).

In this work, exposure to heat stress alone and heat + B[a]P seemed to affect mussel response differently as highlighted by PCA (Fig. 5a, b). Indeed, the effects of exposure to higher temperatures (in the absence of B[a]P) were shifted toward MN frequency, MDA accumulation and AChE activity. Moreover, response to B[a]P at low temperatures (18, 20 and 22 °C) seems to be more related to the phase I and II enzymes as well as to CAT activity (Fig. 5b). However, this response becomes marked at 24 and 26 °C as evidenced by inhibition of detoxification enzymes and increased genotoxic and cytotoxic effects (termed "MN" and "MDA") as well as PAH accumulation, thus indicating the negative effect of heat stress on the responses of mussels to acute B[a]P exposure.

Conclusion

Heat-stress events due to global warming, combined with organic and inorganic contaminants, may constitute a threat to organisms inhabiting tidal zones. In this study, we provide clues about the occurrence of a negative effect of acute heat stress on mussel response to sublethal B[a]P concentrations resulting in cellular genotoxicity and cytotoxicity. Inhibition of AChE activity, even if occurring in heat-stressed animals, may reflect a general negative effect of B[a]P combined with exposure to higher temperatures exposure and should be considered in case of acute PAH stress.

Acknowledgments This work was supported by funds from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (Grant No. UR04A6R05), Biochimie et Toxicologie Environnementale, and Theme 6 of the EC Seventh Framework Program through the Marine Ecosystem Evolution in a Changing Environment Collaborative Project (Grant No. MEECE 212085).

References

Akcha F, Izuel C, Venier P, Budzinski H, Burgeot T, Narbonne J-F (2000) Enzymatic biomarker measurement and study of DNA

- adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Aquat Toxicol 49:269–287
- Altenburger R, Segner H, Van der Oost R (2003) Biomarkers and PAH prospects for the assessment of exposure and effects in aquatic systems. In: Douben PET (ed) PAHs: an ecotoxicological perspective. Wiley, Chichester, pp 147–171
- Banni M, Jebali J, Daubez M, Clerandaux C, Guerbej H, Narbonne JF et al (2005) Monitoring pollution in Tunisian coasts: application of a classification scale based on biochemical markers. Biomarkers 10(2–3):105–116
- Banni M, Dondero F, Jebali J, Guerbej H, Boussetta H, Viarengo A (2007) Assessment of heavy metal contamination using real time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: a validation along the Tunisian coasts. Biomarkers 12(4):369–383
- Banni M, Negri A, Rebelo M, Rapallo F, Boussetta H, Viarengo A et al (2009) Expression analysis of the molluscan p53 protein family mRNA in mussels (*Mytilus* spp.) exposed to organic contaminants. Comp Biochem Physiol C 149(3):414–418
- Banni M, Negri A, Dagnino A, Jebali J, Ameer S, Boussetta H (2010) Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. Ecotoxicol Environ Saf 73(5):842–848
- Banni M, Negri A, Mignone F, Boussetta H, Viarengo A, Dondero F (2011) Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle. PLoS One 6(5):e18904
- Baumard P, Budzinski H (1997) Internal standard quantification method and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS): a reliable tool for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) quantification in natural matrices. Analis 25:246–252
- Bolognesi C, Landini E, Roggeri P, Fabbri R, Viarengo A (1999) Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. Environ Mol Mutagen 33(4):287–292
- Bradford MM (1979) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principal of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol 52:302–310
- Byrne M (2012) Global change ecotoxicology: Identification of early life history bottlenecks in marine invertebrates, variable species responses and variable experimental approaches. Mar Environ Res 76:3–15
- Cebrian E, Uriz MJ, Garrabou J, Ballesteros E (2011) Sponge mass mortalities in a warming Mediterranean Sea: are cyanobacteria-harboring species worse off? PLoS One 6(6):e20211
- Chen B, Xuan X, Zhu L, Wang J, Gao Y, Yang K, Shen X et al (2004) Distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface waters, sediments and soils of Hangzhou City, China. Water Res 38:3558–3568
- Clairborne A (1985) Catalase activity. Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, pp 283–284
- Dimitriadis VK, Gougoula C, Anestis A, P  rtner HO, Michaelidis B (2012) Monitoring the biochemical and cellular responses of marine bivalves during thermal stress by using biomarkers. Mar Environ Res 73:70–77
- Dondero F, Piacentini L, Banni M, Rebelo M, Burlando B, Viarengo A (2003) Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. Gene 345(2):259–270
- Ellman GL, Courtney KO, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 7:88–95
- Farcy E, Voiseux C, Lebel JM, Fi  vet B (2009) Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. Cell Stress Chaperones 14(4):371–380
- Fitzpatrick PJ, Sheehan D, Livingstone DR (1995) Studies on isoenzymes of glutathione S-transferase in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* with exposure to pollution. Mar Environ Res 39:241–244
- Fitzpatrick PJ, O'Halloran J, Sheehan D, Walsh AR (1997) Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.) as potential organic pollution biomarkers. Biomarkers 2:51–56
- Greco L, Pellerin J, Capri E, Garnerot F, Louis S, Fournier M et al (2011) Physiological effects of temperature and a herbicide mixture on the soft-shell clam *Mya arenaria* (Mollusca, Bivalvia). Environ Toxicol Chem 30(1):132–141
- Habig W, Pabst M, Jakoby W (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 249(22):7130–7139
- Jolliffe IT (1986) Principal component analysis. Springer, New York
- Kefaloyianni E, Gourgou E, Ferle V, Kotsakis E, Gaitanaki C, Beis I (2005) Acute thermal stress and various heavy metals induce tissue-specific pro- or anti-apoptotic events via the p38-MAPK signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). J Exp Biol 208(23):4427–4436
- Lockwood BL, Sanders JG, Somero GN (2010) Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*): molecular correlates of invasive success. J Exp Biol 15(213):3548–3558
- Martinez PG, Livingstone DR (1995) Benzo[a]pyrenedione stimulated oxyradical production by microsomes of digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. Mar Environ Res 39:185–189
- Mendes R, Cardoso C, Pestana C (2009) Measurement of malondialdehyde in fish: a comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. Food Chem 112:1038–1045
- Michel XR, Suteau P, Robertson LW, Narbonne JF (1993) Effects of benzo(a)pyrene, 3,3', 4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,2', 4,4', 5,5'-hexachlorobiphenyl on the xenobiotic-metabolizing enzymes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). Aquat Toxicol 27:335–344
- Michel XR, Beasse C, Narbonne JF (1995) In vivo metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Arch Environ Contam Toxicol 28:215–222
- Narbonne JF, Daubeze M, Cl  randeau C, Garrigues P (1999) Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. Biomarkers 4:415–424
- Osborne MR, Jacobs S, Harvery RG, Brookes P (1981) Minor products from the reaction of benzo[a]pyreneanti-diol epoxide with DNA. Carcinogenesis 2:553–558
- Phillips H (1983) Fifty years of benzo[a]pyrene. Nature 303:468–472
- Quilliam MA, Hardsta WR, Anacleto JF, Leblanc MD, Stergiopoulos V, Dick KL et al (1994) Preparation and certification of solutions of perdeuterated polycyclic aromatic compounds intended for use as surrogate internal standards. Fresenius J Anal Chem 350:109–118
- Shaw GR, Connell DW (1994) Prediction and monitoring of the carcinogenicity of polycyclic aromatic compounds (PAC). Rev Environ Contam Toxicol 135:1–62
- Snyder MJ (2000) Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrate: recent advances and future directions. Aquat Toxicol 48:529–547
- Sokolova IM (2004) Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). J Exp Biol 207:2639–2648

- Sole M, Livingstone DR (2005) Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and FNADPH-independent benzo[a]pyrene hydroxylase activity in a wide range of marine invertebrate species. *Comp Biochem Physiol C* 141:20–31
- Stegeman JJ, Hahn ME (1994) Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins DC, Ostrander GK (eds) *Aquatic toxicology: molecular, biochemical and cellular perspectives*. CRC/Lewis, Boca Raton, pp 87–206
- Sylvestre F, Linares-Casenave J, Doroshov SI, Kültz DA (2010) Proteomic analysis of green and white sturgeon larvae exposed to heat stress and selenium. *Sci Total Environ* 408(16):3176–3188
- Tomanek L, Zuzow MJ (2010) The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress. *J Exp Biol* 213(20):3559–3574
- Verlecar XN, Jena KB, Chainy GB (2007) Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chem Biol Interact* 167(3):219–226
- Viarengo A, Burlando B, Cavaletto M, Marchi B, Ponzano E, Blasco J (1999) Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am J Physiol* 277(6 Pt 2):R1612–R1619
- 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. *Comp Biochem Physiol C* 146(3):281–300
- Volodkovich YL, Belyaeva OL (1992) Distribution of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Nagel PA (ed) *Results of the third joint US–USSR Bering and Chukchi Seas expedition (BERPAC), summer 1988*. United States Fish and Wildlife Service, Washington, DC, pp 308–313
- Widdows J, Donkin P, Staff FJ, Matthiessen P, Law RJ, Allen YT et al (2002) Measurement of stress effects (scope for growth) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) collected from the Irish Sea. *Mar Environ Res* 53(4):327–356

B. Expérimentation in situ

Application d'une approche multibiomarqueurs chez *Mytilus galloprovincialis* pour la biosurveillance de la lagune de Bizerte

I. Les paramètres physico-chimiques de la lagune de Bizerte

Dans le but de caractériser la qualité physico-chimique de la lagune, un suivi mensuel des paramètres physico-chimiques a été réalisé sur la période avril 2011-mars 2013. Les prélèvements ont été effectués dans la lagune de Bizerte : des échantillons d'eau ont été collectés simultanément pour la détermination des concentrations en chlorophylle indicatives de l'abondance des phytoplanctons et la transparence.

Le tableau 8 représente la variation mensuelle de cinq paramètres notamment la température (°C), la salinité (psu), la concentration de l'oxygène dissous (mg.l⁻¹), la transparence et la concentration de chlorophylle (µg.l⁻¹).

Les données obtenues montrent que les eaux de la lagune de Bizerte présentent des valeurs moyennes de pH de $8 \pm 0,3$. Les valeurs de température suivent un cycle saisonnier. Les valeurs minimales ont été enregistrées en février 2012 (10,75°C) et février 2013 (12,1°C). Les valeurs maximales ont été atteintes en août 2011 (29,1°C) et août 2012 (29,5 °C).

La salinité moyenne des eaux de la lagune est égale à 35 *psu*. Les valeurs minimales ont été mesurées en avril 2011 (27,85 *psu*) et en mars 2012 (20,5 *psu*). Les valeurs maximales de salinité ont été mesurées en novembre 2011 (36,7 *psu*) et en novembre 2012 (36,9 *psu*). Les teneurs en oxygène dissous dans les eaux de la lagune fluctuent entre 6,2 g.m³ et 8,5 g.m³, les valeurs les plus faibles ont été mesurées pendant les mois le plus chauds (août 2011 et août 2012). Les teneurs des eaux en oxygènes montrent une lagune bien oxygénée. Les teneurs moyennes des eaux de la méditerranée en oxygènes sont comprises entre 7 et 9 g.m³ (Copin-Montégut, 1996). Cette oxygénation importante des eaux est due en premier lieu à l'aération et à moindre degré à la présence d'un couvert végétal constitué par des *Caulerpa prolifera*, des *Gracilaria verrucosa*, des *Cystoseira compressa*, des *Cymodocea nodosa*, des *Ruppia cirrhosa* et *Zostera noltii* (MAERH, 2003).

Tableau 8 : Variation des paramètres physico-chimiques de l'eau de la lagune de Bizerte (avril 2011-mars 2013) (en jaune : les valeurs les plus élevées pendant un cycle annuel ; en vert : les valeurs les plus faibles pendant un cycle annuel).

Mois	Température (°C)	pH	Salinité (psu)	O ₂ (g.m ³)	Transparence	Chlorophylle (mg.m ³)
avr-11	16,75	8,35	27,85	8	1,95	2,15
mai-11	18,1	8,35	32	7,5	1,8	2,4
juin-11	19,6	8,3	32,7	8	1,7	2,8
juil-11	26,2	8,5	33,4	6,9	1,6	3,1
août-11	29,1	8	33,8	6,2	1,3	3,5
sept-11	23,1	7,8	34,2	7	1,2	2,1
oct-11	18,9	8	36,5	7,8	1,5	1,25
nov-11	17,2	8,2	36,7	8,3	1,9	0,9
déc-11	13,1	8,5	35,1	8	2,8	1,2
janv-12	10,5	7,8	34	8,1	2,9	0,8
févr-12	10,75	8,25	25,5	6,76	2,15	0,97
mars-12	14,5	8,37	20,5	8,15	1,7	3,02
avr-12	17,55	8,35	25,75	8	1,75	2,64
mai-12	18,5	8,3	32,1	8,2	1,8	2,16
juin-12	19,7	8,4	32	7,8	2,05	2,12
juil-12	24,2	8,2	33,2	6,3	1,6	2,39
août-12	29,5	8,1	33,7	6,3	1,3	3,15
sept-12	22,3	7,8	35,1	7	1,6	2,9
oct-12	19,4	8,01	37,2	7,9	1,2	1,32
nov-12	18,5	8,4	36,9	8,4	1,5	0,95
déc-12	14,1	8,5	35,7	8,5	2,56	1,23
janv-13	12,5	8	35	8	2,8	0,84
févr-13	12,1	8,1	34,4	7,9	2,2	0,89
mars-13	13,5	8	35,2	7,9	1,9	1,23

En ce qui concerne la transparence de l'eau dans la lagune, les valeurs les plus élevées ont été mesurées pendant la période hivernale (janvier 2012 et janvier 2013). La transparence importante des eaux au niveau de la lagune de Bizerte peut être expliquée par l'absence des cours d'eaux ramenant une charge solide élevée d'une part et par un faible hydrodynamisme du milieu, d'autre part (INSTM, 2002).

Le phytoplancton est une composante essentielle du milieu marin. Premier maillon de la chaîne alimentaire, il est indispensable à la vie marine mais son excès peut être redouté. C'est le cas lorsque l'espèce dominante émet des toxines ou lorsque la biomasse atteint de tels niveaux que l'équilibre du milieu est en jeu lors de processus d'eutrophisation. Le pigment chlorophyllien, qui caractérise les végétaux permettant la photosynthèse, est un indicateur de la biomasse du phytoplancton. L'évolution des concentrations en chlorophylle-a dans la lagune

de Bizerte présente un maximum de 3,5 et 3,15 mg.m³, ces valeurs sont enregistrées respectivement en août 2011 et août 2012, alors que les concentrations minimales qui sont de l'ordre de 0,8 et 0,84 mg.m³ ont été mesurées en janvier 2012 et janvier 2013. Des travaux antérieurs ont démontré que la concentration de la chlorophylle-*a* dans la lagune est supérieure à celle enregistrée dans le goulet mais inférieure à celle enregistrée dans le lac Ichkeul (10,5 mg.m³ ; ANPE, 1994). Le phytoplancton dans la lagune s'enrichit au fur et à mesure de son déplacement en fonction des courants giratoires. Il bénéficie ainsi des apports nutritifs des cours d'eau et du canal Tinja. Une part importante du phytoplancton de la lagune provient du lac Ichkeul (Béjaoui et al., 2005).

II. Variation saisonnière des paramètres physiologiques chez *Mytilus galloprovincialis*

1. L'indice de condition

L'indice de condition (IC), qui est très souvent utilisé pour qualifier l'état physiologique des bivalves, est considéré comme l'un des meilleurs indicateurs de l'état général des organismes pour les études environnementales (Hyotylanen et al., 2002). Il permet également de confirmer l'effort de la reproduction en lien avec l'indice gonadique par exemple. La figure 28 présente l'évolution de l'indice de condition (IC) des moules prélevées de Menzel Abdelrahmen (site 1) et la baie des carrières (site 2) dans la lagune de Bizerte entre avril 2011 et mars 2013. La variation mensuelle de l'indice de condition des moules prélevées des deux sites d'études pendant les 24 mois qui regroupe deux cycles saisonniers montre un profil général caractérisé par une évolution différente sur les deux sites. Le site 2 de la baie des carrières semble marqué par trois périodes découpées suivant trois pics très supérieurs au site de Menzel Abdelrahmen. Les deux premières périodes sont courtes et rassemblées autour des pics de janvier 2012 et avril 2012. La troisième période d'élévation de l'IC est plus étalée entre août et Novembre 2012. Le site de Menzel Abdelrahmen est beaucoup moins contrasté avec deux pics d'IC beaucoup plus faibles (valeurs IC) mais synchronisé avec le site de la baie des carrières en décembre 2011 et avril 2012. L'accumulation de réserve et du poids de mollusque semblent également moins intense sur le site de Menzel Abdelrahmen (IC= 4,3 et 8,4 respectivement au site 1 et 2) mais légèrement décalé avec une accumulation de poids en octobre 2012 et une perte de poids en février 2013. Le cycle de variations saisonnières étudiées pendant deux ans (avril 2011 à mars 2013) est donc marqué par deux périodes synchrones sur les deux sites. Celles-ci caractérisent deux périodes de prise de poids intense pendant seulement un mois en décembre

2011 et en avril 2012. La chute de poids est tout aussi rapide après les deux pics. Ce phénomène sans explications directes de nos paramètres mesurés, illustre une forte activité métabolique pendant les périodes décrites par les deux pics de décembre 2011 et avril 2012. Ces deux périodes de pics synchrones sur deux sites pourraient-êtr déclenchées par un besoin d'allocation d'énergie nécessaire à une ponte, ce que l'indice gonadique pourra confirmer dans le paragraphe suivant. Ces deux périodes clés du cycle saisonnier étudié sont suivies par une troisième période de prise de poids plus lente mais également décalée sur les deux sites entre aout 2012 et mars 2013. En résumé, trois fenêtres marquent un effort d'adaptation métabolique d'accumulation et d'allocation d'énergie différente sur le cycle de deux ans. L'indice de condition est un paramètre physiologique général et robuste qui peut se révéler très informatif sur l'interprétation de mécanismes métaboliques moléculaires décrits sous le nom de biomarqueurs. Le IC est en parfaite corrélation avec la concentration de glycogène dans muscle, une importante réserve énergétique utile au métabolisme cellulaire et à l'effort de reproduction (Hardin et Roberts, 1997).

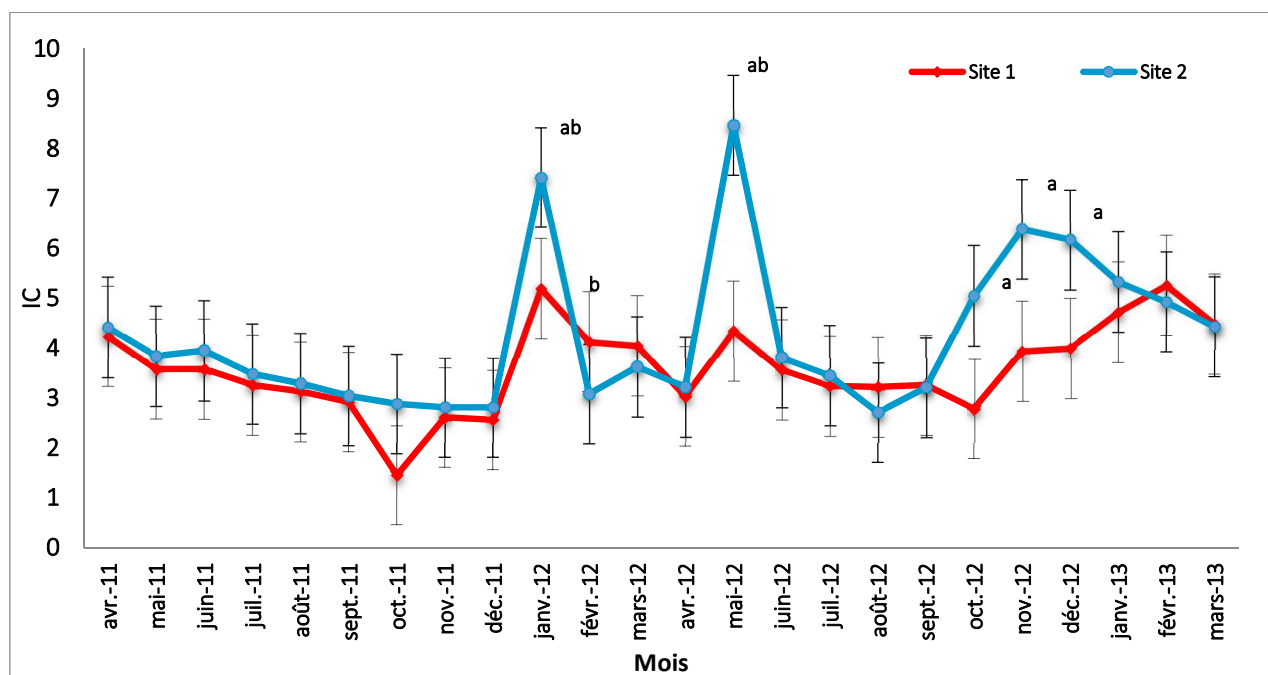


Figure 28 : Evolution de l'indice de condition des moules ($n=30$ individus) prélevées à Menzel Abdelrahmen (Site 1) et à la baie des carrières (Site 2) entre avril 2011 et mars 2013. Les lettres a, b indiquent une différence spatio-temporelle significative (ANOVA, et Duncan) : a $p<0,05$; b $p<0,05$.

De plus la variation de l'IC peut être liée à des paramètres distincts des fluctuations naturelles du climat, l'IC peut être en lien avec le niveau de bioaccumulation des contaminants

organiques et des métaux traces. Il a été démontré qu'il existe une relation linéaire inversement proportionnelle entre le facteur de concentration des métaux traces et l'indice de condition (Andral et al., 2007).

Le profil de variation de l'indice de condition montre deux pics importants et séparés qui sont significativement plus importants chez les moules de la baie des carrières (site 2) en comparaison avec le site Menzel Abdelrahmen (site1). Le premier pic a été enregistré en janvier 2012 et le deuxième en mai 2012 avec une valeur de 5,18 et 4,38 chez les moules de Menzel Abdelrahmen (site 1) et de 7,4 et 8,46 chez les moules de la baie des carrières (site 2). Cette augmentation brusque de l'IC est suivie d'une chute brutale du même indice correspond à deux pontes successives.

De même on constate une troisième ponte qui est toujours significativement plus prononcée chez les moules de la baie des carrières (site 2) et qui semble être différente par rapport aux deux premières, car elle est plus stable et se maintient plus longtemps (pendant 3 mois) à partir de octobre 2012 jusqu'à décembre 2012. Ce résultat indique que la prise de poids (liée à la croissance et/ou à la maturation gonadique) des moules est meilleure à l'entrée du chenal qui relie la lagune à la mer méditerranée qu'à l'intérieur de la lagune. L'indice de condition varie en fonction de la disponibilité de la nourriture et la qualité de l'alimentation (Mougraud et al., 2002). L'indice de condition (IC), qui est très souvent utilisé pour qualifier l'état physiologique des bivalves, est considéré comme l'un des meilleurs indicateurs de l'état général des organismes pour les études environnementales (Hyotylanen et al., 2002). Le profil de variation de l'indice de condition sur les deux ans d'étude semble être répétitif d'une année à l'autre avec des variations liées éventuellement aux facteurs environnementaux (saisonniers). La diminution de l'indice de condition des moules prélevées des deux sites en octobre 2011, avril 2012 et octobre 2012 pourrait témoigner d'un stress éventuel lié soit à une contamination chimique ou à une ponte.

2. L'indice gonadique

En général, le cycle de reproduction des moules varie d'une région à l'autre et d'une année à l'autre. Il est lié à des facteurs biotiques et abiotiques qui se combinent chaque saison. En Tunisie, la ponte des moules est essentiellement hivernale avec des pontes secondaires de plus faible amplitude le long de l'année, en effet, la ponte peut être déclenchée par des facteurs

tels que la variation de la quantité des nutriments présente dans l'eau ou des changements brutaux de la température de l'eau (Banni et al., 2011).

Le suivi du cycle de reproduction chez *Mytilus galloprovincialis* provenant de deux sites différents de la lagune de Bizerte pendant deux ans montre que la gamétogenèse présente des fluctuations comparables sur les deux sites. En effet, nos résultats montrent que l'indice gonadique montre que la gamétogénèse est active tout au long de l'année chez les moules de la lagune de Bizerte (Figure 29). L'IG peut être supérieur sur un site pendant quelques mois puis devient supérieur sur l'autre site les mois suivants. L'effort de reproduction apparaît donc synchronisé et similaire sur les deux sites avec des pics en janvier 2012, avril 2012 et janvier 2013. Ces trois pics rappellent les trois périodes de pic de l'indice de condition (janvier 2012, Mars 2012, Novembre 2012) mais de manière moins contrastée. Les périodes de maturation et pontes semblent donc contribuer au déclenchement de l'effort métabolique mais elles ne suffisent pas à expliquer les trois pics d'IC et surtout une telle différence entre les deux sites.

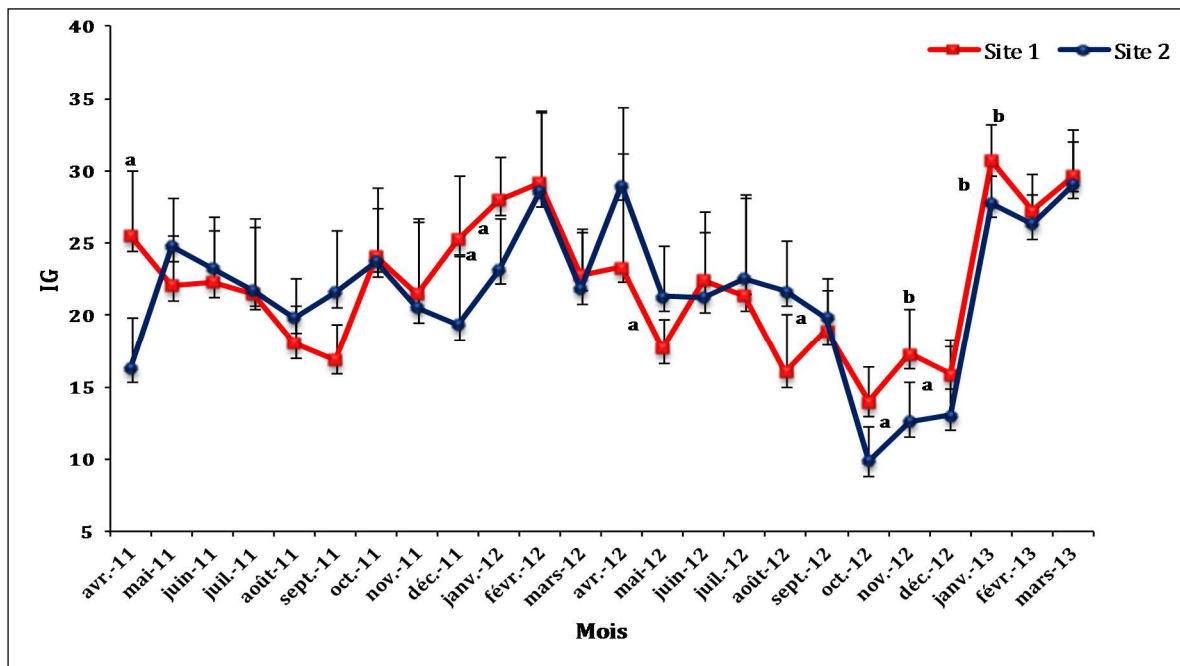


Figure 29 : Variation des indices gonadiques chez la moule *Mytilus galloprovincialis* prélevée de deux sites dans la lagune de Bizerte au cours de la période Avril 2011-Mars 2013($n=30$). Les lettres a, b indiquent une différence spatio-temporelle significative (ANOVA, et Duncan) : a $p < 0,05$; b $p < 0,05$.

Le profil de variation de l'IG apparaît complémentaire de l'IC et l'IG spécifique de la reproduction est un second paramètre physiologique robuste qui est pris en considération pour

l'interprétation des biomarqueurs notamment pour les deux périodes plus contrastées de l'IG entre avril 2011 et Mars 2013.

A Menzel Abdelrahmen (Site 1), les moules sont plus matures en hiver, les valeurs les plus élevées de l'IG ont été enregistrées en février 2012 (29,13), en janvier 2013 (30,7) et en mars 2013 (29,7). Chez la même population, l'indice diminue en automne avec des valeurs de 16,9 en septembre 2011 et 13,9 en octobre 2012. Pour les moules de la baie des carrières (Site 2), l'indice est plus ou moins stable durant la période d'étude mais représentant des pics asynchroniques, le premier pic (24,7) enregistré en mai 2011, le deuxième pic en février 2012 (28,6) coïncide avec une élévation de l'indice chez les moules du site 1, ce deuxième pic est suivi d'une hausse de l'indice (29) en avril 2012. Le troisième pic de l'indice (29,1) en mars 2013 est synchronisé avec un le deuxième pic chez les moules de Menzel Abdelrahmen. Une chute significative (9,9) de l'indice a été enregistrée en octobre 2012.

L'effort de reproduction est considérablement coûteux en énergie chez les bivalves. Des modifications hormonales et énergétiques importantes ont lieu, durant le cycle reproducteur et avec les transferts des réserves du soma vers les gonades. Ces phénomènes, principalement gouvernés par les changements de température du milieu (de même que les variations saisonnières de la disponibilité en nourriture), sont susceptibles de modifier la physiologie entière d'un individu au fil des mois. Il est donc raisonnable de penser que les systèmes de détoxification et autres systèmes de défense peuvent être également affectés par l'effort de reproduction, et ainsi influencer la réponse d'un grand nombre de biomarqueurs (Sheehan et Power, 1999).

III. La bioaccumulation des composés chimiques dans la glande digestive des moules

La bioaccumulation de composés chimiques par les organismes aquatiques, en particulier les moules, est un critère important dans l'évaluation des risques environnementaux. Elle résulte de la biodisponibilité des polluants chimiques dans l'eau et elle peut influencer les effets biologiques. Ainsi, une évaluation du taux d'accumulation des métaux traces, des hydrocarbures aromatiques (HAPs) et des polychlorobiphényles (PCBs) dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* provenant de la lagune de Bizerte constitue une étape indispensable et complémentaire aux paramètres physiologiques tels que l'IC et l'IG.

1. Teneurs en métaux traces

Mytilus galloprovincialis est un bivalve largement reconnu comme bioindicateur de pollution par les métaux. La teneur en métaux dépend étroitement de leur biodisponibilité et de leur mode de pénétration. Cette espèce concentre les métaux présents dans l'eau de mer aussi bien à partir de la phase dissoute (branchies) que particulaire (via l'incorporation de nourriture). Les valeurs des concentrations en métaux traces mesurées durant un cycle saisonnier (avril 2011 à février 2012) dans la glande digestive de *M.galloprovincialis* prélevées de Menzel Abdelrahmen (site 1) et de la baie des carrières (site 2) sont présentées dans la figure 30.

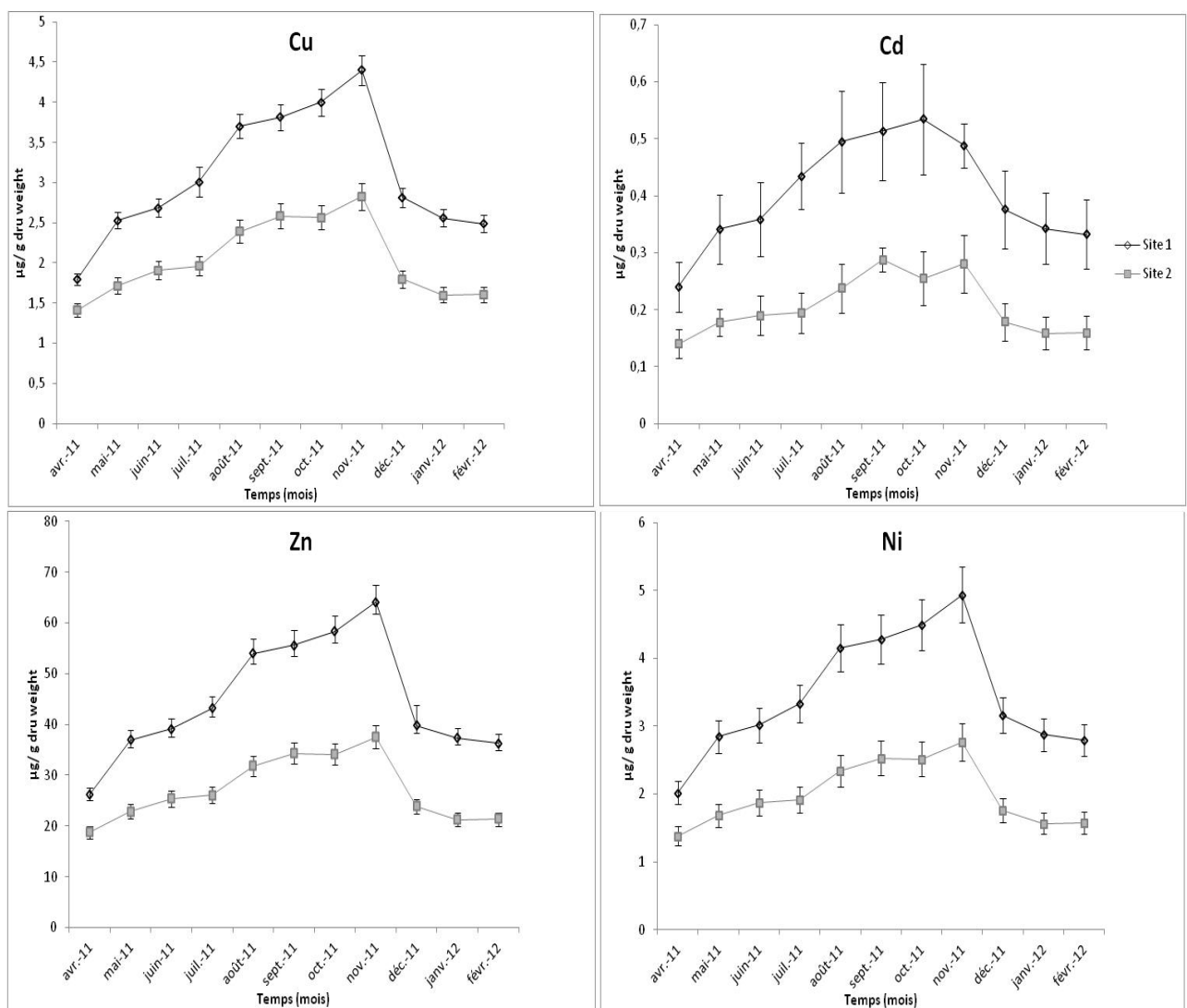


Figure 30 : Variation de la teneur en métaux traces (Cu, Cd, Zn et Ni) dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* provenant de deux sites de la lagune de Bizerte ; Menzel Abdelrahmen (site 1) et la baie des carrières (site 2) entre avril 2011 et février 2012.

Pour l'ensemble des quatre métaux mesurés, notamment le cuivre (Cu), le cadmium (Cd), le zinc (Zn) et le nickel (Ni), les plus fortes concentrations sont mesurées chez les moules de site 1, de plus les résultats montrent que la variation mensuelle du taux de bioaccumulation des trois métaux (Cu, Zn, Ni) présente le même profil avec un maximum en automne (novembre) et un minimum au mois d'avril, deux périodes lorsque l'IC et l'IG sont les plus faibles. Le profil du cadmium est légèrement décalé avec un pic en octobre.

Le cuivre et le zinc sont deux métaux essentiels qui ont été mesurés dans la glande digestive des moules de site 1 et 2. Les concentrations moyennes de ces deux métaux sont plus élevées chez les moules de Menzel Abdelrahmen tout au long de la période d'étude, avec des concentrations moyennes de $3,1 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec pour le cuivre et de $44,6 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec pour le zinc. Pour le site 2, les concentrations moyennes sont de $2,03 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec pour le cuivre et de $27,01 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec pour le zinc. Au niveau des deux sites, pour le cuivre comme pour le zinc les concentrations les plus élevées ont été mesurées au mois de novembre. Pour le cuivre les valeurs les plus élevées sont de $4,40 \pm 0,18 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec et $2,83 \pm 0,17 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec respectivement pour le site 1 et le site 2, concernant les valeurs les plus élevées en zinc on a mesuré une valeur de $64,11 \pm 3,39 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec et $37,52 \pm 2,30 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec pour le site 1 et 2.

Le cadmium provient principalement des rejets liés à la production d'énergie et aux rejets des stations d'épuration. Les concentrations les plus fortes en cadmium ont été enregistrées chez les moules de Menzel Abdelrahmen (site 1) avec une concentration moyenne de $0,41 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec par rapport à une valeur de $0,21 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec. La concentration la plus élevée en cadmium a été enregistré au mois de septembre avec une valeur de $0,29 \pm 0,02 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec pour les moules du site baie des carrières (site 2) et au mois d'octobre pour les moules provenant du site 1 avec une valeur de $0,53 \pm 0,1 \mu\text{g. g}$ de poids sec.

Le nickel est essentiellement associé à la fabrication d'aciers inoxydables, et à la préparation d'alliages. La concentration moyenne du nickel dans la glande digestive des moules de site 1 est de $3,44 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec, et de $1,99 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec dans la glande digestive des moules de site 2. Au niveau des deux sites le maximum de bioaccumulation du nickel a été observé en automne (octobre et novembre) avec des valeurs de $4,49 \pm 0,37 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec et $4,94 \pm 0,41 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec pour le site 1 et de $2,51 \pm 0,25 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec et $2,77 \pm 0,27 \mu\text{g. g}^{-1}$ de poids sec pour le site 2.

Le suivi de la concentration des métaux traces dans la glande digestive de la moule *Mytilus galloprovincialis* a montré des fluctuations saisonnières similaires sur les deux sites d'étude avec un maximum de bioaccumulation observé en automne et un minimum de bioaccumulation des métaux au printemps. Ces variations saisonnières sont étroitement liées à la disponibilité des métaux dans le milieu. En effet, les variations saisonnières des teneurs des différents métaux suivent celles des indices métalliques quel que soit le site. La reproduction, le développement et la croissance des bivalves dépendent de l'intensité de stockage des matières de réserves, qui varient saisonnièrement pour des raisons principalement physiologiques (Cossa et al., 1980 ; Amiard et al., 2004). Il a été observé chez la moule *Mytilus edulis*, le phénomène de bioaccumulation des métaux lourds pourrait être maximal avant la reproduction et minimal après la ponte lorsque les réserves ont été épuisées au cours de la gamétogenèse. En effet, on a observé au niveau des deux sites de notre étude que les moules bioaccumulent mieux les métaux en automne (octobre et novembre 2011, Figure 30) qui précède la ponte qui se produit en hiver. Ceci est confirmé par les valeurs moyennes de l'IG des moules des deux sites qui diminue durant cette saison.

Tableau 9 : Evolution de la bioaccumulation des métaux traces (Cadmium(Cd) ; Cuivre (Cu), Zinc (Zn) et Nickel (Ni)) au niveau de la glande digestive de *M.galloprovincialis* provenant de deux sites de la lagune de Bizerte. Les résultats ont exprimés en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec.

	Site 1: Menzel Abdelrahmen				Site 2: la baie des carrières			
	Cd	Cu	Zn	Ni	Cd	Cu	Zn	Ni
avr-11	0,24±0,04	1,79±0,07	26,16±1,38	2,01±0,16	0,14±0,03	1,41±0,08	18,72±1,15	1,38±0,13
mai-11	0,34±0,06	2,5±0,11	36,89±1,95	2,84±0,23	0,17±0,02	1,72±0,1	22,84±1,4	1,6±0,16
juin-11	0,35±0,07	2,68±0,11	39,11±2,07	3,01±0,25	0,18±0,03	1,9±0,11	25,35±1,55	1,86±0,18
juil-11	0,43±0,06	3,01±0,19	43,16±2,28	3,32±0,27	0,19±0,04	1,96±0,12	26,03±1,6	1,91±0,13
août-11	0,49±0,09	3,7±0,15	53,96±2,85	4,15±0,34	0,23±0,04	2,39±0,14	31,76±1,95	2,3±0,19
sept-11	0,51±0,09	3,81±0,16	55,58±2,94	4,28±0,35	0,28±0,02	2,58±0,15	34,30±2,1	2,52±0,13
oct-11	0,53±0,1	3,99±0,17	58,27±3,08	4,48±0,37	0,25±0,05	2,56±0,15	34,11±2,09	2,51±0,2
nov-11	0,48±0,04	4,39±0,18	64,10±3,39	4,93±0,41	0,28±0,05	2,82±0,17	37,52±2,3	2,76±0,23
déc-11	0,37±0,07	2,81±0,12	39,81±3,93	3,15±0,26	0,17±0,03	1,79±0,11	23,87±1,46	1,7±0,13
janv-12	0,34±0,06	2,56±0,11	37,31±1,97	2,87±0,24	0,15±0,03	1,6±0,10	21,25±1,3	1,5±0,14
févr-12	0,33±0,06	2,48±0,10	36,26±1,92	2,79±0,23	0,15±0,03	1,6±0,1	21,35±1,31	1,57±0,13

La variation spatio-temporelle du niveau de bioaccumulation des métaux chez les moules de la lagune de Bizerte pourraient être liée à la variation de plusieurs facteurs abiotiques et biotiques, en effet de il a été démontré que de nombreux paramètres peuvent influencer le

comportement des bivalves vis à vis des métaux, en particulier leur absorption, assimilation, excrétion. Parmi les facteurs biotiques, on peut noter les paramètres allométriques (taille et poids), la part du phytoplancton dans la nourriture, le temps de résidence des matières ingérées dans le tube digestif, le sexe et les cycles de reproduction, l'oxygénation de l'organisme ; et parmi les facteurs abiotiques : les variations saisonnières et notamment celles de la température, le carbone organique dissous et particulaire, les substances humiques et fulviques, le type de sédiments, la part de la phase dissoute et particulaire dans la nourriture (Laurier, 2001).

La toxicité des métaux est plus marquée lorsque leurs concentrations approchent des limites supportées par ces organismes. Leur toxicité dépend de la concentration du métal, de sa biodisponibilité et de sa toxicité intrinsèque, de la capacité d'adhérence, de la spécificité du système biologique au transport du métal et de la biotransformation du métal en formes dérivées parfois plus toxiques (Kiss, et al., 1996). La toxicité des métaux vis-à-vis des organismes vivants dépend de leur nature, leur mode d'action, leur spéciation et donc de leur biodisponibilité (Alzieu, 1999).

La contamination métallique peut avoir des effets néfastes chez les organismes aquatiques après assimilation et accumulation (Cajaraville et al., 2000 ; Funes et al., 2006). Toutefois, les métaux n'ont pas tous le même impact sur la santé des mollusques bivalves : certains (cuivre, zinc) sont essentiels à faible dose et nocifs à forte dose, et d'autres nocifs même à faible dose (cadmium et arsenic) (Van der Velde, et al., 1992). Il a été démontré que, en excès le zinc devient un élément prooxydant en induisant la formation indirecte des radicaux libres (Sensi et Jeng 2004), et en inhibant l'activité enzymatique de certaines enzymes antioxydantes telles que la glutathion réductase et peroxydase (Splittgerber et Tappel 1979). L'entrée du cuivre dans la cellule se fait essentiellement par des mécanismes qui dépendent des canaux membranaires. L'accumulation du cuivre dans la cellule est à l'origine d'une cytotoxicité, qui se manifeste par une inhibition enzymatique du système pyruvate-oxydase, la glucose-6-phospho-déshydrogénase et la glutathion-réductase sont inhibés proportionnellement à la concentration intracellulaire du cuivre (Barceloux, 1999). Le cadmium, induit de façon indirecte la production des espèces réactives de l'oxygène et la peroxydation lipidique par interférence avec les systèmes antioxydants. Il est également décrit comme inhibiteur de la réparation des lésions de l'ADN (Waisberg et al., 2003).

2. Teneurs en Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les valeurs des concentrations en HAPs (14 congénères) dosées pendant onze mois (avril 2011- février 2012) dans la glande digestive des moules prélevées mensuellement des deux sites d'étude sont présentées dans les tableaux 10-11. D'une manière générale, les plus fortes concentrations en HAPs totaux ont été mesurées dans les glandes digestives des moules provenant du site de Menzel Abdelrahmen (Site 1). C'est un site qui se caractérise par des eaux stagnantes, alors que les eaux du site 2 situé au niveau du canal reliant la lagune à la mer se caractérisent par une courantologie plus dynamique et un renouvellement d'eau plus important qu'au niveau du site 1. Sur un total de quatorze de HAPs dosés, quatre HAPs (acénaphthylène, acénaphthène, anthracène et le dibenzo [a, h] anthracène) ne sont pas identifiés ou présents à un niveau inférieur au seuil limite de détection dans les moules prélevées des deux sites. Le chrysène, le benzo [b] fluoranthène et le benzo[a,h,i] pyrylène ne sont pas détectés dans les glandes digestives des moules prélevées du site baie des carrières (Site 2), et sont présents à des quantités détectables au niveau des moules provenant du site 1.

Les HAPs ont pour origine les divers processus de combustion ou de pyrolyse de la matière organique (industries, gaz d'échappement), les produits pétroliers, voire pour certains d'entre eux une origine naturelle (pérylène par exemple). Les concentrations totales en HAPs vont de $1 \pm 0,13 \mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$ au mois de février à $2,03 \pm 0,35 \mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$ au mois d'août dans les glandes digestives du site 1 et de $0,19 \pm 0,03 \mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$ en janvier à $0,77 \pm 0,11 \mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$ dans les moules du site 2. Ces niveaux nous permettent de qualifier ces sites comme moyennement contaminés pour les fortes valeurs.

En outre, on constate que les valeurs maximales sont mesurées pendant la période estivale et les valeurs minimales en hiver, ceci montre que les moules dans la lagune de Bizerte bioaccumulent plus les HAPs pendant les mois les plus chaud de l'année avec un facteur égale à 2 chez les moules du site 1 et un facteur de 4 chez les moules du site 2. Ceci est probablement lié avec une forte activité trophique au cours de cette période de l'année. En effet, Banni et al (2011) ont rapporté une forte induction des gènes liés au métabolisme cellulaire chez la moule *Mytilus galloprovincialis* en provenance de la lagune de Bizerte de mai à août.

Nos résultats montrent que la bioaccumulation des HAPs totaux au niveau de la glande digestive de la moule *M.galloprovincialis* de la lagune de Bizerte est plus élevée par rapport aux valeurs enregistrées chez différentes espèces de bivalves (*Cerastoderma glaucum*, *Ostrea*

Edulis et *Pinna nobilis*) prélevées de la lagune de Mar Menor située sur la façade méditerranéenne des côtes espagnoles ; ces valeurs varient de $8.98 \cdot 10^{-3} \mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$ à $0.37 \mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$ (V.M León et al., 2013).

Des valeurs encore plus faibles des taux de bioaccumulation des HAPs totaux dans les tissus de *Mytilus galloprovincialis* ont été enregistrées sur les côtes méditerranéennes françaises ; les valeurs les plus significatives ont été enregistrées dans la petite rade de Toulon ($81 \cdot 10^{-3} \mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) et dans le goulet de Bonifacio ($73,1 \cdot 10^{-3} \mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$), et dans plusieurs lagunes languedociennes, notamment La Peyrade ($128 \cdot 10^{-3} \mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) qui présente la concentration la plus élevées, mais aussi l'étang du Grec ($101,1 \cdot 10^{-3} \mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) et l'étang de Berre ($109,8 \cdot 10^{-3} \mu\text{g.g}^{-1}\text{dw}$) (Réseau RINBIO 2009).

Tableau 10 : Evolution de la bioaccumulation des HAPs dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* provenant de Menzel Abdelrahmen (site 1) dans la lagune de Bizerte entre avril 2011 et février 2012 (n= 3 pools).

	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février
Acenaphtylene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Acenaphtene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Naphthalene	0,07 ±0.01	0,1±0.01	0,15±0.04	0,15±0.02	0,16±0.03	0,15±0.03	0,14±0.02	0,15±0.03	0,11±0.01	0,12±0.01	0,11±0.01
Phenanthrene	0,09±0.01	0,11±0.01	0,12±0.01	0,17±0.04	0,14±0.03	0,14±0.02	0,11±0.01	0,15±0.02	0,09±0.01	0,13±0.01	0,11±0.01
Anthracene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Fluoranthene	0,21±0.08	0,19±0.03	0,22±0.04	0,25±0.04	0,2±0.04	0,14±0.02	0,18±0.02	0,19±0.02	0,16±0.03	0,15±0.03	0,14±0.02
Pyrene	0,22±0.07	0,22±0.04	0,21±0.05	0,2±0.04	0,21±0.04	0,16±0.02	0,14±0.03	0,18±0.03	0,15±0.02	0,16±0.03	0,15±0.03
Benzo(a)anthracene	0,13±0.03	0,25±0.04	0,24±0.04	0,19±0.04	0,28±0.06	0,2±0.03	0,19±0.03	0,18±0.02	0,12±0.01	0,18±0.02	0,11±0.01
Chrysene	0,09±0.01	0,11±0.02	0,15±0.02	0,14±0.02	0,16±0.02	0,1±0.01	0,09±0.01	0,11±0.01	0,08±0.01	0,07±0.01	0,07±0.01
Benzo(b)fluoranthene	0,11±0.01	0,14±0.01	0,19±0.03	0,17±0.03	0,19±0.04	0,13±0.02	0,12±0.02	0,14±0.02	0,1±0.01	0,11±0.01	0,1±0.01
Benzo(e)Pyrene	0,07±0.01	0,09±0.01	0,12±0.01	0,12±0.02	0,13±0.01	0,09±0.01	0,11±0.01	0,08±0.01	0,07±0.01	0,07±0.01	0,1±0.01
Benzo(a)Pyrene	0,17±0.03	0,22±0.03	0,3±0.07	0,28±0.05	0,31±0.05	0,25±0.04	0,19±0.03	0,21±0.03	0,13±0.02	0,1±0.01	0,12±0.02
Benzo(g,h,i)Perylene	0,18±0.02	0,2±0.04	0,28±0.07	0,25±0.04	0,25±0.03	0,18±0.03	0,15±0.02	0,17±0.03	0,12±0.01	0,11±0.01	0,09±0.01
dibenzo[a,h]anthracene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
ΣPAHs	1,34	1,63	1,98	1,9	2,03	1,54	1,42	1,56	1,13	1,38	1

Tableau 11 : Evolution de la bioaccumulation des HAPs dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* provenant de la baie des carrières (site 2) dans la lagune de Bizerte entre avril 2011 et février 2012 (n= 3 pools).

	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février
Acenaphtylene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Acenaphtene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Naphthalene	<DL	<DL	0,06±0.01	0,07±0.01	0,08±0.01	0,07±0.01	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Phenanthrene	<DL	<DL	0,08±0.01	0,07±0.01	0,06±0.01	0,07±0.01	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Anthracene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Fluoranthene	0,14±0.01	0,18±0.05	0,17±0.02	0,16±0.02	0,11±0.02	0,11±0.01	0,14±0.02	0,14±0.02	0,06±0.01	0,06±0.01	0,07±0.01
Pyrene	0,15±0.01	0,15±0.04	0,15±0.03	0,15±0.02	0,1±0.01	0,13±0.01	0,16±0.02	0,18±0.02	0,08±0.01	0,07±0.01	0,05±0.01
Benzo(a)anthracene	0,18±0.01	0,19±0.04	0,14±0.03	0,15±0.03	0,12±0.02	0,13±0.02	0,13±0.02	0,16±0.02	0,08±0.01	0,06±0.01	0,08±0.01
Chrysene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Benzo(b)fluoranthene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Benzo(e)Pyrene	<DL	0,06±0.01	0,06±0.01	0,08±0.01	0,09±0.01	0,08±0.01	0,08±0.01	0,07±0.01	0,07±0.01	<DL	<DL
Benzo(a)Pyrene	<DL	0,08±0.01	0,1±0.01	0,09±0.01	0,09±0.01	0,08±0.01	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Benzo(g,h,i)Perylene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
dibenzo[a,h]anthracene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
ΣPAHs	0,47	0,66	0,76	0,77	0,65	0,54	0,51	0,55	0,29	0,19	0,2

3. Teneurs en Polychlorobiphényles (PCBs)

Les PCBs sont considérés parmi les polluants majeurs de la lagune de Bizerte, en effet des travaux antérieurs menés dans la lagune de Bizerte ont démontré une contamination significative des eaux et des sédiments de la lagune par les PCBs (Trabelsi et al., 2005). Dans ce contexte, le taux d'accumulation de 11 congénères de PCBs ont été mesurés dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* provenant des deux sites d'étude de la lagune de Bizerte (Site 1 : Menzel Abdelrahmen et Site 2 : baie des carrières). Lors de cette étude menée pendant un cycle d'avril 2011 à février 2012. Les congénères les plus chlorés montrent les valeurs les plus élevées dans la glande digestive des moules vivant dans la lagune de Bizerte : les congénères pentachlorés (PCBs 118), hexachlorés (PCBs 138 et PCBs 153) et heptachlorés (PCBs 180) représentent un pourcentage entre 55 et 70% de la somme des PCBs. Les abondances relatives des PCBs présentent une empreinte caractéristique qui indique une source de contamination de même origine sur les deux sites dans la lagune de Bizerte.

Les concentrations les plus élevées ont été mesurées dans les glandes digestives des animaux prélevés du site 1 (Menzel Abdelrahmen) (Tableau 12) par rapport à celles du site 2 (Tableau 13). Les résultats montrent que la bioaccumulation des PCBs est plus importante en hiver. Au niveau du site Menzel Abdelrahmen la valeur la plus élevée a été mesurée au mois de janvier ($134,95 \text{ ng.g}^{-1}\text{dw}$) et la valeur minimale en octobre ($85,54 \text{ ng.g}^{-1}\text{dw}$). Les moules prélevées sur le site de la baie des carrières (Site2) montrent un maximum de bioaccumulation au mois de décembre avec une valeur de $84,45 \text{ ng.g}^{-1}\text{dw}$ alors que la valeur la plus faible $59,21 \text{ ng.g}^{-1}\text{dw}$ a été mesurée en septembre. La variation temporelle de la bioaccumulation des PCB au niveau de la glande digestive de *M. galloprovincialis* prélevée de deux sites différents dans la lagune de Bizerte semble avoir le même profil de variation avec un maximum pendant la période hivernale (décembre et janvier pour le site 2 et le site 1 respectivement) et un minimum de bioaccumulation en automne (septembre et octobre pour le site 2 et le site 1 respectivement).

D'une manière générale, à l'échelle méditerranéenne ; les niveaux de bioaccumulation des PCBs dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* de la lagune de Bizerte sont inférieurs aux valeurs enregistrées dans les tissus de trois espèces de bivalves (*Cerastoderma glaucum*, *Ostrea Edulis* et *Pinna nobilis*) prélevées de la lagune de Mar Menor située sur la façade méditerranéenne des côtes espagnoles ; les valeurs varient de $0,15.10^3 \text{ ng.g}^{-1}\text{dw}$ à $42,36.10^3 \text{ ng.g}^{-1}\text{dw}$. En outre, nos résultats montrent que la somme des congénères de PCBs

dans la glande digestive des moules est plus importante dans la lagune de Bizerte en comparaison aux données de la campagne 2009 du réseau RINBIO avec des valeurs qui ne dépassent pas 44,35 ng.g⁻¹dw dans la petite rade de Toulon, 23,95 ng.g⁻¹dw et 22,27 ng.g⁻¹dw respectivement dans les tissus de moules *Mytilus galloprovincialis* dans les étangs La Peyrade et Grec.

La détermination des concentrations des contaminants chimiques (métaux lourds, HAPs et PCBs) dans la glande digestive des moules nous renseigne sur le type et la biodisponibilité des polluants présents dans la lagune de Bizerte, et nous permet de classer les deux sites d'étude selon leurs niveaux de contamination chimique, en considérant le site 1 de Menzel Abdelrahmen comme le site le plus pollué. D'autre part, la quantification de ces substances constitue une preuve évidente d'exposition dont les effets sur les paramètres biologiques et physiologiques de *Mytilus galloprovincialis* seront évalués dans la suite du travail.

Par conséquence, les variations saisonnières des concentrations des différents contaminants chimiques dans la moule pourraient être la conséquence d'une combinaison de facteurs directement corrélés au poids (cycles sexuels, abondance de nourriture, température), mais aussi d'autres, plus indépendants, tels que la modification du cycle biogéochimique et de la biodisponibilité des métaux. Par ailleurs, les eaux marines en période hivernale pourraient être enrichies en éléments nutritifs par le biais de la production phytoplanctonique. Cette production pourrait être contaminée par les polluants chimiques relargués par les sédiments et ceux issus des rejets anthropique. De cette manière, ces éléments nutritifs contaminés et disponibles pendant la période de stockage pourraient être à l'origine de l'augmentation des teneurs des contaminants chimiques dans les tissus de moules.

Tableau 12 : Evolution de la bioaccumulation des PCBs dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* provenant de Menzel Abdelrahmen (site 1) dans la lagune de Bizerte entre avril 2011 et février 2012 (n= 3 pools).

	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février
Contenue en lipides %	19,91	21,80	23,11	25,98	26,11	24,32	19,38	15,11	17,88	12,24	14,65
PCB-18	0,47	0,44	0,48	0,53	0,28	0,30	0,29	0,43	0,29	0,47	0,26
PCB-28+31	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
PCB-52	1,56	1,44	1,60	1,79	0,93	0,86	0,90	1,36	1,45	1,91	1,08
PCB-44	1,09	1,68	1,11	1,24	0,64	0,82	0,69	1,05	1,11	1,52	0,86
PCB-101	10,32	9,54	10,57	11,80	9,94	8,32	7,37	11,15	11,82	16,66	9,40
PCB-118	9,47	8,72	9,71	8,52	9,44	8,51	7,21	10,92	11,57	17,52	9,89
PCB-149	4,03	3,71	4,13	4,61	8,52	3,18	2,70	4,08	4,32	6,52	3,68
PCB-138	10,64	9,80	10,91	12,17	13,97	9,41	7,98	12,07	12,79	18,41	17,22
PCB-153	16,55	16,98	18,12	16,39	20,09	17,51	24,63	28,28	22,35	29,45	25,38
PCB-180	18,46	21,59	18,92	17,26	16,30	14,11	13,00	19,68	20,86	26,80	24,26
PCB-194	2,17	2,56	2,23	2,48	2,05	1,64	1,39	2,10	2,22	3,45	1,95
ΣPCBs	94,67	98,25	100,89	102,77	108,26	88,96	85,54	106,23	106,67	134,95	108,63

Tableau 13 : Evolution de la bioaccumulation des PCBs dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* provenant de la baie des carrières (site 2) dans la lagune de Bizerte entre avril 2011 et février 2012 (n= 3 pools).

	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février
Contenue en lipides %	18,80	22,50	23,87	26,77	27,65	26,11	20,65	15,89	16,84	13,09	14,87
PCB-18	0,27	0,23	0,27	0,26	0,20	0,17	0,21	0,33	0,35	0,23	0,20
PCB-28+31	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
PCB-52	0,92	0,78	0,90	0,88	0,66	0,53	0,66	1,05	1,09	0,96	0,83
PCB-44	0,64	0,54	0,62	0,61	0,47	0,41	0,51	0,81	0,84	0,76	0,66
PCB-101	6,07	5,15	5,92	5,84	4,51	4,33	5,40	8,56	8,94	8,33	7,23
PCB-118	5,58	4,73	5,44	5,36	4,14	4,24	5,29	8,38	8,75	8,76	7,61
PCB-149	2,37	2,01	2,31	2,28	1,76	1,58	1,98	3,13	3,27	3,26	2,83
PCB-138	6,27	5,31	6,11	6,02	4,65	4,69	5,85	9,27	9,68	9,21	7,99
PCB-153	14,83	14,01	19,38	18,30	13,63	8,70	12,77	18,59	17,23	17,01	17,38
PCB-180	10,87	9,22	10,60	10,45	10,24	7,64	9,53	15,11	15,78	15,44	13,41
PCB-194	1,28	1,08	1,25	1,23	0,95	0,82	1,02	1,61	1,68	1,73	1,50
ΣPCBs	67,90	65,57	76,67	78,01	68,86	59,21	63,85	82,73	84,45	78,77	74,52

IV. Évaluation de la variabilité saisonnière des biomarqueurs chez *Mytilus galloprovincialis* pendant un cycle de deux ans

Les marqueurs de stress général

1. Le stress *on stress*

L'évaluation du temps de survie peut nous révéler l'état de santé général des moules quand elles sont exposées à l'air (Viarengo et al., 2007). Le stress est généralement définie comme étant une altération mesurable des mécanismes biochimiques et / ou physiologiques induites par un ou plusieurs facteurs de l'environnement et qui se traduit par la réduction de la capacité d'adaptation aux conditions de l'environnement (Bayne et al., 1985).

Les résultats du test stress *on stress* réalisé sur *M. galloprovincialis* provenant de Menzel Abdelrahmen (Site 1) et de la baie des carrières (Site 2) entre avril 2011 et avril 2012 sont présentés dans la Figure 31.

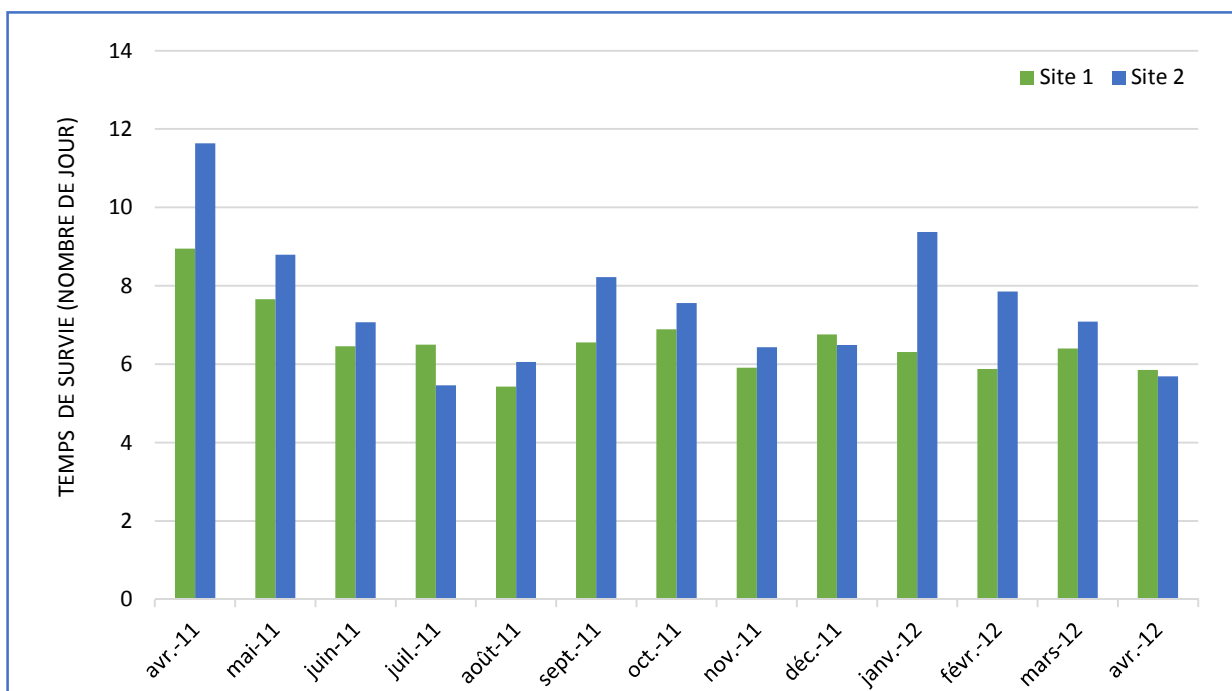


Figure 31 : Temps de survie des moules prélevées de Menzel Abdelrahmen (Site 1) et de la baie des carrières (Site 2) dans la lagune de Bizerte, n=30.

Les résultats montrent une évolution globale comparable suivant un cycle d'un an et ne présentant pas de différences significatives entre les deux sites d'étude. Le temps de survie des

moules provenant de Menzel Abdelrahmen (Site 1) est plus court que celui des moules de la baie des carrières (Site2). Les résultats de l'analyse statistique montrent que les moules du Site 2 sont plus résistantes par rapport à celles du Site 1 pendant avril 2011, septembre 2011, janvier et février 2012. De plus, on constate une baisse de la capacité de survie chez les moules provenant des deux sites au cours de la période estivale (juin, juillet et août), illustrant ainsi une plus grande sensibilité liée à un effort d'adaptation stimulé par l'élévation rapide de température entre juin (19,6°C) et juillet (26°C) puis l'atteinte d'un maximum en août (29°C).

Le stress *on stress* constitue un marqueur physiologique qui intègre de manière très globale l'ensemble des facteurs de stress qui influencent l'état physiologique des moules. Non spécifique, le stress *on stress* apparaît particulièrement sensible aux élévations de températures estivales. On peut conclure, la plus forte concentration des polluants organiques et des métaux traces bioaccumulés au niveau de la glande digestive des moules du Site 1, pourrait également influencer la capacité de résistance des moules.

2. La stabilité des membranes lysosomales

La variation mensuelle de la stabilité des membranes lysosomales dans les hémocytes de moules prélevées de Menzel Abdelrahmen (Site 1) et de la baie des carrières (Site 2) entre février 2012 et août 2012 est illustrée dans la Figure 32. Tout au long de la période d'étude, une forte variabilité caractérise ce paramètre spécifique de la physiologie générale de la cellule et de sa capacité de défense immunitaire. Toutefois, il est difficile de dégager des tendances significatives sur une période de sept mois qui n'intègre pas le cycle saisonnier d'étude complet. Cependant une différence significative intersites du temps de rétention du rouge neutre (RRN) par les lysosomes des hémocytes est observée sur toute la période d'étude. Une décroissance progressive est mesurée de février à août 2012 sur le site 1. Celle-ci semble liée à l'élévation de température qui apparaît comme un paramètre pertinent qui influence la réponse physiologique globale. Le site 2 de la baie des carrières fait apparaître un cycle différent, passant par un pic en avril 2012. Le temps de RRN est significativement plus élevé au niveau des lysosomes des moules prélevées de la baie des carrières (Site 2) avec une moyenne de $73,7 \pm 17,9$ minutes. Concernant la variation mensuelle, une diminution significative du temps de RRN est observée en juillet ($34,5 \pm 10,12$ et $49,5 \pm 10,12$ minutes respectivement dans le site 1 et le Site 2) et en août ($36 \pm 10,48$ et $48 \pm 9,48$ minutes respectivement dans le site 1 et le site 2) au niveau des deux sites étudiés.

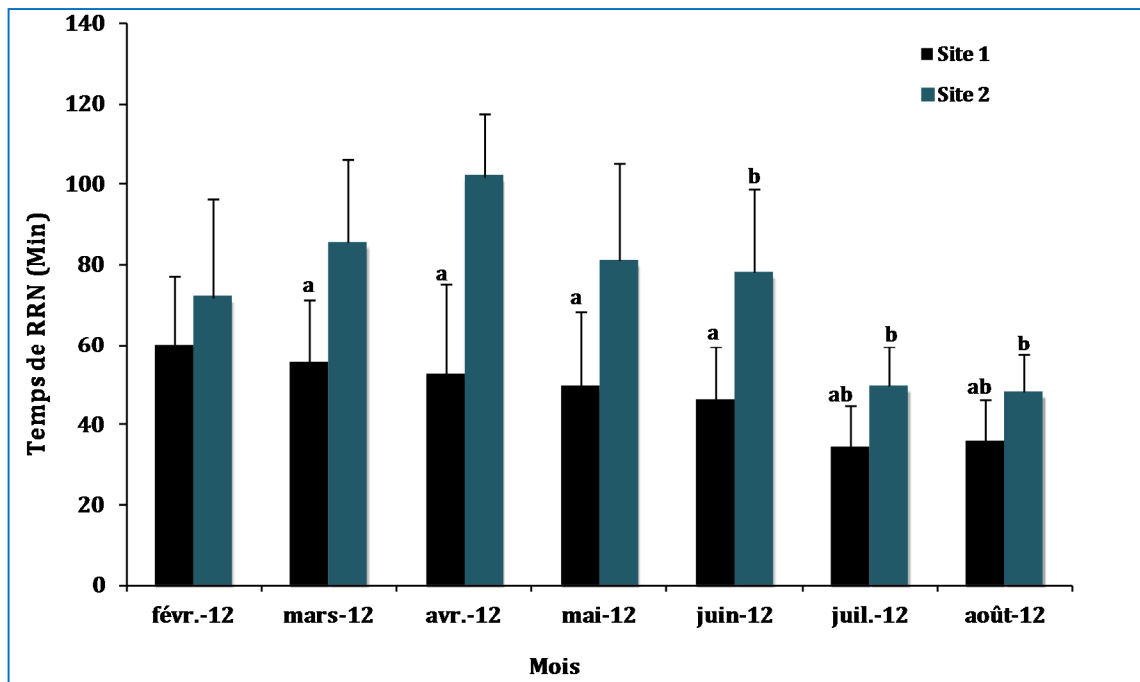


Figure 32 : Evolution de la stabilité des membranes lysosomales dans les hémocytes de moules ($n=10$ individus) prélevées à Menzel Abdelrahmen (Site1) et à la baie des carrières (Site 2) entre février 2012 et août 2012. Les lettres a,b indiquent une différence spatio-temporelle significative (ANOVA, et Duncan) : a $p<0,05$; b $p<0,05$.

Les membranes lysosomales des hémocytes prélevés chez les moules de la baie des carrières (Site2) semblent être plus stables en comparaison avec celles du site Menzel Abdelrahmen (Site1). Cette différence pourrait être due à une variation intersites du niveau de la contamination chimique. L'accumulation des xénobiotiques et/ou de leurs métabolites à l'intérieur des lysosomes des organismes aquatiques réduit la stabilité des membranes lysosomales et peut induire l'hydrolyse des enzymes lysosomiales dans le cytosol. Ainsi, la mesure de la stabilité de la membrane lysosomale a été proposée en tant que biomarqueur d'effet (Moore, 1998 ; Galloway et al., 2002) sensible à diverses classes de polluants chez les organismes aquatiques, en particulier chez les mollusques bivalves. La mesure de la stabilité lysosomale est un moyen indirect qui nous permet d'évaluer l'exposition des organismes aux contaminants de l'environnement ; pesticides, métaux lourds, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et polychlorobiphényles (PCBs) (OSPAR Commission, 2007). L'altération de la stabilité des membranes lysosomales peut être considérée comme un indice de dommages cellulaires (Da Ros et Nesto, 2005; Moore et al, 2006, 2007).

Etant donné que la mesure de stabilité lysosomale est une mesure très intégrative, elle est par conséquent, peu spécifique de l'effet d'un xénobiotique en particulier. De plus, en dehors

des contaminants, plusieurs facteurs peuvent affecter la stabilité des membranes lysosomales : hyperthermie, hypoxie (Moore et al., 1980 ; Ringwood et al., 1998 ; Bocchetti & Regoli, 2006 ; Moore et al., 2007). D'autre part, l'un des facteurs confondants majeur est l'étape finale de la gamétogenèse (la ponte), qui constitue un événement particulièrement stressant pour l'animal (Bayne et al., 1978). Nos résultats confirment que la mesure de stabilité lysosomale intègre les divers effets des de stress environnementale et biologiques (Ringwood et al., 1998; Bocchetti et Regoli 2006).

Les enzymes de biotransformation

Chez les moules, de nombreux paramètres ont été étudiés au niveau subcellulaire pour évaluer leurs réponses face à l'exposition aux substances toxiques et leur potentiel en tant que biomarqueurs d'exposition ou d'effet. L'impact des polluants au niveau subcellulaire peut conduire à l'inhibition et/ou l'induction de diverses enzymes impliquées dans le métabolisme et l'excrétion des xénobiotiques. Ces mécanismes de détoxification permettent aux organismes de maintenir leur intégrité face à l'exposition aux polluants. Le suivi de tels changements biochimiques permet de détecter une perturbation avant l'apparition de signes pathologiques irréversibles. Ces changements peuvent être, en ce sens, utilisés comme des systèmes d'alarme précoces d'une exposition toxique.

Les variations saisonnières de l'activité de détoxification chez la moule *Mytilus galloprovincialis* provenant de deux sites différents de la lagune de Bizerte, ont été suivies pendant deux ans et ce en mesurant l'activité de la benzopyrène hydroxylase (BPH) comme enzyme de phase I de biotransformation, la glutathion S-transférase (GST) enzyme de phase II de conjugaison et le taux d'expression de multixénobiotiques résistance (MXR) comme protéine de phase III d'excrétion. L'évolution de la réponse de détoxification étudiée pendant deux cycles saisonniers permet de déterminer l'amplitude de réponse bisannuelle pour chaque activité enzymatique et une interprétation en lien avec des paramètres physiologiques robustes comme l'indice de condition ou l'indice gonadique. La quantification des réponses enzymatiques maximales et minimales suivant deux cycles physiologiques permet également de préciser un seuil de réponse de base (BAC : Background assessment criteria) et un seuil d'effet (EAC : Evaluation assessment criteria) illustrant un effort d'adaptation maximale dans la lagune de Bizerte.

1. L'activité du benzopyrène hydroxylase (BPH) (enzyme de phase I)

L'activité BPH reflète l'activité du Cytochrome P4501A (CYP450 1A), impliqué dans la phase I du métabolisme de biotransformation. L'induction des enzymes du système CYP450 1A (principalement hépatique), joue un rôle clé dans la biotransformation de polluants tels que les dioxines, les PCBs et les HAPs. Ce biomarqueur est utilisé dans le cadre d'étude des effets des polluants dans l'environnement marin chez les vertébrés et les invertébrés. Dans le cadre de ma thèse on a suivi la variation mensuelle de l'activité BPH au niveau de la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* de la lagune de Bizerte (Figure 33).

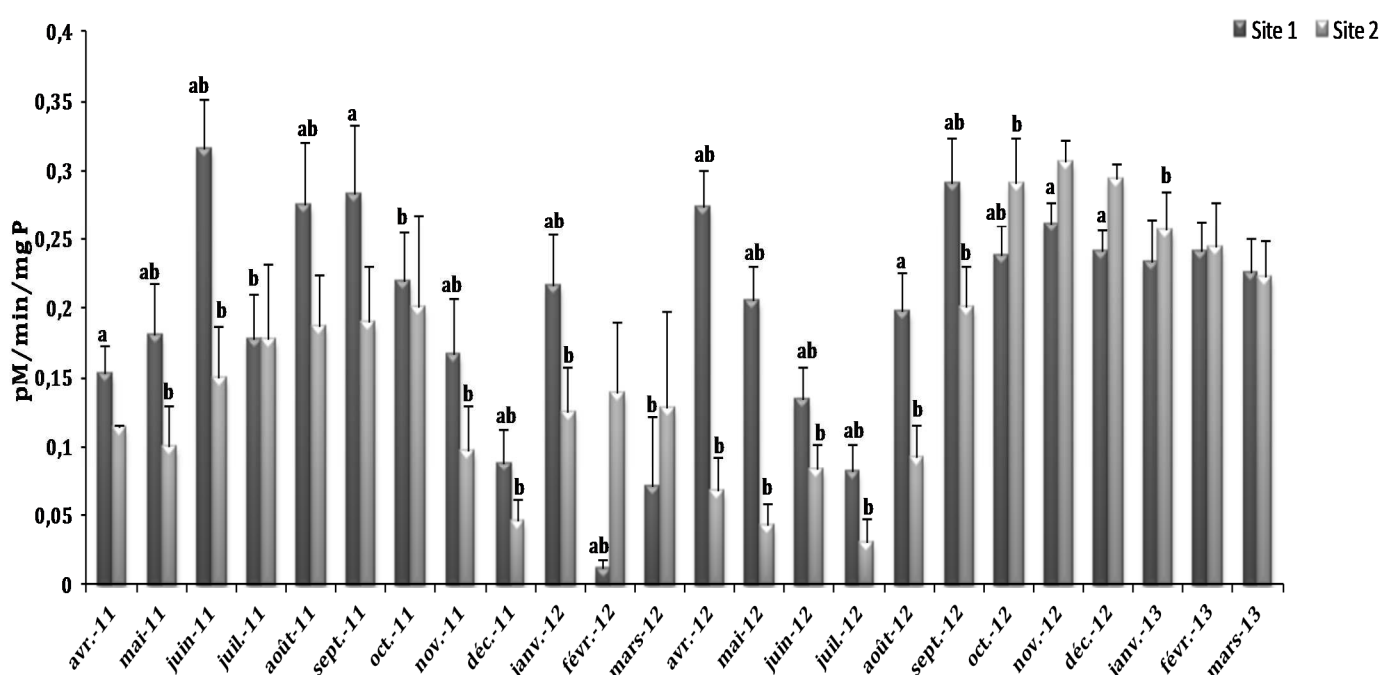


Figure 33 : Evolution de l'activité benzopyrène hydroxylase (moyenne $\pm$ écart type, $n=10$ individus) entre avril 2011 et Mars 2013 mesurée dans la glande digestive de la moule *Mytilus galloprovincialis* provenant de Menzel Abdelrahmen (Site 1) et la baie des carrières (Site 2). Les lettres a et b indiquent une différence spatio-temporelle significative (ANOVA, et Duncan) : a $p<0,05$; b $p<0,05$.

Une variété de xénobiotiques est susceptible d'activer ces systèmes de biotransformation. Ainsi, une augmentation de l'activité BPH témoigne de la présence dans le milieu d'un composé toxique capable d'induire l'activation des mécanismes de détoxification (Snyder, 2000). Néanmoins, le fait que l'activité BPH augmente à Menzel Abdelrahmen et à la baie des carrières pendant la même période plaide en faveur d'une induction des systèmes de détoxification liée à la présence éventuelle de polluants de type hydrocarbures aromatiques polycycliques. L'activité

enzymatique BPH est utilisée en tant que biomarqueur d'exposition aux polluants organiques, en particulier les HAP (Porte et al., 1991; Michel et al., 1994; Solé et al., 1994; Peters et al., 1999; Akcha et al., 2000). Il a été également démontré que plusieurs xénobiotiques tels que les pesticides et les détergents provoquent l'augmentation de l'activité BPH chez les mollusques bivalves (Baturu et Lagadic 1996).

L'évolution de l'activité BPH semble discerner trois périodes distinctes. La première période d'avril 2011 à décembre 2011 illustre des effets plus marqués sur le site 1 avec des différences significatives $p < 0,05$ qui est le plus contaminé et un effort métabolique décrivant une courbe en cloche suivant l'élévation de la température. Cette première période semble donc dépendante des effets combinés de la température et de la contamination. La seconde période semble plus « irrégulière » de janvier 2012 à mai 2012 avec une alternance de valeurs élevées sur les deux sites. Les valeurs les plus élevées sont obtenues en janvier 2012 et avril 2012 sur le site 1, le plus contaminé. Ces valeurs élevées apparaissent exactement pendant les deux pics de l'indice de condition (Figure 33) en janvier et avril 2012. L'effort métabolique produit pendant une forte croissance semble ainsi combinée avec un effet des contaminants. La troisième période de juin 2012 à mars 2013 décrit également une courbe en cloche qui semble indépendante de la température mais plutôt en lien avec l'effort métabolique progressif illustré par l'indice de condition (Figure 30). La mesure de l'activité benzopyrène hydroxylase (BPH) dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* provenant de Menzel Abdelrahmen (Site 1) et de la baie des carrières (Site 2) (Figure 17), a permis de mettre en évidence un effort de régulation métabolique maximum.

2. L'activité de la glutathion S-transférase (GST) (enzyme de phase II)

La variation mensuelle de l'activité glutathion S-transférase mesurée dans de la glande digestive de la moule *Mytilus galloprovincialis* en provenance du site Menzel Abdelrahmen (Site 1) et de la baie des carrières (Site 2) entre avril 2011 et mars 2013 est présentée dans la Figure 34. Sur les deux sites d'étude, le profil général de la variation de la GST semble être répétitif entre les deux cycles saisonniers. Sur les 24 mois de prélèvement, le maximum de l'activité GST a été observé deux fois au mois de mars. Pour la première année l'activité maximale a été mesurée en mars 2012 avec des valeurs de $266,24 \pm 57,23 \mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines et $178,57 \pm 30,78 \mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines respectivement pour le site 1 et le site 2, alors que l'activité minimale est mesurée en décembre avec $66,18 \pm 5,84 \mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines.

$1.\text{mg}^{-1}$ de protéines et $80,97 \pm 19,80 \mu\text{mole}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines respectivement pour le site 1 et le site 2. Pareil pour la seconde année d'échantillonnage le maximum de l'activité de la GST a été mesuré en mars 2013, avec des valeurs de $207,21 \pm 25,39 \mu\text{mole}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines au site 1 et de $171,49 \pm 19,57 \mu\text{mole}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines au site 2.

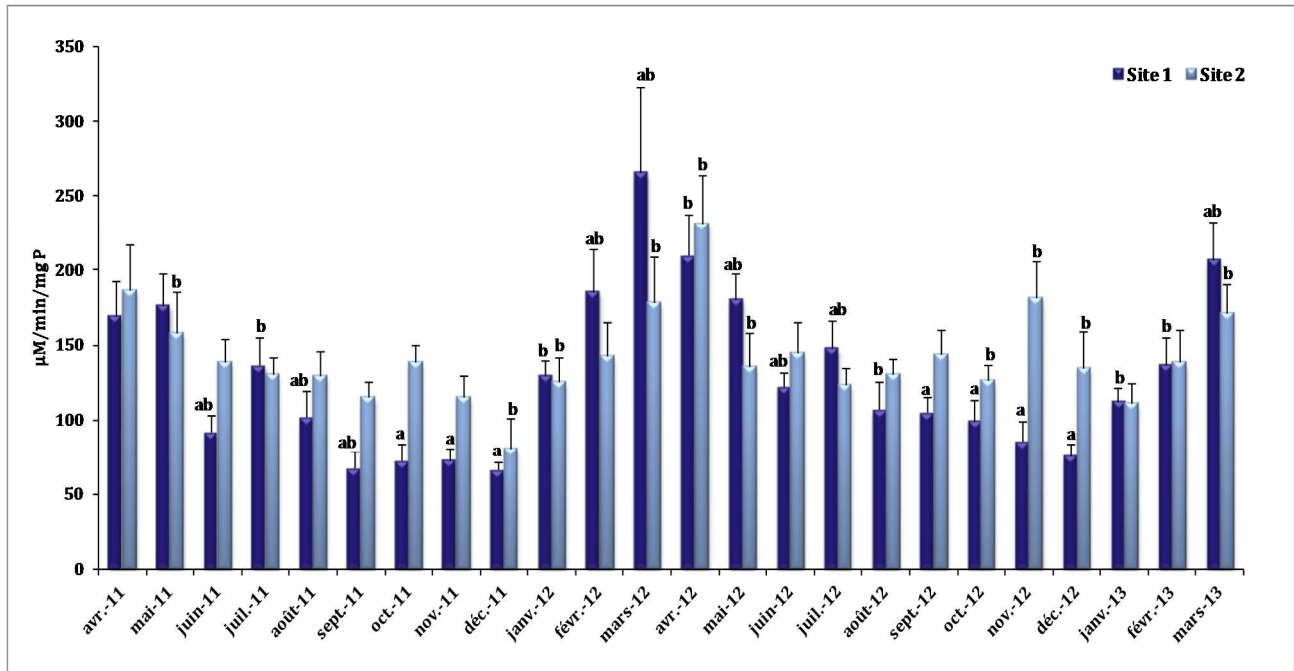


Figure 34 : Evolution de l'activité glutathion S-transférase (moyenne $\pm$ écart type, $n=10$ individus) entre avril 2011 et Mars 2013 mesurée dans la glande digestive de la moule *Mytilus galloprovincialis* provenant de Menzel Abdelrahmen (Site 1) et de la baie des carrières (Site 2). Les lettres a et b indiquent une différence spatio-temporelle significative (ANOVA, et Duncan) : a $p < 0,05$; b $p < 0,05$.

Des différences intersites significatives ont été observées entre avril 2011 et mars 2013. Toutefois, il n'y a pas une variation intersites distincte vu que l'activité GST chez les moules du site 1 varie mensuellement et elle est plus élevée ou moins élevée que chez les moules du site 2. La variation saisonnière de l'activité GST mesurée chez *M. galloprovincialis* de la lagune de Bizerte pourrait être liée à des fluctuations des paramètres de l'environnement ou à des facteurs biotiques, notamment le stade de reproduction et l'état physiologique de la moule. En effet, il a été démontré que l'activité GST chez trois espèces de mollusque (*Mytilus galloprovincialis*, *Nucella lapillus* et *Monodonta lineata*) prélevés des côtes portugaises est influencée par la salinité et par des facteurs biotiques liés à l'état physiologique et aux réserves énergétiques des mollusques (Tim Tim et al., 2009).

Les différences intersites de la variation de l'activité GST observées peuvent être provoquées par une différence du gradient de pollution et des types de polluants inhérents. La GST se caractérise par une faible spécificité, en effet, plusieurs contaminants peuvent induire cette enzyme tels que le paraquat (Stephensen et al., 2002), le nonylphénol (Uguz et al., 2003), les HAPs, les PCBs (Forlin et al., 1996) et les organophosphorés (Monteiro et al., 2006). D'autant plus, la GST possède la particularité de pouvoir conjuguer un grand nombre de composés exogènes et endogènes qui ont les caractéristiques requises pour constituer un substrat approprié. Cependant, la non spécificité d'un biomarqueur comme la GST empêche d'identifier la véritable cause des réponses enzymatiques. Ces réponses résultent en partie d'une perturbation anthropique, engendrée par les rejets domestiques de la ville avoisinante de Menzel Abderrahmen (plus de 10 000 habitants) mais il n'est pas impossible non plus qu'interviennent la position du site, son hydrodynamisme et leurs implications dans le processus de dilution des contaminants.

3. Les protéines de résistance aux multixénobiotiques (MXR) (protéine de phase III)

La résistance aux multixénobiotiques (MXR ; Kurelec, 1992) est un mécanisme de défense cellulaire chez les organismes aquatiques qui est dirigé contre plusieurs types de xénobiotiques, empêchant leurs accumulations intracellulaires et leurs effets potentiellement toxiques. Il a été démontré que les MXR interviennent dans le système de biotransformation (Chan et al., 2004), par l'excrétion extracellulaire de différent composés xénobiotiques, ou des métabolites issus de la phase I et / ou II de détoxification. Ainsi les MXR sont considérés comme des transporteurs membranaires faisant partie du mécanisme de détoxification cellulaire, ayant une influence déterminante sur l'absorption, la biodisponibilité, la bioconcentration et la toxicité des polluants environnementaux (Zaja et al., 2006).

La Figure 35 présente l'évolution de l'expression des protéines de résistance aux multixénobiotiques (MXR) au niveau des branchies des moules de Menzel Abdelrahmen (Site 1) et de la baie des carrières (Site 2) entre avril 2011 et mars 2013. Les résultats obtenus montrent que le taux d'expression des MXR est significativement plus élevé ($p < 0,05$) chez les moules du site 1 en comparaison avec le site 2. Sur les deux cycles annuels, la valeur la plus élevée a été enregistrée au mois d'août chez les moules de Menzel Abdelrahmen avec des valeurs de $218,45 \pm 7,35 \text{ DO} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ de protéines et $172,0 \pm 14,91 \text{ DO} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ de protéines

respectivement en août 2011 et août 2012. La température est donc un paramètre influençant la réponse MXR. Les valeurs élevées de MXR sur le site 1 en décembre et janvier 2011 semblent confirmer comme pour la BPH une forte activité métabolique pendant cette période qui correspond également à un pic de l'indice de condition. Un lien entre l'activité MXR et l'élévation de l'indice de condition est également observable lors de la période d'octobre 2012 à Mars 2012 qui marque la fin du second cycle saisonnier de notre étude. Des valeurs élevées de MXR sont en effet détectée sur le site contaminé 1 de Menzel a. en lien avec une élévation progressive de l'indice de condition et de l'indice gonadique.

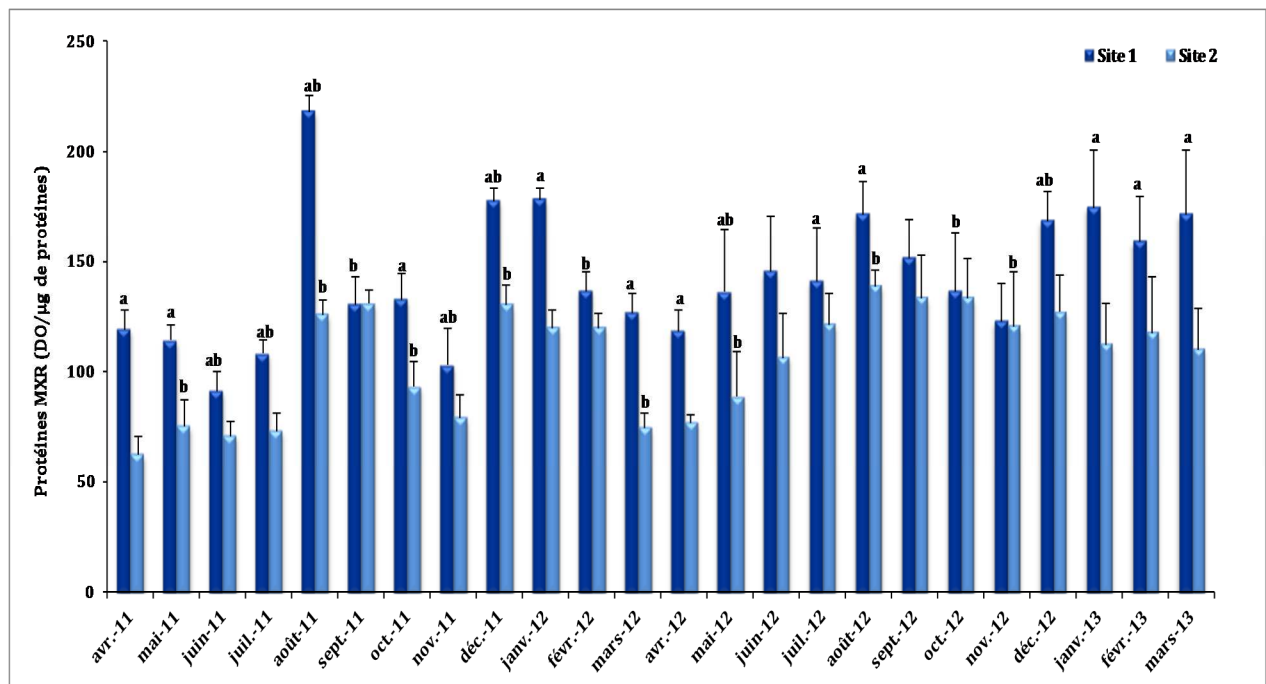


Figure 35 : Evolution de l'activité multixénobiotiques résistance (moyenne $\pm$ écart type, $n=10$ individus) entre avril 2011 et Mars 2013 mesurée dans les branchies de la moule *Mytilus galloprovincialis* provenant de Menzel Abdelrahmen (Site 1) et la baie des carrières (Site 2). Les lettres a et b indiquent une différence spatio-temporelle significative (ANOVA, et Duncan) : a $p < 0,05$; b $p < 0,05$.

La variation saisonnière du taux d'induction des MXR peut être liée à la fluctuation des facteurs abiotiques dans la lagune de Bizerte, en effet les résultats montrent que les valeurs les plus élevées du taux d'expression des MXR ont été enregistrées en hiver et en été, alors que les valeurs minimales ont été mesurées au printemps et en automne. Ce résultat consolide d'autres travaux réalisés *in situ* qui ont démontré que les variations saisonnières de la réponse MXR chez les mollusques bivalves sont principalement liées aux facteurs environnementaux tels que la température (Minier et al., 2000; Keppler et Ringwood, 2001a, b; Minier et al., 2006). D'une manière générale, la réponse des biomarqueurs est plus élevée pendant l'été par rapport à la

période d'hiver (augmentation de la température et de la production primaire, modification du métabolisme, stress, diminution de l'oxygène dissous). Le suivi de deux cycles saisonniers révèle que la température influence de manière déterminante l'activité métabolique toutefois des effets combinés avec l'effort de reproduction, de croissance et de bioaccumulation (Figure 29) peuvent faire varier l'expression des MXR sur des courtes périodes comme une élévation des MXR en décembre et janvier 2011 ou décembre et janvier 2013. En outre, il a été démontré que certains événements physiologiques tels que la ponte sont des périodes critiques qui peuvent influencer la réponse biologique des moules et l'activité des MXR face à la variation des paramètres environnementaux (Sprung (1992) ; Cartier et al., 2004). La variation intersites du taux d'expression des MXR peut être due à la différence du niveau de la contamination entre les deux sites étudiés dans la lagune de Bizerte. Les données obtenues sur la bioaccumulation des contaminants chimiques (métaux traces, HAPs et PCBs) dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* affirment que les moules de Menzel Abdelrahmen (Site 1) sont exposées à un efflux de polluants plus important par rapport aux moules de la baie des carrières (Site 2). Ceci peut être l'une des cause de l'induction du taux des MXR au niveau des branchies des moules de Menzel Abdelrahmen. En effet, l'expression de la protéine MXR est induite suite à l'exposition à des composés toxiques (Minier et Moore, 1996), et la quantité de ces protéines varie significativement entre les sites pollués (Minier et al., 2000).

Les biomarqueurs de stress oxydatif

Le stress oxydant se manifeste par la formation de nombreuses espèces réactives de l'oxygène potentiellement toxiques (Borg et Schaich, 1984). Dans ce travail, les profils de réponse des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques ont été caractérisés par la mesure de l'activité de la catalase (CAT) et le taux d'accumulations des malonedialdéhydes (MDA) au niveau de la glande digestive de moule. L'activité enzymatique de la catalase et la teneur en MDA sont des paramètres très communément mesurés lors des études de biomonitoring chez les mollusques bivalves, et plus particulièrement chez la moule *Mytilus sp.* (Solé et al., 1995 ; Bocquéné et al, 2004 ; Khessiba et al., 2005 ; Bocchetti & Regoli, 2006 ; Lima et al., 2007).

1. L'activité de la catalase

La catalase catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. C'est une enzyme peroxysomale dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée. Cette enzyme est sensible à certains

contaminants inducteurs de stress oxydatif au niveau des membranes cellulaires, comme les HAP, PCB, certains pesticides (paraquat) (Livingstone et al., 1993a) et les métaux (Labrot et al., 1996). La catalase est fréquemment utilisée comme un biomarqueurs de stress oxydatif dans les études écotoxicologiques. La Figure 36 illustre les résultats de suivi de l'activité catalase chez la moule *M.galloprovincialis* dans la lagune de Bizerte.

Pendant toute la période d'étude, l'évolution de l'activité de la catalase a la même tendance sur les deux sites : une augmentation de l'activité pendant les mois les plus chauds de l'année notamment en juillet et août avec des valeurs en 2011 de $375,66 \pm 54,58$ et $322,36 \pm 50,63 \mu\text{mole.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}\text{P}$ respectivement dans le site 1 et le site 2 et en 2012 de $357,42 \pm 39,05$ et $340,48 \pm 33,1 \mu\text{mole.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}\text{P}$, suivie d'une diminution de l'activité de la catalase pendant l'automne et puis une deuxième augmentation en février 2012. Quelques différences significatives sont observées entre les deux sites : l'activité catalase est significativement plus forte à Menzel Abdelrahmen (Site1) qu'à la baie des carrières (Site 2) ($p < 0,05$).

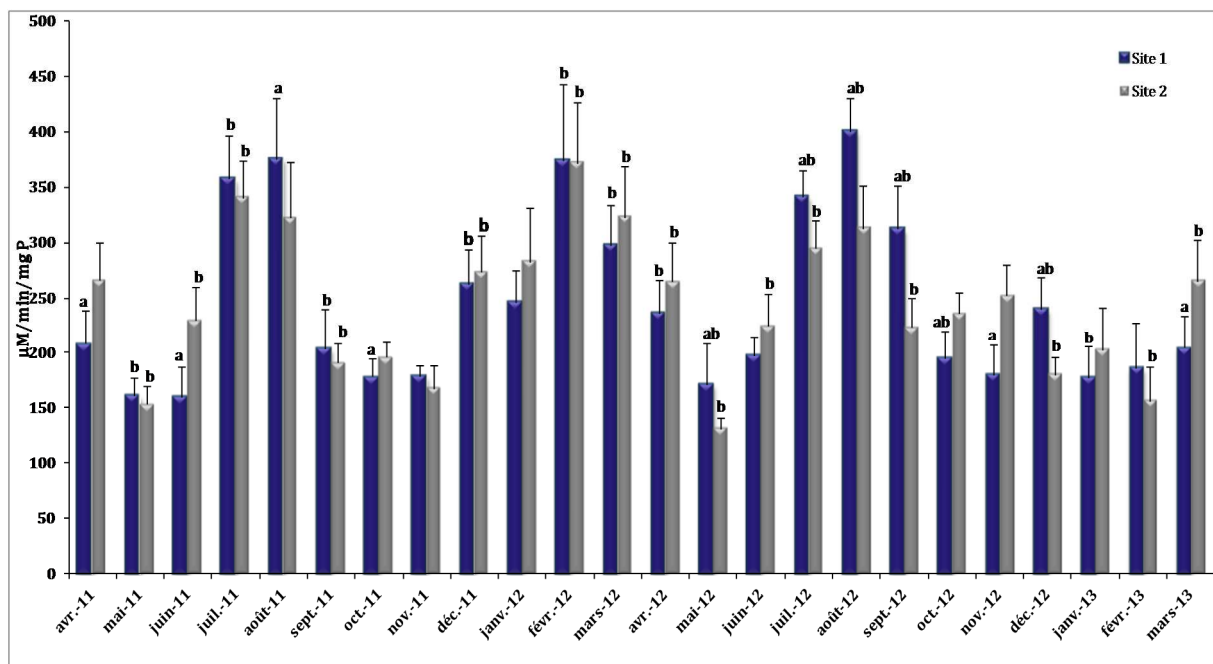


Figure 36 : Evolution de l'activité catalase (moyenne $\pm$ écart type, $n=10$ individus) entre avril 2011 et Mars 2013 chez la moule *Mytilus galloprovincialis* provenant de Menzel Abdelrahmen (Site 1) et de la baie des carrières (Site 2). Les lettres a et b indiquent une différence spatio-temporelle significative (ANOVA, et Duncan) : a $p < 0,05$; b $p < 0,05$.

En confrontant le résultat de l'activité CAT avec les données chimiques obtenues chez *M. galloprovincialis*, on peut suggérer que l'induction de l'activité catalase chez les moules de Menzel Abdelrahmen (Site 1) est probablement liée à un gradient de pollution plus élevé au

niveau de ce site. En effet, il a été démontré que le gradient et le type des polluant dans l'environnement augmentent fortement les activités enzymatiques antioxydantes (Livingstone et al., 1990). La présence de contaminants organiques et des métaux est une source possible de stress oxydatif et peut induire des variations de l'activité des enzymes antioxydantes (Santovito et al., 2005). Les profils de variation de l'activité catalase semblent être corrélés avec la variation des facteurs abiotiques et particulièrement la température. De nombreuses études ont montré que l'activité de la catalase chez les bivalves est fortement influencée par plusieurs facteurs environnementaux tels que la disponibilité en nourriture, le statut reproducteur, la température et la salinité de l'eau (Viarengo et al., 1991 ; Power & Sheehan, 1996 ; Sheehan & Power, 1999 ; Khessiba et al., 2005 ; Prevodnik et al., 2007).

L'évolution de l'activité catalase chez les moules de la lagune de Bizerte montre des fluctuations temporelles, plus ou moins importantes, selon les sites de collecte. La réponse de ce biomarqueur dépend de facteurs abiotiques du milieu, notamment la température et l'oxygène, très limitant en milieu lagunaire. Pellerin-Massicotte (1994) a déjà observé, chez les moules d'une zone estuarienne, l'effet stimulant d'une élévation de la température sur l'activité catalase. Abel et al. (1998) ont, quant à eux, signalé qu'une diminution de la teneur en oxygène est à l'origine d'une augmentation de l'activité catalase chez le ver *Heteromastus filiformis*. Au cours de la période estivale, il se produit une nette augmentation de la température et une diminution consécutive des taux en oxygène dissous, à l'origine d'un phénomène épisodique de forte eutrophisation (Dridi, 1977 ; Aissa 1991 ; Dellali et Aissa, 1998). Ceci explique également la corrélation entre l'activité catalase des bivalves et la salinité (très élevée en été dans la lagune de Bizerte, parallèlement à une forte élévation thermique des eaux).

Par ailleurs, les travaux effectués sur les biomarqueurs de stress oxydatif au laboratoire et surtout *in situ* montrent que le caractère aspécifique de leur réponse constitue un avantage comme indicateur d'un état de pollution mixte (Cossu et al., 1997). L'activité de la catalase est soit augmentée ou diminuée après une exposition à un polluant chimique et l'aspect variabilité saisonnière reste prépondérant. Le fait que le profil de réponse de la catalase corresponde à une courbe en cloche (Dagnino et al., 2007) complique l'interprétation des mesures environnementales, qui correspondent à une photographie de la relation dose effet à un instant t. Sur la base de ce constat, ce marqueur semble plus approprié pour une étude en laboratoire où l'on dispose de témoins et où la cinétique d'exposition est connue.

2. Le taux d'accumulation des malondialdéhydes (MDA) (marqueur de peroxydation lipidique)

La peroxydation lipidique a été largement définie comme la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires (Halliwell et Gutteridge, 1997). La formation du MDA comme produit secondaire de la peroxydation des lipides a été mesurée en utilisant le test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Ce test est un indicateur assez fiable du taux de peroxydation (Di Giulio (1989) ; Valavanidis et al., 2008) et est utilisé comme un biomarqueur de dommages oxydatifs chez les organismes aquatiques exposés aux polluants environnementaux.

Les résultats de suivi du taux d'accumulation du MDA au niveau de la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* de la lagune de Bizerte (Figure 37) montrent que la variation mensuelle des MDA au cours d'un cycle saisonnier de deux ans montre particulièrement un effet combiné de la température sur le site 1 le plus contaminé.

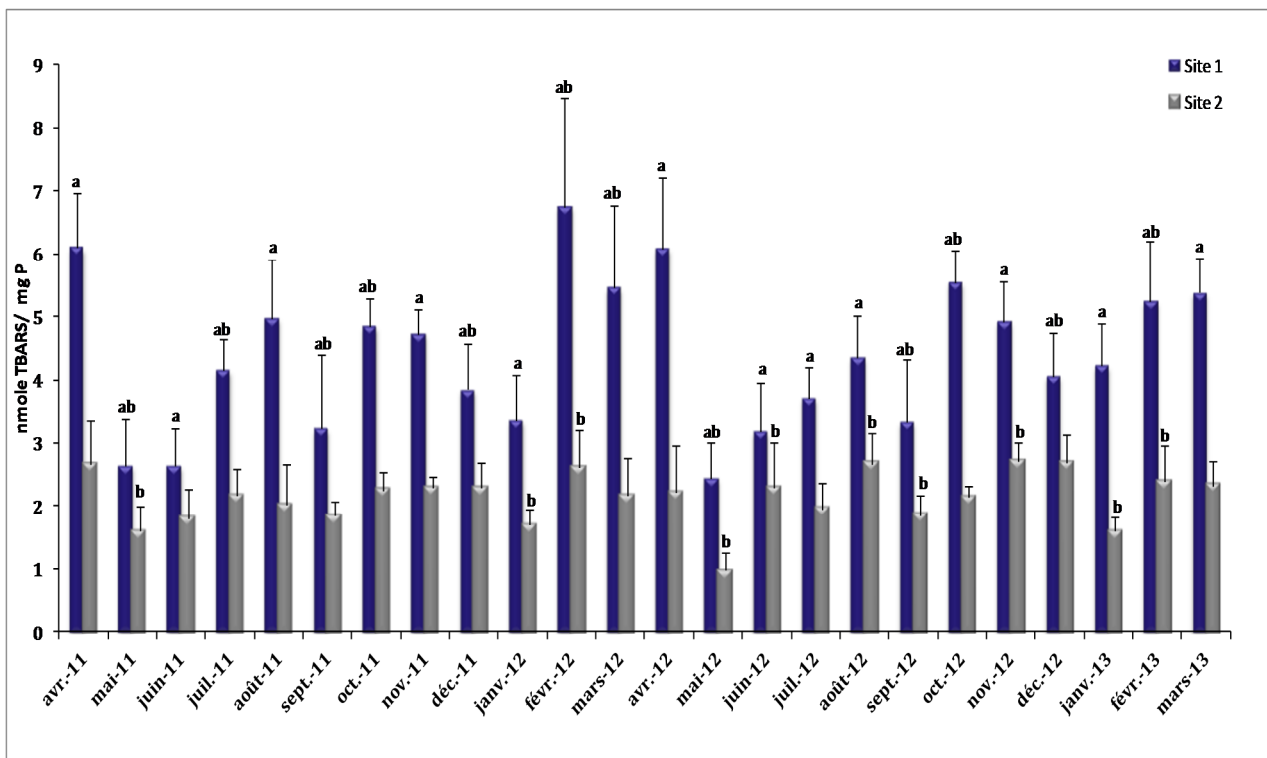


Figure 37 : Evolution du taux d'accumulation des Thiobarbituric acid reactive (TBARS) (moyenne $\pm$ écart type, $n=10$ individus) entre avril 2011 et Mars 2013 mesurée dans la glande digestive de la moule *Mytilus galloprovincialis* provenant de Menzel Abdelrahmen (Site 1) et de la baie des carrières (Site 2). Les lettres a et b indiquent une différence spatio-temporelle significative (ANOVA, et Duncan) : a $p<0,05$; b $p<0,05$.

Les valeurs les plus élevées ($5,54 \pm 0,59$ et $6,75 \pm 1,72$ nmole TBARS.mg⁻¹ P) sont mesurées en février et mars 2012 et 2013 chez les moules provenant de Menzel Abdelrahmen (Site1). Durant toute la période d'étude, le taux d'accumulation des MDA est significativement plus élevé chez les moules de Menzel Abdelrahmen en comparaison avec les moules de la baie des carrières ($p < 0,05$). La bioaccumulation plus élevée de métaux sur ce site pourrait contribuer à l'accumulation de MDA. Solé (2000) ; Pereira et al. (2007) ont étudié la bioaccumulation et les dommages oxydatifs causés par l'exposition aux xénobiotiques au niveau des branchies et de la glande digestive des moules. Les HAPs et les métaux non essentiels, tels que Cd, Ni, Cr, Pb, et Hg sont toxiques pour les organismes aquatiques principalement en raison de leur potentiel oxydatif, tandis que d'autres métaux, tels que Fe, Zn, Cu et Mn sont essentiels pour le métabolisme, mais ils peuvent devenir toxique à des concentrations excessives (Chang, 1996). En effet, il a été démontré que certains métaux lourds produisent des radicaux hydroxyles (HO•) qui réagissent avec les lipides membranaires (LH) en éliminant un atome d'hydrogène provoquant ainsi la formation d'un radical hautement réactif (L •) centrée sur un atome carbone et qui à l' phase de propagation ajoute rapidement de l'oxygène pour produire le lipide radical peroxy (LOO •) (Buege and Aust 1978 ; Viarengo et al., (1991)) et d'autres composés réactifs de l'oxygène provoquant ainsi des dommages cellulaires.

La peroxydation lipidique exprimée par la teneur en MDA est en combinaison avec les variations de l'activité des enzymes antioxydantes, qui sont corrélées à la contamination du milieu aquatique et en particulier l'exposition aux hydrocarbures polyaromatiques (HAP), et aux métaux lourds (Frouin et al., 2007). Plusieurs études ont montré une peroxydation lipidique chez les organismes aquatiques exposés à des concentrations élevées de substances toxiques, notamment les HAPs (Downs et al., 2002). En outre, parmi les sources principales des HAPs dans l'environnement marin, les émissions atmosphériques, les effluents des eaux usées et les ruissellements de surface (Simpson et al., 1996).

Biomarqueur de stress métallique

1. Les métallothionéines (MTs)

La Figure 38 montre l'évolution du taux des métallothionéines dans la glande digestive des moules provenant de Menzel Abdelrahmen (Site1) et de la baie des carrières (Site 2) entre avril 2011 et septembre 2012. Une différence significative intersites a été observée, le taux d'accumulation de MT est majoritairement plus élevé chez les moules de site 1 (80% des valeurs

obtenus sur 18 mois de mesure), entre janvier 2012 et mars 2012 le taux d'accumulation des MT diminue significativement.

Le maximum d'induction de la MT est observé pendant l'été avec des valeurs qui varient en juillet 2011 de $200 \pm 41,29 \mu\text{g MT.mg}^{-1}$ de protéines et $130,62 \pm 16,23 \mu\text{g MT.mg}^{-1}$ de protéines respectivement pour le site 1 et le site 2, et en août 2011 les valeurs enregistrées sont $203,95 \pm 30,91 \mu\text{g MT.mg}^{-1}$ de protéines et $150,29 \pm 21,03 \mu\text{g MT.mg}^{-1}$ de protéines respectivement pour le site 1 (Menzel Abdelrahmen) et le site 2 (baie des carrières).

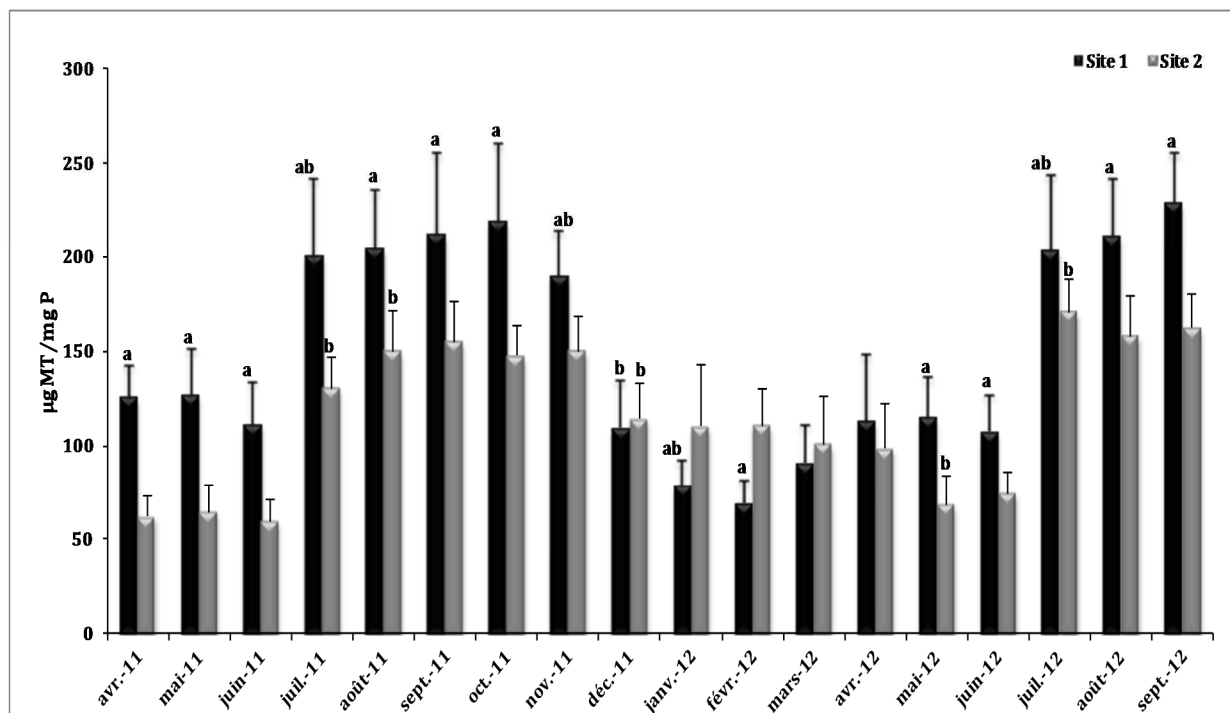


Figure 38 : Evolution de du taux d'accumulation des métallothionéines (moyenne $\pm$ écart type, $n=10$ individus) entre avril 2011 et Mars 2013 mesurée dans la glande digestive de la moule *Mytilus galloprovincialis* provenant de Menzel Abdelrahmen (Site 1) et la baie des carrières (Site 2). Les lettres a et b indiquent une différence spatio-temporelle significative (ANOVA, et Duncan) : a $p < 0,05$; b $p < 0,05$.

Les métallothionéines sont impliquées dans la séquestration des métaux et la protection contre les effets induits par ces derniers (Roesijadi, 1996 ; Viarengo et al., 2000). La mesure du taux d'accumulation des métallothionéines a été proposé comme un indicateur spécifique de l'exposition aux métaux toxiques dans les eaux douces et les milieux marins (Langston et al., 1998 ; Amiard et al., 2006). Le résultat obtenu nous incite à prédire que la concentration en eau usée traitée utilisée pour chaque groupe est à l'origine de l'induction des métallothionéines vu que cette eau est suspectée contenir une grande quantité de métaux lourds. En effet, des travaux

ont montré que malgré l'amélioration des traitements primaires et secondaires de l'eau usée, les eaux usées traitées conservent encore une quantité importante de matière organique et des composés métalliques (Nagel et al., 2003 ; Speir et al., 2003). Ainsi l'induction des métallothionéines est considérée comme étant un bon biomarqueur d'exposition à des métaux lourds et couramment appliquée dans les programmes de biosurveillance de l'environnement (Viarengo et al., 1999, 2007 ; Banni et al., 2007). D'autre part, il a été démontré que des éléments métalliques tels que le cadmium, le cuivre et le zinc s'accumulent dans les tissus de la palourde *Ruditapes decussatus* exposée distinctement et/ou à un mélange de ces métaux provoquent une forte induction de la synthèse des métallothionéines (Serafim et Bebianno, 2010). L'exposition d'un organisme à des métaux lourds induit une surproduction des métallothionéines et provoque des dommages cellulaires systémiques (Lowe et al., 1994 ; Cavaletto et al., 2002). Cependant l'accumulation des métallothionéines dans les tissus de moule pourrait aussi être due à un stress oxydatif indépendamment de la présence des métaux traces dans le milieu. En effet, Banni et al. (2007) et Dondero et al. 2005 ont rapportés des augmentations significatives des isoformes de métallothionéines tant en terme de protéine que en terme de ARNm chez la moule *Mytilus galloprovincialis* non exposée aux métaux lourds mais présentant un état de déséquilibre de la balance oxydative.

Biomarqueur de neurotoxicité

1. L'acétylcholinestérase (AChE)

La Figure 39 présente les résultats de suivi de l'activité acétylcholinestérase au niveau des branchies de moule *Mytilus galloprovincialis* prélevées de Menzel Abdelrahmen (Site 1) et de la baie des carrières (Site 2) entre avril 2011 et mars 2013. Les valeurs des deux cycles saisonniers décrivent des tendances différentes. Le premier cycle d'avril 2011 à mars 2012 montre une influence de la température avec une inhibition maximale en juillet et août 2011. Le second cycle d'avril 2012 à mars 2013 est plus erratique. L'influence de la température est moins marquée en été sur le site 1 que sur le site 2. L'activité AChE est significativement ($p < 0,05$) plus inhibée chez les moules du site 1. De ce fait, les résultats obtenus sont peu informatifs sur la variation saisonnière de l'activité AChE, puisque on n'a pas le même profil de variation saisonnière sur les deux ans d'études. Néanmoins, chez les moules de Menzel Abdelrahmen, le maximum d'inhibition de l'activité de l'AChE est observé pendant les mois les plus chauds de l'année $21,52 \pm 3,73 \mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ P}$, $30,65 \pm 5,6 \mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ P}$,

et $33,23 \pm 4,97 \mu\text{mole.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines, $31,04 \pm 6,34 \mu\text{mole.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines respectivement pour les mois juillet 2011, août 2011, juillet 2012 et août 2012.

Sur l'ensemble des deux cycles annuels (24 mois), l'analyse statistique ANOVA à un seuil ($p < 0,05$), montre que pendant 16 mois d'étude l'activité de l'AChE est significativement inhibée au niveau des branchies des moules de Menzel Abdelrahmen. L'inhibition de l'AChE est provoquée également, mais de manière non spécifique, par des polluants de nature métallique. L'inhibition de l'acétylcholinestérase est probablement liée à la présence de contaminants chimiques tels que le naphthalène et le benzo[a]pyrène et certains métaux lourds dans les effluents urbains traités (Gravato et Santos, 2003).

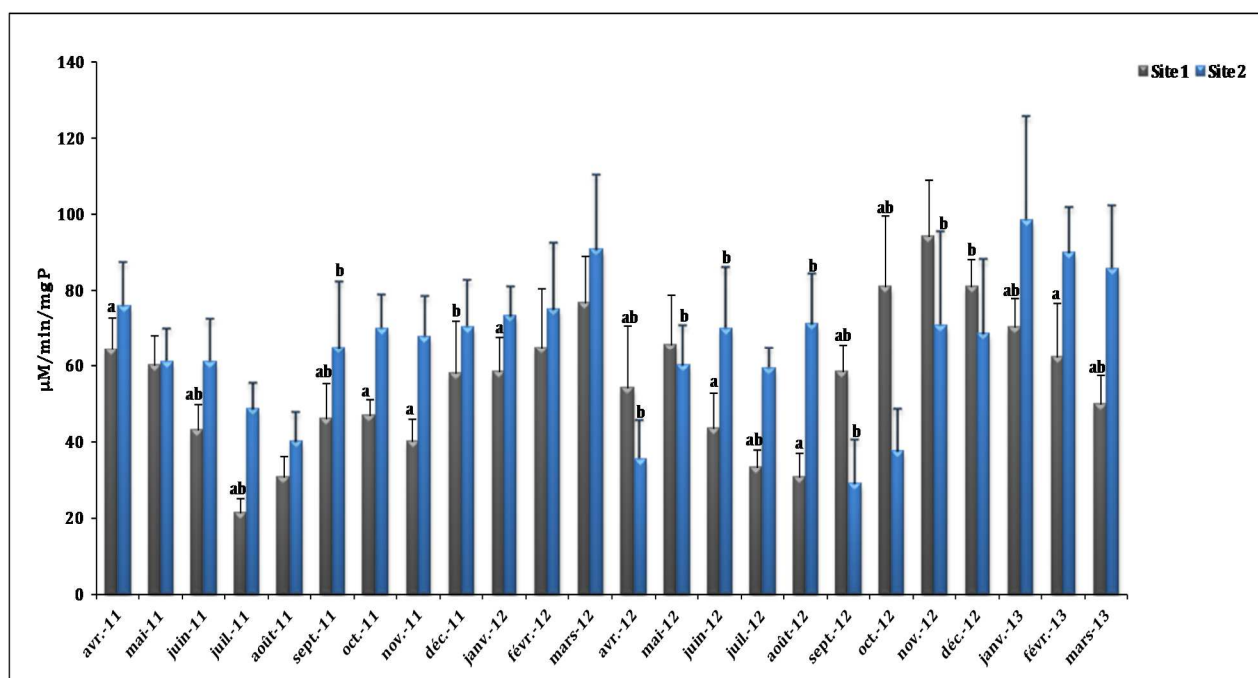


Figure 39 : Evolution de l'activité acétylcholinestérase (moyenne $\pm$ écart type, $n=10$ individus) entre avril 2011 et Mars 2013 mesurée dans les branchies de la moule *Mytilus galloprovincialis* provenant de Menzel Abdelrahmen (Site 1) et la baie des carrières (Site 2). Les lettres a et b indiquent une différence spatio-temporelle significative (ANOVA, et Duncan) : a $p < 0,05$; b $p < 0,05$.

L'inhibition de l'activité AChE a été largement utilisée comme un marqueur de neurotoxicité, provoqué par la présence de pesticides de types organophosphorés (OPs) et carbamates (Cs) (Fulton et Key, 2001). D'autres travaux ont montré que les polluants tels que les métaux lourds, les surfactants ioniques comme le nonyphénol et les hydrocarbures aromatiques polycycliques inhibent l'activité de l'AChE (Stock et al., 2004 ; Guilhermino et al., 1998 ; Akcha et al., 2000 ; Elumalai et al., 2002).

Plusieurs travaux ont montré une relation entre l'inhibition de l'activité AChE chez des moules, des copépodes et chez des anguilles en relation avec la présence de contaminants organiques dans le milieu (hydrocarbures aromatiques polycycliques, polychlorobiphényles, pesticides) (Dellali et al., 2001 ; Forget et al., 2003 ; et Schiedek et al., 2006). Il a été démontré qu'une faible concentration en nonylphénol est capable d'entraîner une inhibition des cholinestérases chez le poisson (*Poecilia reticulata*) après 7 jours d'exposition (Mei-Hui Li. 2008). En effet, le 4-nonylphénol est un polluant ubiquitaire, persistant et facilement bioaccumulable (Ying et al., 2002) et son effet sur les organismes aquatiques s'avère chronique et aiguë (Staples et al., 2004). En outre, un effet additif du chlorpyrifos et des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur l'inhibition *in vitro* de l'activité AChE purifiée d'anguilles a été mentionné par Jett et al. (1999). De même, Nunes et al. (2006) ont montré que des expositions à des substances pharmaceutiques comme le diazepam inhibent l'activité spécifique de l'AChE chez le crustacé *Artemia parthenogenetica*.

Biomarqueur de génotoxicité

1. Le test des Comètes

Pour des raisons techniques, ce test a été réalisé que pour six mois sur la totalité de la période d'échantillonnage. En fait, la cryoconservation des hémocytes pour de longue période a entraîné une diminution de la viabilité cellulaire et des dommages à l'ADN lorsque les cellules sont décongelées ; ainsi pour limiter les effets de la cryopréserveation pour de longues périodes dépassant parfois les six mois, nous avons procéder à une conservation dans l'azote liquide pendant une semaine, après les lames ont été préparées et conservées jusqu'au moment de la lecture qui a été faite au laboratoire d'Ifremer à Nantes. Le pourcentage de viabilité déterminé avant la réalisation du test des comètes est supérieure à 80%. Les résultats concernant l'induction de cassures de l'ADN sont présentés sur la Figure 36. Dans un premier temps, cinq paramètres relatifs au test comète ont été comparés, il s'agit de paramètres individuels de mesure de la queue, de la tête et de la comète. Les paramètres les plus informatifs sur sont les Tail Extent Moment, Olive Tail Moment et tail length.

Les effets génotoxiques induits par la présence des contaminants dans le milieu naturel, ont été étudiés sur les hémocytes en raison du rôle qu'elles jouent dans le transport et la digestion des nutriments et l'élimination des substances toxiques et des petites particules, ce qui les rend exposés de manière permanente aux polluants de l'environnement (Makala et Oikari,

1990 ; Soares-da-Silva et al., 2002). La figure 40 présente les résultats obtenus sur deux périodes (de février 2012-avril 2012 et de juin 2012-août 2012).

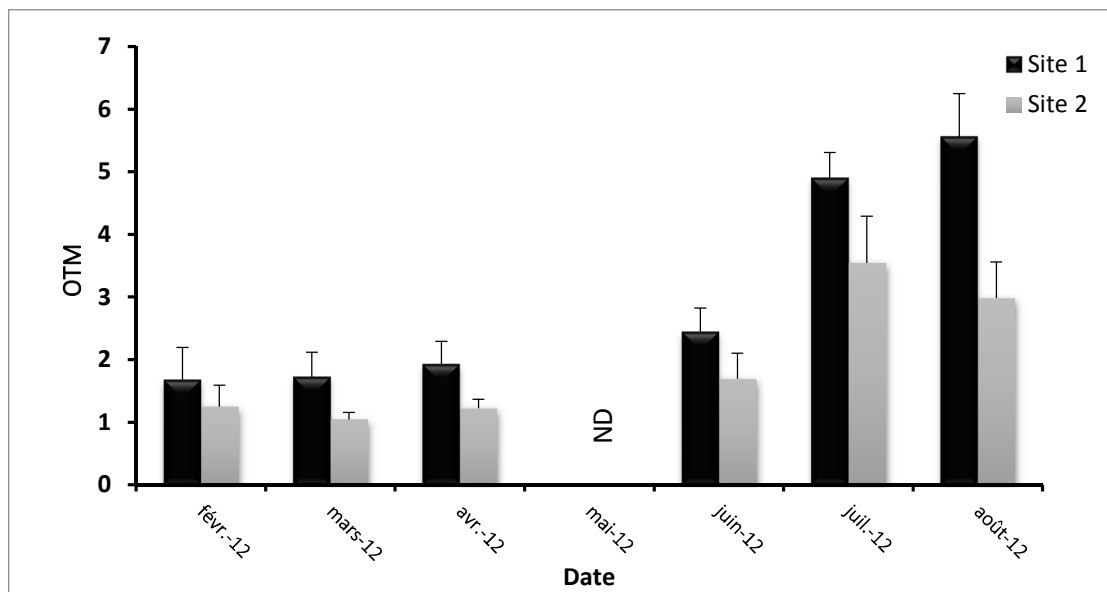


Figure 40 : Indice de cassures de l'ADN exprimé par le Olive Tail Moment (OTM) dans les cellules d'hémolymphe de moule *Mytilus galloprovincialis* de la lagune de Bizerte (Menzel Abdelrahmen (Site 1) et la baie des carrières (Site 2)). Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ erreur type relative. $n = 10$ moules, 100 cellules analysées par le test comète.

Les résultats sont exprimés en OTM (Olive Tail Moment). Le choix de cette période est basé sur le fait que la moule *Mytilus galloprovincialis* dans la lagune de Bizerte soit en période de repos sexuel. L'ADN des hémocytes des moules de Menzel Abdelrahmen (Site 1) est plus altéré pendant la période estivale (juin, juillet et août 2012) par rapport à celui des moules de la baie des carrières (Site2). L'exposition des moules de Menzel Abdelrahmen aux polluants de l'environnement pourrait être la cause des dommages liés à l'ADN. En effet, de nombreuses substances et molécules rejetées dans l'environnement aquatique sont suspectées d'avoir un effet génotoxique sur les organismes vivants dans cet écosystème lagunaire. Les résultats ont montré une forte corrélation des valeurs OTM avec la température de l'eau et l'oxygène dissous. Le niveau le plus élevé de dégradation de l'ADN a été détecté chez les moules de Menzel Abdelrahmen (Site 1) pendant Juillet et Août, les plus faibles valeurs OTM ont été déterminées au cours de février, mars et avril 2012. Ces résultats sont en total accord avec les travaux de Kolarevic et al. (2013) réalisés sur la moule *Sinanodonta woodiana* collectée dans la rivière Velika Morava et qui montrent une induction de l'altération de l'ADN au cours des mois les plus chaud de l'année.

V. Indice composite : “Integrated Biomarker Responses”

Dans ce travail, le suivi mensuel d’une batterie de biomarqueurs a généré une quantité importante de données. L’interprétation peut être facilitée avec le calcul d’un indice composite intégrant la réponse des biomarqueurs (IBR). Cet indice permet de déterminer à partir de la totalité des données obtenues une seule valeur intégrative de l’ensemble des biomarqueurs permettant par la suite de présenter les résultats d’une manière globale et synthétique (Figure 41).

Plusieurs indices intégrant la réponse d’une batterie de biomarqueurs ont été développés dans un contexte d’écotoxicologie aquatique (Wosniok et al., (2005). Cette approche permet de résumer l’information, précédemment portée par plusieurs variables, en une variable unique, de la façon la plus pertinente possible. Un tel indice présente l’avantage de faciliter l’interprétation des résultats et leur communication, et peut être le critère d’évaluation utilisé pour des comparaisons spatiales ou une surveillance spatio-temporelle de tendances (Wosniok et al., 2005).

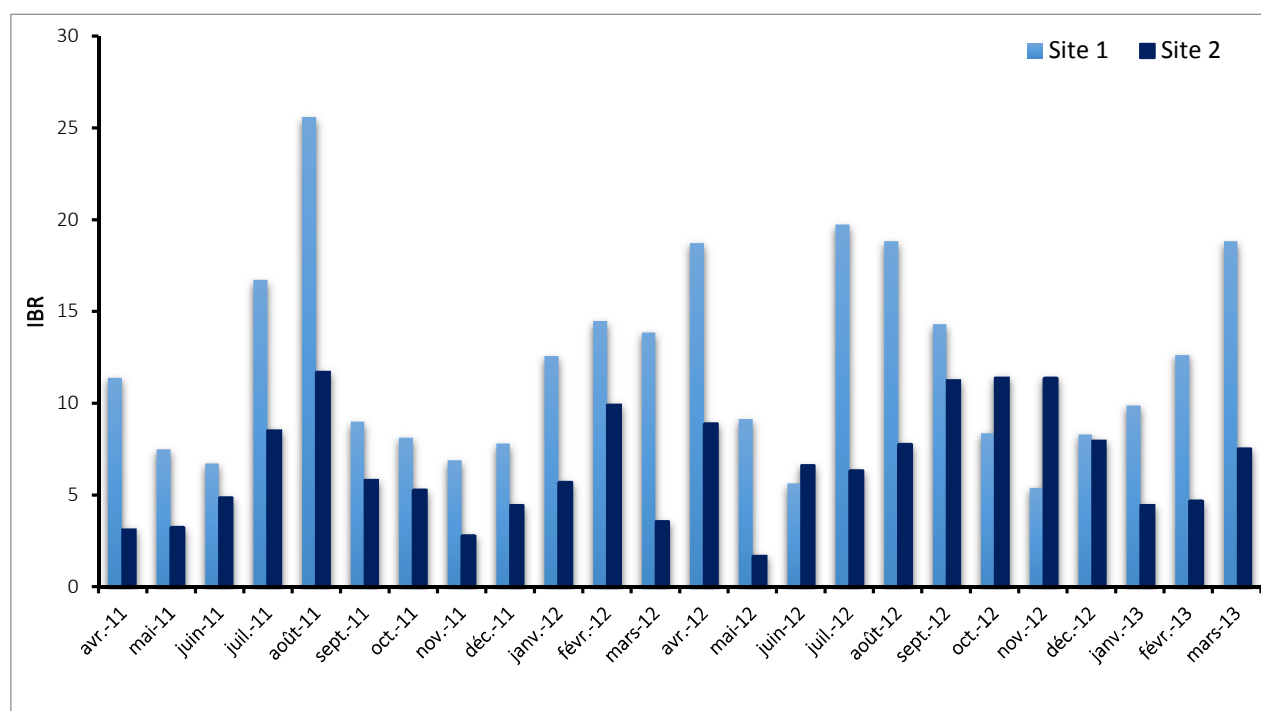


Figure 41 : Intégration des biomarqueurs analysés chez la moule *Mytilus galloprovincialis* provenant de Menzel Abdelrahmen et de la baie des carrières entre avril 2011 et septembre 2012.

L’un des indices les plus utilisés est l’Integrated Biomarker Response (IBR) proposé par Beliaeff et Burgeot (2002). Dans ce travail, la méthode utilisée pour le calcul de l’IBR est celle

de Devin et al. (2013), c'est une nouvelle méthode de calcul basée à la fois sur une formule plus simple et une procédure de permutation. Ces améliorations permettent d'éviter les abus et d'effectuer un classement fiable des deux sites classés selon un gradient de pollution à partir des réponses des biomarqueurs. Le calcul de l'IBR est appliqué aux données issues de l'étude mensuelle à long terme (24 mois) de six biomarqueurs (AChE, CAT, GST, MDA, BPH, MXR).

L'IBR est un outil pratique pour évaluer la réponse combinée des biomarqueurs. En effet, l'indice IBR peut être utilisé pour refléter les effets biologiques de la contamination mesurée à différents sites, indépendamment de la variation de l'ensemble des biomarqueurs utilisés pour le calcul de cet indice (Beliaef et Burgeot. 2000 ; Sefarim et al., 2012). Les résultats ont mis en évidence le site de Menzel Abdelrahmen (Site 1) comme étant le site le plus affecté par la présence des contaminants. L'indice IBR a montré que les réponses des biomarqueurs ont tendance à être plus élevées au cours de la période estivale (Juillet et Août) sur les deux sites. La forte fluctuation de la réponse biologique observée avec l'indice IBR a permis de caractériser un effort métabolique maximale en Août sur le site 1 et un effort métabolique minimal en mai sur le site 2 (tableau 4). Les valeurs de l'IBR (tableau 4) reflètent l'intensité des effets mesurés pour les différents biomarqueurs et nous permettent la comparaison des sites.

L'application de l'IBR nous a permis d'évaluer l'état de santé des moules dans la lagune de Bizerte et de classer les sites d'étude selon leur niveaux de contamination. En effet, Boreg et Lehtonen (2006) et Dagnino et al. (2007) considèrent que l'application des indices intégrateurs de biomarqueur est la meilleure approche disponible qui permet de contrôler les effets de pollutions dans les écosystèmes marins. Nos résultats indiquent que l'indice IBR est un outil pratique qui pourrait être appliqué dans la lagune de Bizerte pour évaluer le stress induit par les contaminants chimiques chez les organismes vivants dans cet écosystème. Des travaux étudiant la réponse d'une batterie de biomarqueurs chez des moules en cages ont mis en avant l'importance de détermination des niveaux de contamination pour permettre une comparaison intersites (Tsangaris et al., 2011).

Plusieurs études appliquant l'intégration de la réponse des différents biomarqueurs *via* le calcul IBR ont montré une corrélation de cet indice avec les niveaux de contamination du milieu. De plus, une forte corrélation entre les valeurs de l'indice IBR et les concentrations tissulaires des composés organochlorés chez des populations de poisson (*Zoarcetes vivipare*) et de moules (*Mytilus sp.*) de la mer Baltique a été rapporté par Broeg et Lehtonen (2006). Chez les moules en cage (*M. galloprovincialis*) transplantées dans la baie de Cannes, Damiens et al.

(2007) ont rapporté une forte relation entre l'indice IBR et les concentrations tissulaires en Cu, PCB et HAP.

Toutefois, l'application de l'IBR doit répondre à plusieurs critères : en effet, il faut prendre en compte la nature de réponse de chaque biomarqueurs (inhibition et/ou induction) face à la présence des polluants environnementaux et de leur niveau biologique (moléculaire, cellulaire, tissulaire...) pour éviter de trop mettre l'accent sur la valeur finale de l'indice, à savoir les biomarqueurs qui répondent pour le même type de pollution (Broeg et Lehtonen, 2006). Le nombre de biomarqueurs inclus dans le calcul de l'IBR joue également un rôle important affectant le « poids relatif » de chaque biomarqueur dans la valeur finale de l'indice (Broeg et Lehtonen, 2006). L'IBR est un indice « dynamique » qui n'est pas en mesure de donner une valeur numérique fixe, directement comparables pour décrire la « l'état de santé » d'une population à un moment donné (Sefarim et al., 2011). L'indice IBR peut être utilisé comme une méthode qualitative et non quantitative pour évaluer le niveau de stress chez les organismes vivants dans des sites contaminés (Raftopoulou et Dimitriadis, 2010).

La variation saisonnière de la température est l'un des plus importants facteurs physiques ayant une incidence sur les organismes aquatiques. En effet, la température agit sur presque toutes les propriétés physiques de l'eau de mer. En revanche, la solubilité des gaz, par exemple l'azote, le dioxyde de carbone et l'oxygène, est inversement proportionnelle à la température (Cox, 1965 ; Houston, 1982). Ainsi, les fluctuations des paramètres abiotiques de l'environnement ont un impact direct sur la variation des mécanismes physiologiques des organismes vivants dans l'écosystème. La Figure 38 présente le profil de variation saisonnière de la température dans la lagune de Bizerte et l'évolution de l'IBR chez la moule *Mytilus galloprovincialis* provenant de Menzel Abdelrahmen (Site1) et de la baie des carrières (Site 2). La réponse intégrée des biomarqueurs chez les moules des deux sites d'étude semble être synchronisée avec les fluctuations naturelles de la température.

Kinne (1963) a réalisé un examen exhaustif des effets des variations de la température de l'eau sur les animaux aquatiques. Les résultats de cette étude indiquent que les processus biologiques peuvent être fortement influencés par les fluctuations, les gradients, les amplitudes et les moyennes thermiques de même que par la fréquence et l'intensité des variations, la durée des régimes et les unités thermiques accumulées. La plupart des espèces marines sont caractérisées par une plage de tolérance thermique délimitée par des températures létales spécifiques supérieure et inférieure.

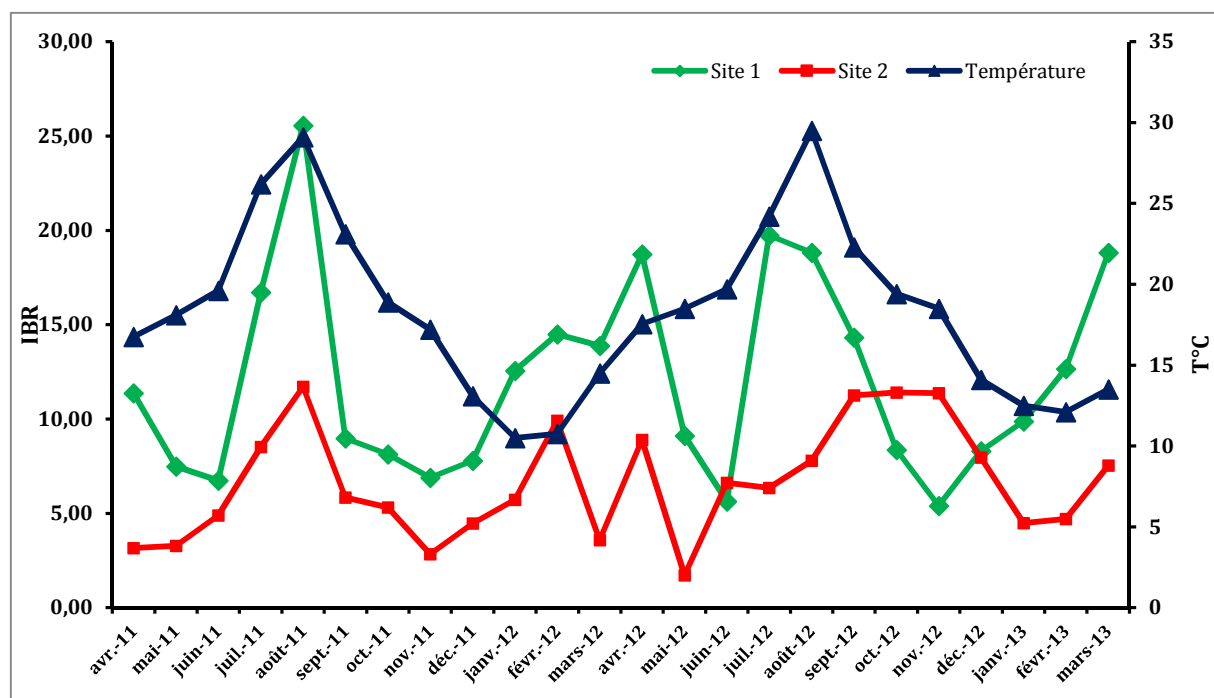


Figure 42 : évolution de l'indice des réponses de biomarqueur (IBR) et de la température dans la lagune de Bizerte durant la période avril 2011-mars 2013.

Les valeurs de l'IBR chez les moules de Menzel Abdelrahmen (Site 1) sont plus élevées par rapport à celle de la baie des carrières (Site 2), ceci a été expliqué précédemment par un niveau de contamination chimique plus élevé au site 1. De plus, il s'avère que la température a un effet direct sur la biodisponibilité des polluants dans l'environnement. En général, la sensibilité des organismes aquatiques aux substances toxiques est directement proportionnelle à la température (Cairns et coll., 1975). Les interactions entre la température et la toxicité sont cependant très complexes, car la température agit généralement sur les propriétés chimiques et la disponibilité des substances toxiques, la survie et la fonction des organismes ainsi que les réactions des organismes aux toxiques. Les organismes aquatiques sont souvent liés aux conditions ambiantes de salinité et de température.

L'augmentation de l'indice IBR chez les moules de la lagune de Bizerte pendant la période estivale coïncide avec l'élévation de la température, ceci pourrait être expliqué par le fait que le réchauffement de l'eau provoque une accélération des processus métaboliques et, par conséquent, un accroissement de l'absorption de métaux ainsi que de la toxicité de ces substances pour les organismes marins (Phillips, 1976; Waldichuk, 1985; McLusky et coll., 1986; Voyer et Modica, 1990).

VI. La détermination des seuils de réponse des biomarqueurs étudiés dans la lagune de Bizerte

A l'issue de ce travail, le niveau de base « Background Assessment Criteria » (BAC) et le seuil d'effet « Environmental Assessment Criteria » (EAC) ont été calculés selon la méthode OSPAR (Davis et Vethaak, 2012) pour les moules collectées dans la lagune de Bizerte (tableau 13). Nous avons calculé les niveaux de base BAC en se basant sur les données chimiques et les résultats d'analyses des biomarqueurs en considérant la Baie des Carrières (Site 2) comme le site le moins contaminé. Les seuils d'effets ont été calculés sur le site le plus contaminé de Menzel Abdelrahmen (Site 1). Le niveau de base de l'acétylcholinestérase chez les moules *M. galloprovincialis* collectées de la lagune de Bizerte est beaucoup plus élevé que les données OSPAR 2012 chez la même espèce.

Tableau 14 : les niveaux de base (BAC) et les seuils d'effet (EAC) des biomarqueurs chez *Mytilus galloprovincialis* vivant dans la lagune de Bizerte.

Biomarqueurs	Tissu	BAC proposé pour la lagune de Bizerte	EAC proposé pour la lagune de Bizerte	BAC OSPAR (Davies et Vethaak, 2012)	EAC OSPAR (Davies et Vethaak, 2012)
AChE	Branchies	88.8 (nmol.mn ⁻¹ .mg ⁻¹ P)	31.7 (nmol.mn ⁻¹ .mg ⁻¹ P)	15 (nmol.mn ⁻¹ .mg ⁻¹ P)	10 (μmol.mn ⁻¹ .mg ⁻¹ P)
CAT (μmol.mn ⁻¹ .mg ⁻¹ P)	Glande digestive	323	369	—	—
MDA (nmol.mg ⁻¹ P)	Glande digestive	3	6	—	—
MT ⁺ (μg.mg ⁻¹ P)	Glande digestive	160	214	—	—
GST (μmol.mn ⁻¹ .mg ⁻¹ P)	Glande digestive	181	201	—	—
MXR (OD.μg ⁻¹ P)	Branchies	133	177	—	—

Davies et Vethaak (2010) proposent un niveau de significativité qui devrait être accordé aux BAC et EAC pour les différentes mesures des effets biologiques dans une évaluation intégrée et proposent une classification en deux dimensions : la première dimension est basée sur les critères d'évaluation (BAC, EAC) de chaque biomarqueur unique, la deuxième dimension représente l'emplacement de chaque biomarqueur à l'échelle de sa pertinence pour la santé écosystème.

Pour de comprendre la variation saisonnière de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase chez *Mytilus galloprovincialis* et de valider son application comme un biomarqueur de neurotoxicité chez les moules dans la lagune de Bizerte, il est important de déterminer les niveaux de base et de suivre la variation pendant au moins deux cycles saisonniers. Des études réalisées chez la moule *Mytilus edulis* pendant un cycle saisonnier de trois ans le long de la côte atlantique a démontré un niveau de base de (35 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ P) avec un maximum d'amplitude de 30% (Bocquené et al., 2004). Toutefois, il a été démontré que les niveaux de base varient en fonction de la saison et des sites d'étude, en effet les différences spatio-temporelles des niveaux de base chez *Mytilus spp* varient de 25 à 54 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ P (Davis et Vethaak. 2012). En général, il a été démontré qu'une réduction de 20 % de l'activité AChE chez les poissons et les invertébrés indique l'exposition à des composés à effet neurotoxiques. L'inhibition de l'activité AChE plus de 20 % jusqu'à 50 % montre un effet sublétales (Dizer et al., 2001).

Evaluation de l'effet de l'élévation de la température pendant la période estivale sur les paramètres biologiques de *Mytilus galloprovincialis* dans la lagune de Bizerte

Article 2 :

A l'issue de ce travail de biosurveillance mené dans la lagune de Bizerte pendant une période de deux cycles annuels avec un rythme mensuel de prélèvement et pour rester dans la même thématique de l'effet de l'élévation de la température sur la moule, on s'est focalisé sur les résultats de la variation des paramètres physiologiques, biochimiques et la capacité de bioaccumulation des contaminants environnementaux pendant la période estivale pour étudier de plus près le comportement de *Mytilus galloprovincialis* dans la lagune face à l'élévation naturelle de la température avec une différence de 11°C entre mai 2011 et août 2011. Les résultats obtenus ont été discutés et publiés dans l'article ci-dessous.

Effects of increasing temperatures on biomarker responses and accumulation of hazardous substances in rope mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Bizerte lagoon

Naouel Kamel · Thierry Burgeot · Mohamed Banni ·
Mohamed Chalhaf · Simon Devin · Christophe Minier ·
Hamadi Boussetta

Received: 31 July 2013 / Accepted: 8 January 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract This study examined the influence of increasing temperatures in spring and summer on biochemical biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* mussels sampled from Bizerte lagoon (northern Tunisia). Spatial and seasonal variations in a battery of seven biomarkers were analyzed in relation to environmental parameters (temperature, salinity, and pH), physiological status (condition and gonad indexes), stress on stress (SoS), and chemical contaminant levels (heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and PCBs)

Responsible editor: Philippe Garrigues

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11356-014-2540-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Kamel (✉) · M. Banni · H. Boussetta
Biochemistry and Environmental Toxicology Research Unit, ISA
Sousse University, Chott Mariem, Tunisia
e-mail: kamel_naouel@yahoo.fr

N. Kamel · T. Burgeot
Laboratory of Ecotoxicology, Biogeochemistry and Ecotoxicology
Research Unit, BP 2105, 44311 Nantes, France

T. Burgeot
e-mail: tburgeot@ifremer.fr

M. Chalhaf
Aquatic Environmental Exploitation Research Unit, ISPA Bizerte,
BP 15, Rimel, Tunisia

S. Devin
Interdisciplinary Laboratory of Continental Environments,
University of Lorraine, Metz, France

C. Minier
Laboratory of Ecotoxicology, University of le Havre, BP 540,
76058 Le Havre, France

in digestive glands. Integrated biological response (IBR) was calculated using seven biomarkers (acetylcholinesterase (AChE), benzo[a]pyrene hydroxylase (BPH), multixenobiotic resistance (MXR), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA), and metallothioneins (MT). Seasonal variations in biological response were determined during a critical period between spring and summer at two sites, where chemical contamination varies by a factor of 2 for heavy metals and a factor 2.5 for PAHs. The analysis of a battery of biomarkers was combined with the measurement of physiological parameters at both sites, in order to quantify a maximum range of metabolic regulation with a temperature increase of 11 °C between May and August. According to our results, the MT, MDA, CAT, and AChE biomarkers showed the highest amplitude during the 11 °C rise, while the BPH, GST, and MXR biomarkers showed the lowest amplitude. Metabolic amplitude measured with the IBR at Menzel Abdelrahmen—the most severely contaminated station—revealed the highest metabolic stress in Bizerte lagoon in August, when temperatures were highest 29.1 °C. This high metabolic rate was quantified for each biomarker in the North African lagoon area and confirmed in August, when the highest IBR index values were obtained at the least contaminated site 2 (IBR = 9.6) and the most contaminated site 1 (IBR = 19.6). The combined effects of chemical contamination and increased salinity and temperatures in summer appear to induce a highest metabolic adaptation response and can therefore be used to determine thresholds of effectiveness and facilitate the interpretation of monitoring biomarkers. This approach, applied during substantial temperature increases at two sites with differing chemical contamination, is a first step toward determining an environmental assessment criteria (EAC) threshold in a North African lagoon.

Keywords Biomarkers · Mussels · Lagoon biomonitoring · Integrated biomarker response

Introduction

In Mediterranean lagoon ecosystems, exchanges with the open sea and water circulation are mainly governed by winds and atmospheric pressure (Rougier et al. 2000). These systems are characterized by shallow waters (Amri et al. 2010), which allow the wind to mix the entire water column, thus enhancing diatom proliferation (Jarry et al. 1990). Bizerte lagoon, located in northern Tunisia, is linked to the Mediterranean Sea by a single entrance channel. It is situated near various industrial units and agricultural areas and has been used for shellfish farming since 1964 (Beji 2000). It is the recipient of a variety of industrial waste, pesticides, and chemical fertilizers through soil erosion and runoffs, which has led to a decrease in bivalve and fish production (ANPE 1990). Indeed, direct and indirect discharges of urban and industrial wastes and runoffs have resulted in chemical contamination of the lagoon by various toxic compounds such as organochlorine pesticide (OCPs) (Cheikh et al. 2002), halogenated aromatics compounds such as polychlorinated biphenyls (PCBs) (Derouiche et al. 2004), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Trabelsi and Driss 2005), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their methoxylated analogs (Ben Ameer et al. 2011), and heavy metals (Ben Garali et al. 2010).

Biomarkers are increasingly used to assess environmental quality and, in particular, the chemical quality of lagoons, in the aim of assessing the biological effects of environmental contaminants on aquatic organisms living in them (Ben Ameer et al. 2012). They are among the emerging tools used in monitoring programs to assess the biological effects of chemical contaminants (Allan et al. 2006; Depledge 2009) and can be used to reveal environmental stresses caused by contaminants and other environmental variables. The integration of biomarkers and chemical analysis is therefore an essential factor of success for establishing links between stress and pollution (Galloway et al. 2004; Thain et al. 2008).

In poikilothermic organisms such as bivalves, ambient temperature is one of the major factors driving physiological and biochemical processes (Pfeifer et al. 2005). Mussels may be exposed to extreme temperature fluctuations and major changes in body temperature within a short period of time during the hot season (Sokolova 2004) and are capable of challenging sustained seasonal variations in environmental temperatures (Banni et al. 2011).

In a previous study, we investigated oxidative stress and detoxification response in *Mytilus galloprovincialis* after exposure to thermal stress (18–20–22–24–26 °C) and a sublethal dose of benzo[a] pyrene (Kamel et al. 2012). Our results

demonstrated the negative effects of acute heat stress on mussel response, manifested by cellular genotoxicity and cytotoxicity.

In order to study the in situ influence of elevated temperatures on mussels, we used rope mussels (*M. galloprovincialis*) as sentinel organisms to assess (1) variations in a suite of biomarkers, (2) the capacity of mussels to accumulate hazardous substances, and (3) related effects of increasing summer temperatures in Bizerte lagoon. For this purpose, biomarkers of oxidative stress were measured in the gills and digestive glands of mussels in late spring and summer 2011. We particularly took the following criteria into consideration, in line with the results of large-scale biomonitoring programs such as MED POL and OSPAR (UNEP 1999; ICES 2010): survival in air (stress on stress (SoS)), condition index, gonadic condition index, neutral red retention, benzo[a]pyrene hydroxylase (BPH) activity, glutathione S-transferase (GST) activity, catalase (CAT) activity, acetylcholinesterase (AChE) activity, multixenobiotic resistance (MXR), metallothioneins (MT), and lipid peroxidation.

Survival time in air can indicate the general health of organisms (Viarengo et al. 2007). Mussel survival time can be considered as a “stress on stress” response. Similarly, the condition index (CI) can provide general information on the more general energy budget allocation of mussels (Gomiero et al. 2011). The CI summarizes the physiological activity of organisms (growth, reproduction, secretion, etc.) in given environmental conditions (Lucas and Beninger 1985) and is mainly used for two purposes: first, to guarantee the quality of meat for the marketplace (Orban et al. 2002) and second, as an ecophysiological measurement of animal health status.

Activity of the biotransformation enzyme BPH can be used indirectly to measure CYP450 1A activity, which is involved in the biotransformation of xenobiotics (Snyder 2000). This biotransformation enzyme has previously been used as a biomarker of exposure to organic pollutants and, in particular, PAHs (Akcha et al. 2000; Burgeot et al. 2006; Banni et al. 2010). GST is involved in Phase II of biotransformation and thus in the detoxification of numerous environmental chemicals, as it catalyzes the conjugation of glutathione to electrophilic compounds (e.g., epoxides of PAHs), hence rendering them less reactive and more water soluble (Cheung et al. 2001; Pan et al. 2009).

P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance (MDR), two ATP-driven membrane pumps and the lung resistance protein (LRP), which is the main vault protein (MVP), are part of the Phase III system and involved in the excretion of conjugated metabolites. MXR is an MDR-like system that has been identified in marine invertebrates (McFadzen et al. 2000; Smital et al. 2000). The relevance of MXR has been demonstrated through its potential ability to protect aquatic organisms from DNA damage (Waldmann et al. 1995). MXR

protein expression is inducible by exposure to toxic compounds (Minier and Moore 1996). Quantities of these proteins vary significantly across differentially polluted sites (Minier et al. 2000).

CAT is an antioxidant enzyme used as a biomarker of the oxidative stresses induced by a wide range of contaminants, including organic xenobiotics, heavy metals, and PAHs (Livingstone 2001; Sureda et al. 2011). Malondialdehyde (MDA) is used as marker of membrane phospholipid oxidation through lipid peroxidation. Increased MDA levels in organisms may be related to the degradation of an environmental site due to decreased water quality (Charissou et al. 2004). Studies carried out on marine species have shown lipid peroxidation to be a relevant index of toxin-induced chemical injury (Avery et al. 1996).

AChE is an enzymatic biomarker of neurotoxicity and responsible for acetylcholine degradation. AChE activity is inhibited by the presence of pesticides such as organophosphorus compounds, carbamates, and various heavy metals or PAHs in mussels (Bocqu   et al. 1993; Mora et al. 1999a, b). Tissue levels of MT proteins were estimated in mussel digestive glands in order to evaluate their biological effects on sentinel organisms and assess trace metal pollution in the aquatic environment. MTs are involved in both homeostasis and detoxification (Viarengo and Nott 1993), and their accumulation is more obvious in gills, digestive glands, and kidneys, hence reflecting the significant role of these tissues in the uptake, storage, and excretion of metals (Bebiano and Langston 1992).

Biomarker evaluation in mussels is a major tool used in aquatic environment biomonitoring to assess the causal relationship between exposure to environmental pollutants and long-term effects on individuals and populations (Bolognesi et al. 2004; Bodin et al. 2004). However, the exploration of large datasets of chemical and biological measurements requires a coherent suite of assessment criteria and tool indexes in order to provide standardized interpretations for monitoring purposes. In this aim, we attempted to determine assessment criteria for measuring biological effects by applying the OSPAR strategy; we also applied the integrated biomarker response index (IBR) in order to interpret a global response from the various measured biomarkers. Background assessment criteria (BAC) and environmental assessment criteria (EAC) have already been developed for mussels and fish in the framework of the integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects in the Northeast Atlantic (Davies and Vethaak 2012). The IBR index was computed using the biomarker measured in *M. galloprovincialis* in order to assess ecological risks associated with pollution at Bizerte lagoon study sites.

The aim of this study was to examine the influence of increasing temperatures in spring and summer on the

biomarker responses of mussels inhabiting a North African lagoon, recognized as a sensitive area in terms of temperature changes and pollution. Biomarker variations were initially compared during the highest temperature elevation, between spring and summer. The amplitude response of the biomarkers was then studied across two sites characterized by different levels of chemical contamination.

Materials and methods

Study area

This study was performed at two sites in Bizerte lagoon (Fig. 1). The Menzel Abdelrahmen site (S1) (37 13' N, 9 51' E), located between the port and the former wastewater (ONAS) discharge, is characterized by urban effluents (Mahmoud et al. 2010), while the Baie des Carrières site (S2) (37 13' N, 9 49' E), located in the channel between the lagoon and Mediterranean Sea, is subjected to intensive maritime traffic and various impacts from the channel area characterized by a strong hydrological dynamics (Khessiba et al. 2001a, b; Cheikh et al. 2002).

Sampling strategy

Mussels of similar sizes (5–7 cm shell length) were sampled monthly from both sites in late spring and summer 2011. The same cohort of juvenile mussels from the same native area (Bizerte lagoon) was selected for this study. Two sites with contrasting levels of chemical contamination, S1 Menzel Abdelrahmen and S2 Baie des Carrières, were selected in the lagoon. These sites, which respectively show high and low chemical contamination levels, are suitable for comparison thanks to their homogeneous physicochemical parameters within the lagoon area.

The mussels were immediately transported to the laboratory. In the laboratory, two samples of 30 individuals were used for biometric analyses (shell length and soft body wet weight) and for the stress on stress test. Fifty to sixty mussels were then scarified for excision of the digestive gland (DG) and gills (G), for the purpose of chemical and biomarker analyses. The sampled tissues were stored in liquid nitrogen at –80  C prior to the assays. All biomarkers were analyzed in the same mussel, whereas stress on stress and chemistry were analyzed on other individuals from the same cohort.

Water quality was assessed at each sampling time. The physicochemical quality of Bizerte lagoon waters was monitored in situ. Salinity (grams per liter), temperature (degrees Celsius), dissolved oxygen (milligrams per liter), and pH were measured at the sampling sites using a Multi 350i Multimeter.

Fig. 1 Map of the study area and location of sampling sites at the Bizerta Lagoon. Site 1: S1 Menzel Abdelrahmen, site 2: S2 Baie des Carrières



Chemical analyses

Determination of PAH content

Three distinct pools were prepared (one pool = three digestives glands). PAH content in the digestive gland fractions was determined by gas chromatography (GC) coupled with mass spectrometry (MS), based on a protocol described by Baumard and Budzinski (1997). An HP GC (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, USA), equipped with a split/splitless injector, was used. PAHs were quantified relative to perdeuterated PAHs (Baumard and Budzinski 1997). The response factors of the various compounds were measured by injecting a standard reference material solution (SRM 2260; 24 aromatic hydrocarbons in toluene) (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA), spiked with the same solution containing perdeuterated PAHs as that used for spiking mussel digestive glands. The detection limits for PAH congeners was approximately 50 pg/g. Results were expressed in micrograms per gram dry weight.

Determination of PCB content

A standard mixture of 12 PCB congeners (PCB-18, 28, 31, 52, 44, 101, 149, 118, 153, 138, 180, and 194) at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in heptane was purchased from Supelco (CIL, USA). These standard solutions were further diluted by *n*-hexane to obtain mixed fortifying and GC calibration standard solutions for all compounds.

PCB compounds were analyzed using the method described by Guo et al. (2008). Freeze-dried digestive gland tissue (10 g) was Soxhlet-extracted with *n*-hexane:acetone (4:1; v/v) for 16 h at a rate of five cycles per hour. The extract was concentrated using a rotary evaporator. An aliquot of 1 mL was used for gravimetric determination of the extractable lipid content. The remaining lipids were removed by treatment with concentrated sulfuric acid ($4 \times 10 \text{ mL}$), after adding BDE-77 as internal standard. In addition, a cleanup was performed on a column ($40 \times 0.5 \text{ cm ID}$) packed with 5 g of activated Florisil and topped with 1 g of anhydrous sodium sulfate. The extract was eluted with 50 mL of dichloromethane and *n*-hexane (1:9; v/v). The eluate was finally concentrated in a Kuderna-Danish to 0.5 mL and was then ready for instrumental analysis. The limit of detection, calculated as three times the signal-to-noise ratio, ranged from 500 to 1,000 pg g^{-1} lipid weight for PCBs. Results were expressed in nanograms per gram dry weight.

Determination of heavy metal content

Digestive gland tissue (five distinct pools prepared as described below) was thawed and dried at 508 °C to a constant weight. Digestion of the samples was performed in a microwave oven (CEM-MDS 81D), in high-pressure vessels with concentrated nitric acid (Amiard et al. 1987). Cd, Cu, Zn, and Ni concentrations were determined by atomic absorption spectrophotography with an acetylene flame for Cu and Zn, and a graphite furnace for Cd and Ni (Amiard et al. 1987).

Internal controls, based on standard reference materials with certified metal content, together with international intercalibration exercises, were carried out to validate this procedure. The limit of detection of Cd, Cu, Zn, and Ni was 0.05 mg g⁻¹ wet weight. Results were expressed in micrograms per gram dry weight.

Physiological indexes

The CI was determined as an indicator of mussel physiological status. CI is an ecophysiological measurement of animal health that summarizes physiological activity (growth, reproduction, secretion, etc.) in given environmental conditions.

Shell thickness, length, and width were measured using a 0.05-mm precision caliper as described by Fisher et al. (1987). Once the biometric measurements had been completed, the valves of each individual (30 specimens) were opened carefully and all tissues were removed from the shells. Before weighing, excess moisture was removed from all parts of the animals using absorbent paper. After recording total weight and visceral mass wet weight, the tissue was then dried at 70 °C for 48 h.

The CI was calculated as follows:

$$CI = MDW / (TW - SDW) \times 100 \text{ (Lucas and Beninger 1985)}$$

whereby MDW is meat dry weight (grams), TW is total weight, and SDW is shell dry weight (grams).

Stress on stress

The survival in air (SoS) test was performed on 30 animals from each site on their arrival at the laboratory, using the method described by Viarengo et al. (1995). The mussels were placed in a plastic box at a constant room temperature of 18 ± 1 °C with less than 100 % humidity. Mortality was checked daily. Mussels were considered dead when they did not produce any response to an external stimulus, after their valves gaped, or they did not react when placed in sea water. Results were expressed in number of survival days.

Biochemical analysis

Ten mussels ($n = 10$) from each site were analyzed individually for each biomarker measurement.

Prior to biochemical analysis, the digestive glands were homogenized in a phosphate buffer (0.1 M [pH7.5]). The resulting homogenate was centrifugated at 100,000 × g for microsomal fractions and 9,000 × g for cytosolic fractions (S9). The quantities of proteins present in the microsomal fractions and S9 fraction were determined according to the Bradford (1976) method, using Coomassie Blue reagent (BioRad).

Benzo[*a*]pyrene hydroxylase (BPH) Each pool of microsomal fractions of digestive glands was prepared at 4 °C using differential centrifugation, as described by Michel et al. (1994). The quantity of S9 proteins was determined on the basis of the obtained supernatant (S9), according to the Bradford method (1976), using bovine serum albumin as standard. BPH activity was then assayed in the presence of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), using the fluorimetric assay of Michel et al. (1994), as adapted to the microplate reader by Akcha et al. (2000). Results were expressed in nanomoles per minute per milligram proteins.

GST activity was measured in digestive gland cytosol according to the method of Habig et al. (1974), using 10 lg cytosolic protein CDNB (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO) as a substrate and glutathione reduced-form GSH (1 and 4 mM final concentrations, respectively) in a 100-mM sodium phosphate buffer (pH 7.5). GST activity was determined by kinetic measurement at 20 °C using a Jenway 6105 spectrophotometer ($k = 340$ nm). Results were expressed as micro-moles GSH-CDNB produced per minute per milligram protein.

CAT was determined using the method of Clairborne (1985). The reaction mixture (final volume 1 mL) contained 0.78 mL 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) and 0.2 mL 0.5 mM H₂O₂. After 30 s of preincubation, a reaction was triggered by adding 0.02 mL of the (S9) solution containing CAT fractions. CAT activity was assessed by kinetic measurement at 20 °C using a Jenway 6105 spectrophotometer ($k = 240$ nm). Results were expressed as micromoles hydrogen peroxide transformed per minute per milligram protein.

Lipid peroxidation was estimated in terms of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), with the use of 1,1,3,3-tetraethyloxypropane as standard. The reaction was assessed at 532 nm using TBA reagent as described by Buege and Aust (1978). MDA content was expressed as nanomoles equivalent MDA per milligram protein.

Acetylcholinesterase (AChE) Gill tissues were homogenized in a phosphate buffer (0.02 M, pH 7, Triton X 100, 1:2 w/v), then centrifugated at 9,000 × g for 20 min at 4 °C. The supernatant (S9) was used to determine AChE activity using the modified method of Ellman et al. (1961) by Bocquené et al. (1993). Protein concentration was determined with the Bradford (1976) method, using bovine serum albumin as standard. Results were expressed in micromoles per minute per milligram protein.

MXR proteins was determined with the Western blot method (Minier et al. 2000), using an anti-hamster Pgp C219 monoclonal antibody (Centocor Diagnostics, Malvern, PA, USA) and an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma).

MT content was evaluated using the spectrophotometric method described by Viarengo et al. (1997), based on cysteine residue titration of a partially purified MT extract. MT protein levels were determined with a spectrophotometric assay for MTs, using Ellman's reagent (0.4 mmol/L DTNB in 100 mmol/L KH_2PO_4) at pH 8.5 in a solution containing 2 mol/L NaCl and 1 mmol/L EDTA. Reduced GSH standard solutions were used for calibration (2–100 mmol/L) and data was expressed in micrograms MT per milligram protein, taking into consideration mussel MT molecular weight and number of cysteine residues (21 residues) (Viarengo et al. 1997).

Integrated biomarker response determination

The biomarkers were then considered simultaneously by calculating the renewed version of the Integrated biomarker response (Beliaeff and Burgeot 2002) by Devin et al. 2013. Once the standardized value of each biomarker had been calculated, all possible circular permutations of the k biomarkers were computed. This resulted in a matrix of IBR values, enabling calculation of the median IBR for a site and cross-site comparison of IBR values.

BAC and EAC determination

Background assessment criteria (BAC) and EAC were drawn up using the 10th and 90th percentiles of data. BAC was estimated using data from site 2 (least contaminated site and lowest temperature) and described background level threshold values. EACs are recently derived from toxicological data or expert knowledge and indicate a significant risk to the organism (Davies and Vethaak 2012). In our study, EAC were calculated during the highest temperatures and at the most contaminated site S1.

Statistical analysis

The experimental data was initially tested for normality and homogeneity of variance, in order to meet statistical demands. Data was expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Data statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's test for multiple range comparison, $p < 0.05$ was considered as significant. Different letters (a, b) indicated significant differences between groups. The Pearson correlation coefficient was also calculated in order to study the relationships between the various biochemical and chemical analyses. Differences in mussel size between the two sites were evaluated using Student test ($p < 0.05$) for each sampling date. All biological, chemical, and physicochemical data were further subjected to principal component analysis (PCA), this analysis was used to discriminate the abiotic parameters effects on biological response in mussels from two sites in the lagoon. Eighteen

variables were taken into consideration: concentrations of for traces metals, Σ PAHs and Σ PCB concentrations, physico-chemical parameters (oxygen dissolved, salinity, and seawater temperature), seven biomarkers (BPH, CAT, GST, and AChE activities, MXR, TBARS, and MT levels), as well as the condition and the gonadic indices of mussels. All statistical tests were performed using the Statistica 6 software package (StatSoft, USA).

Results

Monitoring of environmental parameters

Environmental parameters revealed changes in water quality according to sampling time (Table 1). Water temperature increased in Bizerte lagoon during the study period and a marked increase in temperature (i.e., +11 °C) was observed between May and August 2011. In a corresponding way, a significant increase in lagoon salinity was recorded in August (37.8 psu) versus May (32 psu). The lowest concentration of dissolved oxygen was recorded in August (6.2 mg L⁻¹). This decrease in dissolved oxygen concentration was the result of an increased chlorophyll a concentration. Indeed, chlorophyll a concentrations in lagoon waters were found to be higher in August (3.642 $\mu\text{g L}^{-1}$) than in May (2.185 $\mu\text{g L}^{-1}$). The increases in temperatures and salinity, associated with a relative decrease in dissolved oxygen we observed during the summer months, is favorable to the eutrophication of Bizerte lagoon (Khessiba et al. 2005). There were no variations in pH, turbidity, nitrite, nitrate, ammonia, and silicate concentrations throughout the study period except pH with decrease of 0.5.

Table 1 Physical and chemical parameters in Bizerte lagoon

	May	June	July	August
$T(^{\circ}\text{C})$	18.1 $\pm$ 2.2	19.6 $\pm$ 2.1	26.2 $\pm$ 2.8	29.1 $\pm$ 3.1
Sal (psu)	32 $\pm$ 2.9	32.7 $\pm$ 3.4	33.4 $\pm$ 3.4	37.8 $\pm$ 2.9
pH	8.35 $\pm$ 1.2	8.3 $\pm$ 0.92	8.5 $\pm$ 0.81	8 $\pm$ 0.95
DO (mg L ⁻¹)	7.5 $\pm$ 0.6	8 $\pm$ 0.75	6.9 $\pm$ 0.58	6.2 $\pm$ 0.57
Tur (NTU)	1.6 $\pm$ 0.18	1.8 $\pm$ 0.95	2.1 $\pm$ 0.24	2.5 $\pm$ 0.18
Chl-a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2.185 $\pm$ 0.23	2.012 $\pm$ 0.21	2.326 $\pm$ 0.21	3.642 $\pm$ 0.29
NO_2^- ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.57 $\pm$ 0.05	0.615 $\pm$ 0.01	0.535 $\pm$ 0.06	0.595 $\pm$ 0.03
NO_3^- ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	4.1 $\pm$ 0.45	4.3 $\pm$ 0.44	4.9 $\pm$ 0.45	5.6 $\pm$ 0.6
NH_4^+ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	23.65 $\pm$ 2.42	24 $\pm$ 2.6	21.7 $\pm$ 2.19	23.2 $\pm$ 2.5
SiO_3^{3-} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	3.385 $\pm$ 0.37	2.645 $\pm$ 0.19	3.125 $\pm$ 0.33	2.95 $\pm$ 0.31
PO_4^{3-} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.5 $\pm$ 0.07	0.715 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.13	1.3 $\pm$ 0.17

Values represents the mean and the standard deviation of temperature (T), salinity (Sal), pH, dissolved oxygen (DO), turbidity (Tur), nitrite (NO_2^-), nitrate (NO_3^-), ammonia (NH_4^+), silicate (SiO_3^{3-}), and phosphate (PO_4^{3-}). Data represent the mean of five values measured in several sites on the lagoon at each sampling time

Chemical analyses

Trace metal concentrations in mussel digestive glands showed both temporal and spatial variations. Generally speaking, metal concentrations (Cd, Cu, Zn, and Ni) as a whole were significantly higher in the digestive glands of mussels sampled from site 1 versus site 2 ($p < 0.05$) and contamination levels at the respective sites differed by a factor of 1.5. Metal trends were similar at both study sites (Fig. 5), with the lowest values in May and the highest values in August. Moreover, concentrations of all metals were significantly correlated with water temperature ($p < 0.05$).

All measured trace metals showed a significant correlation with MT accumulation at both sites. Cd was significantly correlated to MT ($r = 0.59$; $p < 0.05$) and ($r = 0.50$; $p < 0.05$), respectively, at sites 1 and 2 (Table 2). PCA analyses were performed to obtain a global vision of the results according to the mean values of pollutant levels in digestive gland, biomarker responses in mussel's tissues and physicochemical parameters of water (Fig. 5). Both sites showing that the accumulations of Cd, Cu, Zn, and Ni were grouped and related to the water temperature. Almost all PAH compounds measured in digestive glands were three times higher in mussels from the Menzel Abdelrahmen site (site 1) versus the Baie des Carrières site (site 2). PAHs content was significantly higher in the digestive glands of mussels collected from site 1 versus site 2 ($p < 0.05$) (Table 2). The highest values of Σ PAHs concentrations were found in August at site 1 (Σ PAHs = $2.03 \mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) and in July at site 2 (Σ PAHs = $0.92 \mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) (Table 2). Σ PAHs concentrations were significantly correlated with water temperature at site 1 only ($r = 0.66$; $p < 0.05$). Total PAHs at site 1 showed a significant correlation with the detoxification enzymes on phase I BPH activity ($r = 0.58$; $p < 0.05$) and phase II GST activity ($r = -0.84$; $p < 0.05$).

Concentrations of PCBs in digestive glands were significantly higher in mussels from site 1 versus site 2 ($p < 0.05$). The monthly trends of Σ PCB at both sites were similar, with increased levels between May and August. The trends of each PCB compound were similar at both sites, with generally higher levels in May for PCB-18, PCB-52, PCB-44, and PCB-194 and in August for the remaining compounds. A significant correlation was found at both sites between PCB concentrations and CAT activity, with ($r = 0.80$; $p < 0.05$) and ($r = 0.48$; $p < 0.05$), respectively, at sites 1 and 2.

Physiological parameters

During the sampling period, the size of the mussels showed no difference between the two study sites ($p < 0.05$) with ($p = 0.594$; $p = 0.786$; $p = 0.879$; $p = 0.724$), respectively, in May, June, July, and August. Both stations appear homogeneous with a seamless growth factor inside the lagoon.

Physiological response to temperature changes was determined by examining condition and gonadic indexes (CI and GI). CI calculated during the study period remained constant in May and June, then showed a slight decrease in July, offset by an increase in August. However, these variations were not significant ($p < 0.05$) (Fig. 2). In mussels sampled at site 1, CI ranged from 35.80 ± 5.64 to 37.27 ± 4.58 in May 2011 and August 2011, respectively. Mussels collected from site 2 showed condition indexes ranging from 38.33 ± 7.16 to 42.9 ± 6.8 during the study period.

Similarly, there were no significant differences in GI throughout the sampling period at the two sites. Physiological parameters seems to be related to abiotic factors such as pH and dissolved oxygen in seawater (Fig. 5).

Stress on stress curves and LT_{50} values for all sampling months at both study sites are reported in Fig. 3. LT_{50} values

Table 2 PAH, PCB, and trace metal concentrations in the digestive glands of *M. galloprovincialis*

Biomarkers	Tissue	Suggested BAC for the Bizerta lagoon	Suggested EAC for the Bizerta lagoon	BAC OSPAR (Davies and Vethaak 2012)	EAC OSPAR (Davies and Vethaak 2012)
AChE	Gills	43 (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ P)	30 (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ P)	15 (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ P)	10 (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ P)
CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{P}$)	Digestive gland	335	370	—	—
MDA (nmol mg ⁻¹ P)	Digestive gland	2	5	—	—
MT ^a ($\mu\text{g mg}^{-1} \text{P}$)	Digestive gland	144	203	—	—
BPH (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ P)	Digestive gland	0.2	0.3	—	—
GST ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg P}$)	Digestive gland	152	165	—	—
MXR (OD $\mu\text{g}^{-1} \text{P}$)	Gills	111	187	—	—

The above values represent mean and standard deviation in pooled samples of digestive glands. Concentrations are expressed as (micrograms per gram dry weight), (nanograms per gram dry weight) and (micrograms per gram dry weight), respectively, for PAHs, PCBs compounds, and trace metals. <DL: below detection limit. Superscript "a" indicates $p < 0.05$ (significantly different by ANOVA, multiple comparison, and Duncan's test across sites).

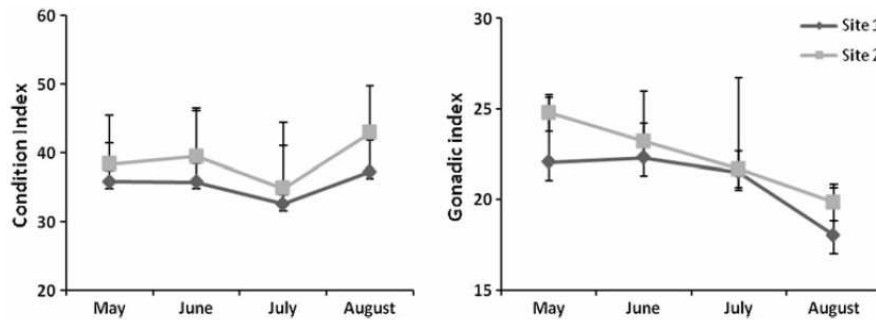


Fig. 2 Temporal and spatial variations in the condition index (a) and gonadic index (b) of *M. galloprovincialis* collected from the Menzel Abdelrahmen (site 1) and Baie des Carrières (site 2) in late spring and summer

ranged from 5 to 9. No differences were observed across the study sites. Survival time was longer at both sites in May than in August. There were no significant physiological differences related to chemical contamination at the two stations. However, mussel metabolic adaptation response was naturally more intensive when the temperature was at its highest in August, hence apparently affecting the resilience of immersed mussels.

Biotransformation enzymes

The markedly high water temperature at our study sites appeared to influence the level of expression of all analyzed biomarkers. Indeed, the three studied biomarkers involved in biotransformation mechanisms (BPH, GST, and MXR) revealed a very noticeable monthly variation starting in July, when the water temperature rose sharply from 19 to 26 °C

(Table 1). In fact, BPH activity measured in the digestive glands of mussels sampled from the Menzel Abdelrahmen site showed a very significant ($p < 0.05$) induction in August ($p = 0.00005$), when the water temperature reached 29 °C (Fig. 4a). BPH activity was significantly higher ($p < 0.05$) in animals sampled from the Menzel Abdelrahmen site (site 1) versus site 2 ($F = 23, 1,747$; $p = 0.0001$). The highest values (0.31 and 0.27 nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteins) were recorded at site 1 in June and August, respectively, but did not correspond to a progressive temperature elevation. No significant monthly variations were recorded at site 2. BPH activity appears to be the most biomarker related to PAH accumulation (Fig. 5), thus indicating the induction effect of PAH contamination on enzyme of phase I.

Variations in GST activity in mussel digestive glands were also observed during the study period. GST activity ranged from 91.8 to 176.8 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteins at site 1 and 129.8 to 157.9 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteins at site 2 (Fig. 4b). GST decreased progressively as temperature increased. A significant difference in GST activity at both sites was also observed in June ($p_1 = 0.000021$; $p_2 = 0.0236$) and August ($p_1 = 0.000025$; $p_2 = 0.0010$), respectively, for site 1 and site 2.

MXR protein expression in the gills of mussels collected monthly in late spring and summer appeared to be more affected by water temperature elevation in August (Fig. 4c). MXR protein levels were significantly lower at site 2 than at

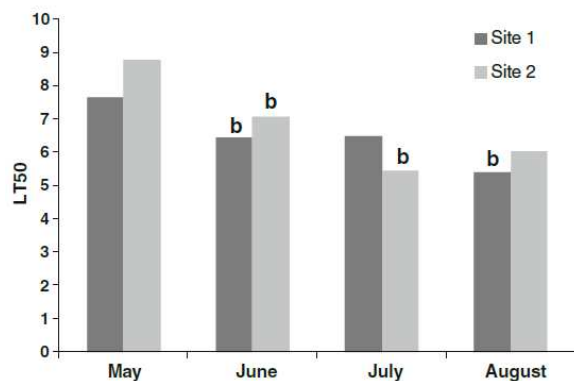
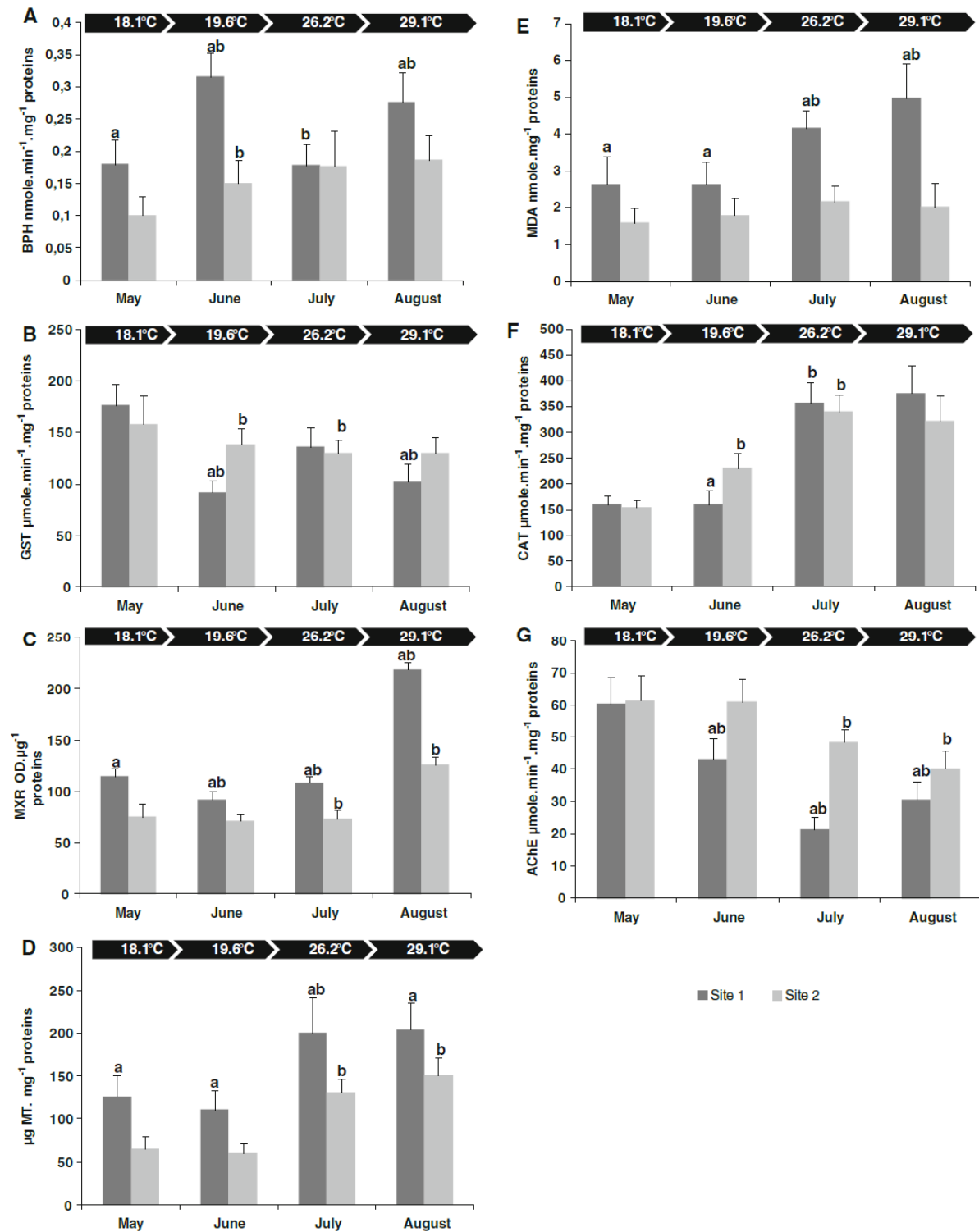


Fig. 3 The stress on stress response of mussels collected during summer 2011 from A. Menzel Abdelrahmen (site 1) and B. Baie des Carrières (site 2), both located in Bizerta Lagoon. Superscript "a" indicates $p < 0.05$ (significantly different by ANOVA, multiple comparison and Duncan's test across sites ($n = 30$)). Superscript "b" indicates $p < 0.05$ (significantly different by ANOVA, multiple comparison, and Duncan's test among month ($n = 30$))

Fig. 4 Spatial and temporal variations in biomarker response of *M. galloprovincialis* collected from the Bizerta Lagoon, Menzel Abdelrahmen (site 1) and Baie des Carrières (site 2). a Digestive gland BPH activity. b Digestive gland GST activity. c Densitometric analysis of MXR proteins as detected by Dot blot. d Digestive gland metallothionein accumulation. e Digestive gland MDA content. f Digestive gland CAT activity. g Gill AChE activity. Data represents means $\pm$ SD. Superscript "a" indicates $p < 0.05$ (significantly different by ANOVA, multiple comparison and Duncan's test across sites ($n = 10$)). Superscript "b" indicates $p < 0.05$ (significantly different by ANOVA, multiple comparison and Duncan's test among month ($n = 10$))



the more contaminated site 1 ($\rho < 0.05$) ($F = 50.930$; $p = 0.000001$). The highest levels were observed in August at

both sites, with 218.4 OD/µg proteins and 125.9 OD/µg proteins at sites 1 and 2, respectively.

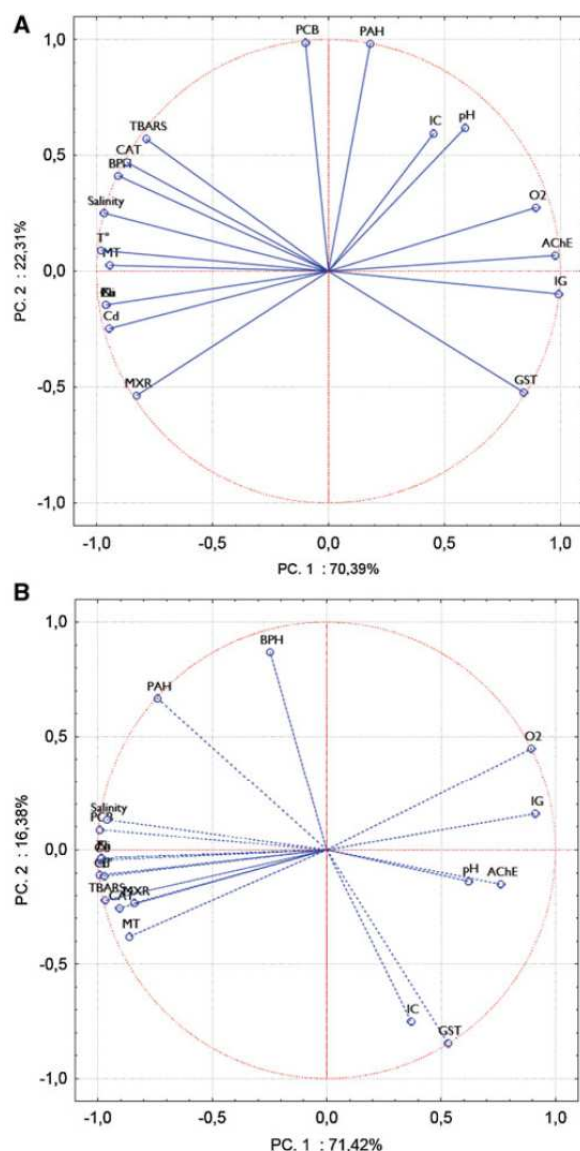


Fig. 5 Principal component analysis (PCA) based on mean values: chemical, biochemical, biological, and physicochemical water variables (PC 1 versus PC 2) in the mussel collected from the Bizerta Lagoon, A Menzel Abdelrahmen (site 1) and B Baie des Carrières (site 2)

Oxidative stress

Oxidative stress biomarkers were highest when water temperature was at its highest in July and August. Moreover, CAT activity was significantly higher in the digestive glands of *M. galloprovincialis* collected from both sites in July and August (Fig. 4f). CAT activity ranged from 159.8 to 375.6 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteins at site 1 and from 153.6 to 340.4 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteins at site 2. The amplitude of

response was similar from May to June and no clear inter-site trends were observed during the study period.

MDA accumulation (Fig. 4e), evaluated as TBARS in mussel digestive glands, differed significantly at the two sites ($p < 0.05$) ($F = 15.285$; $p = 0.001$). At site 1, MDA accumulation ranged from 2.6 to 4.9 nmol mg^{-1} proteins and the highest value was recorded in August. At Baie des Carrières (site 2), MDA content was homogenous and increased progressively according to temperature. No significant temporal variations were observed.

Neurotoxicity

AChE activity measured in *M. galloprovincialis* gills (Fig. 4g) showed this biomarker to be significantly inhibited in mussels sampled in July and August versus those sampled in late spring (May and June). AChE activity ranged from 21.5 to 60.3 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteins in the gills of mussels from site 1 and from 40.1 to 61.2 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteins in the gills of mussels from site 2 ($F = 18.893$; $p = 0.00038$). The amplitude of response was higher at the more contaminated site 1. A significant difference was observed in AChE activity in mussels sampled from site 1 versus site 2 during the summer months (June, July, and August 2011) ($p < 0.05$). Lower levels of activity were detected in mussels sampled from site 1 and significant differences were also recorded during the biomonitoring survey conducted at the same site.

Metal-related stress

MT accumulation (Fig. 4d) evaluated in mussel digestive glands revealed significant temporal variations. The temperature-dependent accumulation of MT was shown to be more pronounced in animals sampled from both sites in August. MT concentrations in the digestive glands of mussels from site 1 were significantly higher than in those from site 2 throughout the study period ($p < 0.05$) ($F = 46.526$; $p = 0.000002$). MT content ranged from 126.54 $\mu\text{g mg}^{-1}$ proteins in May to 203.95 in August and from 64.77 $\mu\text{g mg}^{-1}$ proteins in May to 150.29 in August in the digestive glands of mussels from site 1 and site 2, respectively. MT response appeared to be month-related at both sites, with lower values observed in May versus August.

IBR index

The IBR index demonstrates an increase of the metabolic response in relation with the temperature (Fig. 6) and secondly with the salinity in the two sites 1 and 2. The lowest IBR values (from 2 to 6) were calculated in the two sites when the temperature is less than 18 °C, in May and June. The IBR index increase greatly from June to August when the temperature raise from 19 to 29 °C. The greatest increase of IBR

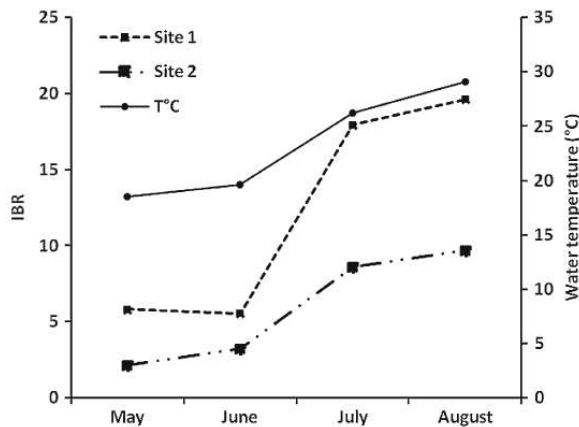


Fig. 6 Variations in water temperature and integrated biomarker response calculated for a set of biomarkers measured in caged mussels sampled from two sites (site 1 Menzel Abdelrahmen and site 2 Baie des Carrières) at the Bizerte lagoon during the hot months

(from 5 to 19.6) is obtained in the most contaminated site 1 when the highest temperature and the highest chemical contamination are cumulated.

Discussion

The purpose of this study was to quantify the biological effects of the highest summer water temperatures on biomarker responses analyzed in mussels from Bizerte lagoon at two sites with differing degrees of chemical contamination (PAHs, PCBs, trace metals). Various works have reported a close relationship between thermal stress and biomarker response in marine molluscs (Regoli 1992; Domouhtsidou and Dimitriadis. 2001; Moore et al. 2006; 2007; Zhang et al. 2006). In our study, significant alterations to biochemical markers were observed in mussels sampled from the most contaminated site 1 versus site 2. Indeed, biomarker responses in *M. galloprovincialis* showed clear temporal and spatial variations. Temperature has been considered as the primary factor affecting natural enzyme activity (Leiniö and Lehtonen. 2005); and salinity can be considered as a second factor in the Bizerte lagoon. These variations therefore probably reflect environmental parameter changes associated with contaminant bioavailability. The biological availability and toxicity of trace metals are determined by their chemical speciation which is dominated by organic complexation along a gradient of salinity in estuary (Money et al. 2011)

Temporal variations in the condition index of mussels from both sites showed very similar patterns during the study period, with an increase reported in August. The condition index of mussels is affected by a variety of extrinsic and intrinsic factors, such as water temperature and salinity, food availability, and animal gametogenic cycle. Mussel survival

(SoS) during prolonged aerial exposure can be used as a simple physiological index of pollution (Viarengo et al. 1995). This study showed that mussels collected from both sites in May had a greater capacity for survival in air than those sampled in August. The SoS test is a physiological biomarker used to evaluate mussel resistance to air exposure (Eertman et al. 1993). Various studies have demonstrated that bivalves exposed to contaminants have reduced tolerance to anoxia (Viarengo et al. 1995). We found a similar level of resistance and a clear-cut monthly pattern at both sites. However, decreased resistance was revealed in August, in particular in mussels from site 1, confirming that this site is more extensively affected by chemical contaminants such as metals, PAHs, and PCBs, although reproductive cycles and variations in body reserves should also be taken into account. Lagoon mussels undergo a period of sexual inactivity in July and August (Banni et al. 2011), so that body reserves and, in particular, glycogen derived from food easily available in lagoon waters in this season (Bressan and Marin. 1985) can be used to better withstand stresses caused by air exposure. These factors may significantly reduce the responsiveness of the survival-in-air parameter.

The cytochrome P450 family, belonging to Phase I (functional reactions) and GST, involved in Phase II (conjugative reactions) of the biotransformation process, are the main enzymes used as biomarkers of organic pollutant detoxification (Regoli et al. 2002). Phase I and Phase II detoxification mechanisms were therefore investigated in our study by evaluating BPH and GST activity (Fig. 5). We reported a significant increase in BPH activity in animals sampled from site 1 in June and August versus animals from site 2. This increase in the Phase I biotransformation process hence correlated with increased Σ PAH bioaccumulation in June and August. Inhibited GST activity at both sites was higher in June and August in the site 1 comparatively to the BPH induction. In this case, the phases I and II seem to indicate the same metabolic effort of detoxification (Fig. 4).

MXR protein levels were significantly higher at site 1 than at site 2 throughout the study period. This could be explained by the contamination levels found in mussels from site 1 (Menzel Abdelrahmen) (Fig. 1). MXR prevents the bioaccumulation of toxic xenobiotics or endogenous metabolites by transporting them out of the cell (Minier and Moore. 1996). The increase in MXR protein levels in August can be explained by the increased water temperature. Indeed, abiotic factors such as temperature (Minier et al. 2000) and organic pollutants have been shown to affect MXR protein levels, as we observed in *M. galloprovincialis*. In this case, the phase III of detoxification is not correlated with the phases I and II.

Oxidative stress biomarkers in *M. galloprovincialis* showed spatial variability, with significant MDA accumulation in mussels from site 1 versus site 2 throughout the study period, whereas CAT activity was significantly higher in August only.

The activity of CAT—a primary enzyme in the antioxidant defense system and often one of the earliest antioxidant enzymes to be induced (Cappello et al. 2013)—was also investigated in this study. CAT values showed temporal fluctuations at both study sites. These biological responses may also be modulated by seasonal changes in both environmental and biological factors, potentially influencing responsiveness and sensitivity to pollutants (Dellali et al. 2001). Our results were in total agreement with the fluctuations in CAT activity according to temperature found in *M. galloprovincialis* mussels and *Ruditapes decussatus* clams in Bizerte lagoon (Dellali et al. 2001). Pellerin-Massicotte (1994, 1997) reported increased CAT antioxidant activity as being associated with increased lipid peroxidation at high temperatures in *Mytilus edulis* blue mussels. MDA levels are proportional to the extent of lipid peroxidation (Aust. 1985) and act as a marker for membrane lipid oxidation. Numerous studies have underlined MDA concentration as a major parameter for assessing oxidative stress in organisms (Rom o and Gnassia-Barelli. 1997). MDA levels in *M. galloprovincialis* sampled from site 1 were highest in August. This increase appears to be due to an increase in heavy metals, inducing lipid peroxidation (Avery et al. 1996). Wastewater from numerous sewers is discharged directly into the eastern sector of the lagoon; the city of Menzel Abdelrahmen may also be responsible for enriching site 1 with various pollutants (Mahmoud et al. 2010). In general, organisms with a reduced antioxidant status may be more prone to lipid peroxidation and therefore have higher MDA levels (Cossu et al. 2000).

From June onwards, AChE activity measured in the gills of mussels sampled at Baie des Carrières (site 2) was slightly higher than at the Menzel Abdelrahmen (site 1). Neurotoxic pesticides such as carbamates, organophosphates, and pyrethrins are known to exert an inhibitory effect on AChE activity (Bocquené et al. 1993; Binelli et al. 2005). Other classes of compounds, such as heavy metals (Lionetto et al. 2003), may influence the AChE activity of an organism by altering the pathway of enzyme synthesis, or simply by affecting the general health of the organism by reducing enzyme production. This suggests an extensive domestic use of potential pollutants such as pesticides in summer. Indeed, AChE activity is commonly used to diagnose pesticide exposure in environmental monitoring studies (Mora et al. 1999a, b; Davies et al. 2001), but can also be indirectly inhibited by other organic compounds.

MT measurements have been widely used to assess the effects of metal pollution in both laboratory (Viarengo et al. 1997) and field studies (Serafim and Bebianno. 2001). In this study, we reported a significant increase in MT levels in the digestive glands of mussels sampled from site 1 versus site 2. Temporal variations in MT levels at both sites were significantly correlated with water temperature, as previously shown by Sefarim et al. (2002).

The salinity could also influence the MT levels because the biological availability and toxicity of trace metals are determined by their chemical speciation which is dominated by organic complexation along a gradient of salinity in estuary (Money et al. 2011). The salinity variation (hypoosmotic stress) in the marine environment can affect a lot of biomarkers as MT, oxygen consumption rate, and survival in air (SoS test) in *M. galloprovincialis* (Hamer et al. 2008) (Fig. 5).

We observed a clearly significant spatial difference in the accumulation rate of MDA, MT, and MXR for all measured biomarkers during the study period, although the highest values were measured in mussels from the Menzel Abdelrahmen site. Moreover, mussels from this site appeared to be more vulnerable to and affected by the higher water temperatures in July and August. This could be explained by the combined effect of chemical contamination at this site and higher temperatures in summer.

The IBR constitutes a practical and robust tool for assessing sensitivity to contaminants using combined biomarker responses. The IBR can be used to reflect the biological effects of contamination measured at various sites, regardless of variations in the biomarker sets used for index calculations (Beliaef and Burgeot 2002; Serafim et al. 2012). In our study, application of the IBR allowed us to identify the most highly impacted site. The two sites studied in Bizerte lagoon (sites 1 and 2) showed marked temporal and spatial variations (Fig. 5). The IBR index showed biomarker responses to be higher in July and August at both sites. At site 1, all measured biomarkers were shown to be significant with regards to overall biochemical response. IBR elevation was particularly significant between June and July. When the temperature rose from 19 to 26  C, the IBR increased from 5 to 18 at site 1. These results highlighted Menzel Abdelrahmen (site 1) as being the most highly impacted site. Furthermore, correlation analysis showed a highly significant correlation between the IBR index and water temperature ($r = 0.661$; $r = 0.519$), respectively, at sites 1 and 2. The strong fluctuation of the biological response observed with the IBR index allowed us to characterize a maximal metabolic effort in August in the site 1 and a minimal metabolic effort in May in the site 2 (Fig. 6). In this study, both BAC and EAC thresholds were calculated according to the OSPAR approach (Davies and Vethaak 2012) for caged mussels collected from a lagoon (Tables 3 and 4). We calculated BAC based on the two study sites in Bizerte lagoon and our chemical data and biomarker results, considering Baie des Carrières (site 2) as the least contaminated site. EACs were calculated during the highest temperatures and highest metabolic response in August and at the most contaminated site 1 (Menzel A.). Only two thresholds (AChE and SoS) determined in Bizerte lagoon could be compared with the OSPAR thresholds for *M. galloprovincialis* mussels. The background response of acetylcholinesterase in *M. galloprovincialis* mussels in Bizerte lagoon derived from OSPAR 2012 data (study

Table 3 Assessment of a set of biomarkers in *M. galloprovincialis* caged mussels at the Bizerta Lagoon

Compound	Site 1 (Menzel Abdelrahmen)				Site 2 (Baie des Carrières)			
	May	June	July	August	May	June	July	August
Acenaphthylene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Acenaphthene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Naphthalene	0.1±0.01	0.15±0.04	0.15±0.02	0.16±0.03	<DL	0.06±0.01	0.07±0.01 ^a	0.08±0.01 ^a
Phenanthrene	0.11±0.01	0.12±0.01	0.17±0.04	0.14±0.03	<DL	0.08±0.01	0.07±0.01 ^a	0.06±0.01 ^a
Anthracene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Fluoranthene	0.19±0.03	0.22±0.04	0.25±0.04	0.2±0.04	0.18±0.05	0.17±0.02	0.16±0.02 ^a	0.11±0.02 ^a
Pyrene	0.22±0.04	0.21±0.05	0.2±0.04	0.21±0.04	0.15±0.04	0.15±0.03	0.15±0.02	0.1±0.01 ^a
Benzo(a)anthracene	0.25±0.04	0.24±0.04	0.19±0.04	0.28±0.06	0.19±0.04	0.14±0.03 ^a	0.15±0.03	0.12±0.02 ^a
Chrysene	0.11±0.02	0.15±0.02	0.14±0.02	0.16±0.02	<DL	<DL	<DL	<DL
Benzo(b)fluoranthene	0.14±0.01	0.19±0.03	0.17±0.03	0.19±0.04	<DL	<DL	<DL	<DL
Benzo(e)Pyrene	0.09±0.01	0.12±0.01	0.12±0.02	0.13±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01 ^a	0.08±0.01	0.09±0.01
Benzo(a)Pyrene	0.22±0.03	0.3±0.07	0.28±0.05	0.31±0.05	0.08±0.01 ^a	0.1±0.01 ^a	0.09±0.01 ^a	0.09±0.01 ^a
Benzo(g,h,i)Perylene	0.2±0.04	0.28±0.07	0.25±0.04	0.25±0.03	<DL	<DL	<DL	<DL
Dibenzo[a,h]anthracene	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
PCB-18	0.44±0.04	0.48±0.06	0.53±0.04	0.28±0.03	0.23±0.04 ^a	0.27±0.04 ^a	0.26±0.04	0.20±0.02
PCB-28+31	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
PCB-52	1.44±0.14	1.60±0.20	1.79±0.19	0.93±0.11	0.78±0.12 ^a	0.90±0.15 ^a	0.88±0.12 ^a	0.66±0.06 ^a
PCB-44	1.68±0.16	1.11±0.14	1.24±0.13	0.64±0.07	0.54±0.08 ^a	0.62±0.10 ^a	0.61±0.08 ^a	0.47±0.05 ^a
PCB-101	9.54±0.92	10.57±1.33	11.80±1.25	9.94±1.15	5.15±0.80 ^a	5.92±0.98 ^a	5.84±0.79 ^a	4.51±0.43 ^a
PCB-118	8.72±0.84	9.71±1.22	8.52±0.90	9.44±1.10	4.73±0.74 ^a	5.44±0.90 ^a	5.36±0.73 ^a	4.14±0.40 ^a
PCB-149	3.71±0.36	4.13±0.52	4.61±0.49	8.52±0.99	2.01±0.31 ^a	2.31±0.38 ^a	2.28±0.31 ^a	1.76±0.17 ^a
PCB-138	9.80±0.94	10.91±1.37	12.17±1.29	13.97±1.62	5.31±0.83 ^a	6.11±1.01 ^a	6.02±0.82 ^a	4.65±0.45 ^a
PCB-153	16.98±1.63	18.12±2.28	16.39±1.74	20.09±2.33	14.01±2.19	19.38±3.22	18.30±2.49	13.63±1.31 ^a
PCB-180	21.59±2.07	18.92±2.38	17.26±1.83	16.30±1.89	9.22±1.44 ^a	10.60±1.76 ^a	10.45±1.42 ^a	10.24±0.98 ^a
PCB-194	2.56±0.25	2.23±0.28	2.48±0.26	2.05±0.24	1.08±0.17 ^a	1.25±0.21	1.23±0.17 ^a	0.95±0.09 ^a
Cd	0.34±0.06	0.36±0.07	0.43±0.06	0.49±0.09	0.18±0.02 ^a	0.19±0.03 ^a	0.19±0.04 ^a	0.24±0.04 ^a
Cu	2.53±0.11	2.68±0.11	3.01±0.19	3.70±0.15	1.72±0.10 ^a	1.91±0.11 ^a	1.96±0.12 ^a	2.39±0.14 ^a
Zn	36.90±1.95	39.11±2.07	43.17±2.28	53.96±2.85	22.84±1.40 ^a	25.35±1.55 ^a	26.04±1.60 ^a	31.77±1.95 ^a
Ni	2.84±0.23	3.01±0.25	3.33±0.27	4.16±0.34	1.68±0.16 ^a	1.87±0.18 ^a	1.92±0.19 ^a	2.34±0.23 ^a

We cannot compare the EAC and BAC calculated in this study with those calculated for MT by Davies and Vetaack (2012) because of the two different methods of analysis

BAC Background assessment criteria, EAC Environmental assessment criteria

performed on *M. galloprovincialis* wild mussels in the Mediterranean Sea (Spain) in the same season (Campillo-Gonzalez, personal communication in 2012 I.E. report)). This difference (EAC OSPAR = 10 nmol min⁻¹ mg⁻¹proteins versus EAC Bizerte = 30 nmol min⁻¹ mg⁻¹proteins), seen between

two Mediterranean sites, highlights the need to adapt thresholds to different area typologies (i.e., lagoon in North Africa and open sea in Spain). The determination of EAC and BAC in Bizerte lagoon is a first step towards defining thresholds at two sites with different chemical contamination during sharp temperature rises in North Africa. A more exhaustive definition is needed to express metabolic response magnitude for a full physiological cycle.

Conclusion

This study revealed that increased water temperatures in summer, combined with the presence of organic and inorganic

Table 4 Values of Integrated Biomarker Response for a set of biomarkers measured in caged mussels from two sites (site 1 Menzel Abdelrahmen and site 2 Baie des Carrières) at the Bizerta lagoon during the summer

	IBR site 1	IBR site 2
May	5.80	2.13
June	5.54	3.22
July	17.94	8.57
August	19.63	9.67

contaminants, can directly influence the biological response of mussels. The combined increases of temperature and salinity exceptionally caused major variations in biomarkers at the most highly contaminated site (Menzel Abdelrahmen). The biomarkers found to be the most sensitive to the combined effects of chemical contamination and high temperatures were AChE inhibition, the induction of CAT activities and a large accumulation of MT, MDA, and MXR proteins. The highest metabolic response was confirmed in August, when differences in the IBR values of the least contaminated site 2 and the most contaminated site 1 were also highest. This preliminary study, conducted at a lagoon in northern Tunisia, allowed us to propose preliminary EAC and BAC over a specific period of high temperatures and high salinity, when metabolic response was at its most intense. Another more accurate and designated study to determine response thresholds in Bizerte lagoon mussels should be performed over the course of one or two complete physiological cycles. This approach demonstrated the value of choosing a sensitive period in the mussel life cycle to facilitate biomarker interpretation and biomonitoring in a North African lagoon.

Acknowledgements This study was backed by the Ministry of Scientific Research and Technology, University of Sousse, Tunisia (Research Unit of Biochemistry and Environmental Toxicology UR 04AGR05), and the French Institute of Tunisia. This study has been carried out in the framework of the Cluster of Excellence COTE.

References

- Akcha F, Izuel C, Venier P, Budzinski H, Burgeot T, Narbonne J-F (2000) Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 49:269–287
- Allan IJ, Vrana B, Greenwood R, Mills GA, Roig B, Gonzalez C (2006) A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive. *Talanta* 69: 302–322
- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Berthet B, Métayer C (1987) Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *J Exp Mar Biol Ecol* 106:73–89
- Amri Z, Turki S, Trabelsi E, Ben Maiz N (2010) First recorded proliferation of *Coolia monotis* (Meunier, 1919) in the North Lake of Tunis (Tunisia) correlation with environmental factors. *Environ Monitor Assess* 164:423–433
- ANPE (1990) Diagnostic préliminaire pour l’Etude de l’Equilibre Ecologique du lac de Bizerte. GIC-NNEA-TECI, ANPE, Tunisie
- Aust SD (1985) Lipid oxidation. In: Greenwald RA (Ed) *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press Boca Raton FL pp 203–207
- Avery EL, Dunstan RH, Nell JA (1996) The detection of pollutant impact in marine environments: condition index, oxidative DNA damage, and their associations with metal bioaccumulation in the Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis*. *Arch Environ Contam Toxicol* 31:192–198
- Banni M, Negri A, Dagnino A, Jebali J, Ameur S, Boussetta H (2010) Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:842–848
- Banni M, Negri A, Mignone F, Boussetta H, Viarengo A, Dondero F (2011) Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle. *PLoS One* 6(5): e18904
- Baumard P, Budzinski H (1997) Internal standard qualification method and gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS): a reliable tool for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) quantification in natural matrices. *Analyst* 25:246–252
- Bebiano MJ, Langston WJ (1992) Cadmium induction of metallothionein = synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Pharmacol Toxicol* 103(1):79–85
- Beji O (2000) Les ressources vivantes exportables du lac de Bizerte: Etat actuel et potentialités (première partie). *Bull Inst Nat Sci Technol Mer Salammbô* 27:45–60
- Beliaeff B, Burgeot T (2002) Integrated biomarker response (IBR): a useful graphical tool for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 21:1316–1322
- Ben Ameur W, BenHassine S, Eljarrat E, ElMegdiche Y, Trabelsi S, Hammami B, Barcelo D, Driss MR (2011) Polybrominated diphenyl ethers and their methoxylated analogs in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from Bizerte lagoon, Tunisia. *Mar Environ Res* 72:258–264
- Ben Ameur W, Lapuente J, El Megdiche Y, Barhoumi B, Trabelsi S, Camps L, Serret J, Ramos-López D, Gonzalez-Linares J, Driss M, Borrás M (2012) Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte lagoon (Tunisia). *Mar Pollut Bull* 64:241–251
- Ben Garali A, Ouakad M, Gueddari M (2010) Contamination of superficial sediments by heavy metals and iron in the Bizerte lagoon, northern Tunisia. *Arab J Geosci* 3:295–306
- Binelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A (2005) Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in zebra mussels from the Italian Great Lakes. *Chemosphere* 61:1074–1082
- Bocquené G, Galgani F, Burgeot T, Le Déan L, Truquet P (1993) Acetylcholinesterase levels in marine organism along French coasts. *Mar Pollut Bull* 26:101–106
- Bodin N, Burgeot T, Stanisière JY, Bocquené G, Menard D, Minier C, Boutet I, Amat A, Cherel Y, Budzinski H (2004) Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comp Biochem Physiol C* 138:411–427
- Bolognesi C, Frenzilli G, Lasagna C, Perrone E, Roggeri P (2004) Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. *Mutat Res* 552:153–162
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Bressan M, Marin MG (1985) Seasonal variations in biochemical composition and condition index of cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Lagoon of Venice (North Adriatic). *Aquaculture* 48:13–21
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302–310
- Burgeot T, Faucet J, Ménard D, Grosjean P, Bocquené G (2006). Variations of benzo(a)pyrene hydroxylase and cholinesterase activities in mussels caged in the North Sea (German Bight and Statfjord). Special Issue. *Environ Toxicol Chem* pp 171–185
- Cappello T, Maisano M, D’Agata A, Natalotto A, Mauceri A, Fasulo S (2013) Effects of environmental pollution in caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Mar Environ Res* In press
- Charissou AM, Cossu-Leguille C, Vasseur P (2004) Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-

- oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Sci Total Environ 322:109–122
- Cheikh M, Derouiche A, Driss MR (2002) Détermination par (CPG-ECD) des résidus de pesticides organochlorés dans les sédiments de la lagune de Bizerte. Bull Inst Nat Sci Technol Mer 7:160–163
- Cheung CC, Zheng GJ, Li AM, Richardson BJ, Lam PK (2001) Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. Aquat Toxicol 52:189–203
- Clairborne A (1985) Catalase activity. Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press Boca Raton pp 283–284
- Cossu C, Doyotte A, Babut M, Exinger A, Vasseur P (2000) Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. Ecotoxicol Environ Saf 45:106–121
- Davies IM, Vethaak D (2012) Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES/OSPAR Coop Res Rep 315
- Davies IM, Rodger G, Redshaw J, Stagg RM (2001) Targeted environmental monitoring for the effects of medicines used to treat sea-lice infestation on farmed fish. ICES J Mar Sci 52:447–485
- Dellali M, Roméo M, Aissa P (2001) Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. Ocean Acta 24:1–9
- Depledge MH (2009) Novel approaches and technologies in pollution assessment and monitoring: A UK perspective. Ocean Coast Manag 52:336–341
- Derouiche A, Sanda YG, Driss MR (2004) Polychlorinated biphenyls in sediments from Bizerte lagoon, Tunisia. Bull Environ Contam Toxicol 73:810–817
- Devin S, Burgeot T, Giambérini L, Minguez L, and Pain-Devin S (2013) The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. Environ Sc Pollu Res. In press
- Domouhtsidou GP, Dimitriadis VK (2001) Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. Environ Pollut 115:123–137
- Eertman RHM, Wagenvoort AJ, Hummel H, Smaal AC (1993) Survival in air of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress. J Exp Mar Biol Ecol 170: 179–195
- Ellman GL, Courtney KO, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 7:88–95
- Fisher W, Schneider M, Bauchot ML (1987) Fiches FAO d'identification des especes pour les besoins de la peche: Mediterranee et Mer Noire. Vol. I, Végétaux et invertébrés. FAO, Rome
- Galloway TS, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Jones MB, Depledge MH (2004) A multibiomarker approach to environmental assessment. Environ Sc Technol 38:1723–1731
- Gomiero A, Da Ros L, Nasci C, Meneghetti F, Spagnolo A, Fabi G (2011) Integrated use of biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis* for assessing off-shore gas platforms in the Adriatic Sea: results of a two year biomonitoring program. Mar Pollut Bul 62:2483–2495
- Guo L, Qiu Y, Zhang G, Zheng GJ, Lam PK, Li X (2008) Levels and bioaccumulation of organochlorine pesticides (OCPs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fishes from the Pearl River estuary and Daya Bay, South China. Environ Pollut 152:604–611
- Habig W, Pabst M, Jakoby W (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 249: 7130–7139
- Hamer B, Jak Z, Hamer DP, Peri P, Medakovi D, Ivankovi D, Pavi P, Zilberberg C, Schroderd H, Mullerd WEG, Smodlaka N, Batel R (2008) Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. Aquat Toxicol 89:137–151
- ICES (2010) Report of the working group on biological effects of contaminants (WGBC), 11–15 January, 2010, Dublin, Ireland. ICES Document CM2011/SSGHIE:04
- Jarry V, Fiala M, Frisoni GF, Jacques G, Neveux J, Panouse M (1990) The spatial distribution of phytoplankton in a Mediterranean lagoon (Étang de Thau). Oceanol Acta 13:503–512
- Kamel N, Attig H, Dagnino D, Boussetta H, Banni M (2012) Increased Temperatures affect oxidative stress markers and detoxification response to benzo[a]pyrene exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. Arch Environ Contam Toxicol. doi:10.1007/s00244-012-9790-3
- Khessiba A, Hoarau P, Gnassia-Barelli M, Aissa P, Roméo M (2001) Biochemical response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Bizerta (Tunisia) to chemical pollutant exposure. Arch Environ Contam Toxicol 40:222–229
- Khessiba A, Roméo M, Aissa P (2005) Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to lindane. Environ Pollut 133:275–281
- Leiniö S, Lehtonen K (2005) Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. Comp Biochem Physiol C 140:408–421
- Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Pascariello MF, Marinosci L, Schettino T (2003) Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzyme activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. Mar Pollut Bull 46:324–330
- Livingstone DR (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar Pollut Bull 42:656–666
- Lucas A, Beninger PG (1985) The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. Aquaculture 44:187–200
- Mahmoud N, Dellali M, El Bour M, Aissa P, Mahmoudi E (2010) The use of *Fulvia fragilis* (Mollusca: Cardidae) in the biomonitoring of Bizerta lagoon: a mutimarkers approach. Ecol Indic 10:696–702
- McFadden I, Eufemia N, Heath C, Epel D, Moore M, Lowe D (2000) Multidrug resistance in the embryos and larvae of the mussel *Mytilus edulis*. Mar Environ Res 50:1–5
- Michel X, Salaün JP, Galgani F, Narbonne JF (1994) Benzo(a)pyrene hydroxylase activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: a potential marker of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbon type compounds. Mar Environ Res 38:257–273
- Minier C, Moore MN (1996) Induction of multixenobiotic resistance in mussel blood cells. Mar Environ Res 42:389–392
- Minier C, Borghi V, Moore MN, Porte C (2000) Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquat Toxicol 50:167–176
- Money C, Braungardt C, Jha A, Worsfold P, Achterberg E (2011) Metal speciation and toxicity of Tamar Estuary water to larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Mar Environ Res 72:3–12
- Moore MN, Icarus Allen J, McVeigh A (2006) Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. Mar Environ Res 61: 278–304
- Moore MN, Viarengo A, Donkin P, Hawkins JSA (2007) Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. Aquat Toxicol 84:80–91
- Mora P, Fournier D, Narbonne JF (1999a) Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* LmK. and *Mytilus edulis* from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Muller. Comp Biochem Physiol C122:353–361
- Mora P, Michel X, Narbonne JF (1999b) Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. Environ Toxicol Pharmacol 7: 253–260
- Orban E, Di Lena G, Navigato T, Casini I, Marzetti A, Caproni R (2002) Seasonal changes in meat content, condition index and chemical

- composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. Food Chem 77:57–65
- Pan L, Ren J, Zheng D (2009) Effects of benzo(a)pyrene exposure on the antioxidant enzyme activity of scallop *Chlamys farreri*. Chin J Oceanol Limnol 27:43–53
- Pellerin-Massicotte J (1994) Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. J Aquat Ecosyst Heal 3:101–111
- Pellerin-Massicotte J (1997) Influence of elevated temperature and exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). J Rech Oceanogr 22:91–98
- Pfeifer S, Schiedek D, Dippner JW (2005) Effect of temperature and salinity on acetyl-cholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. J Exp Mar Biol Ecol 320:93–103
- Regoli F (1992) Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. Mar Ecol Prog Ser 84:63–69
- Regoli F, Pellegrini D, Winston GW, Gorbi S, Giuliani S, Vimo-Lamberti C, Bompadre S (2002) Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). Mar Pollut Bull 44:912–922
- Roméo M, Gnassia-Barelli M (1997) Effects of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus*. Comp Biochem Physiol 118:33–37
- Rougier C, Poumriot R, Lam-hoi T (2000) The genus *Synchaeta* in a north western Mediterranean coastal lagoon (Étang de Thau, France): taxonomical and ecological remarks. Hydrobiology 436:105–117
- Serafim MA, Bebianno MJ (2001) Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: sex and seasonal effects. Environ Toxicol Chem 20:544–552
- Serafim MA, Company RM, Bebianno MJ, Langston WJ (2002) Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. Mar Environ Res 54:361–365
- Serafim A, Company R, Lopes B, Fonseca VF, Franc S, Vasconcelos RP, Bebianno MJ, Cabra HN (2012) Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems. Ecol Indic 19:215–225
- Smital T, Sauerborn R, Pivcevic B, Krca S, Kurelec B (2000) Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. Comp Biochem Physiol C 126:175–186
- Snyder MJ (2000) Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrate: recent advances and future directions. Aquat Toxicol 48:529–547
- Sokolova IM (2004) Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). J Exp Biol 207:2639–2648
- Sureda A, Box A, Tejada S, Blanco A, Caixach J, Deudero S (2011) Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain). Aquat Toxicol 101:540–549
- Thain JE, Vethaak AD, Hylland K (2008) Contaminants in marine ecosystems: developing an integrated indicator framework using biological-effect techniques. ICES J Mar Sci 65:1508–1514
- Trabelsi S, Driss MR (2005) Polycyclic aromatic hydrocarbons in superficial coastal sediments from Bizerte lagoon, Tunisia. Mar Pollut Bull 50:344–348
- UNEP (1999) Manual of recommended biological techniques. Mediterranean action plan. Meeting of experts to review the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP (OCA) / MED WG.132/6, United Nations Environment Programme, Athens, Greece
- Viarengo A, Nott J (1993) Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comp Biochem Physiol C 104:355–372
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Marcinelli G, Accomando R, Smaal AC, Orunesu M (1995) Stress on stress response: a simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. Mar Environ Res 39:245–248
- Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbri R (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. Mar Environ Res 44:69–84
- 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. Comp Biochem Physiol C 146:281–300
- Waldmann P, Pivcevic B, Mueller WEG, Zahn RK, Kurelec B (1995) Increased genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the fresh water clam *Corbicula fluminea*. Mutat Res 342:113–123
- Zhang Z, Li X, Vandepuer M, Zhao W (2006) Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture 256:502–509

Discussion Générale

La lagune de Bizerte est un écosystème marin avec une richesse écologique et halieutique prépondérantes. Mais, la forte anthropisation urbaine et industrielle sur ses bords, combinée à la perspective d'une élévation progressive de la température constituent une éventuelle menace écologique qui demandera un effort d'adaptation des populations d'organismes. En effet, même si il est difficilement quantifiable en Afrique du Nord du fait d'un réseau d'observatoire incomplet, il est probable que l'élévation de température de 2°C et que la baisse des précipitations de 20% observées depuis 1970 dans le sud-ouest de l'Europe soit aussi importantes voir même amplifiées en Afrique du Nord (PAM, 2009). En 2003, le programme MEDPOL a lancé dans la cadre de la mise en œuvre du plan d'action stratégique sur les sources de pollution d'origine tellurique en Méditerranée, une approche de quantification des polluants chimiques d'origines industrielles et domestiques pouvant affecter l'écosystème marin de Méditerranée. Ainsi la mise en place d'un programme de surveillance des contaminants chimiques et de leurs effets biologiques sur la moule *Mytilus galloprovincialis* dans la lagune de Bizerte en s'appuyant sur des recommandations OSPAR et MEDPOL constitue l'enjeu majeur qui est à l'origine de cette thèse. L'objectif général est de développer des outils d'évaluation de la qualité de l'écosystème qui sont actuellement quasi absents ou peu développés. Cette évaluation est établie sur le déploiement des indicateurs précoces « biomarqueurs » et la détermination de l'impact des mélanges complexes de polluants sur les composantes biotiques et abiotiques de la lagune.

La première question concerne donc la connaissance des variations d'une batterie de biomarqueurs permettant d'évaluer les effets biologiques précoces sur des moules de la lagune de Bizerte. La méthodologie adoptée d'une démarche intégrée chimie et biologie avait pour premier objectif d'évaluer les variations saisonnières de biomarqueurs pour les interpréter en lien avec les variations des paramètres physico-chimiques, des marqueurs physiologiques et des concentrations de contaminants (HAPs, PCBs et métaux) bioaccumulés chez des moules issues d'une même cohorte dans la lagune de Bizerte. Une étude expérimentale d'exposition au B[a]P suivant un gradient de température a été menée pour acquérir les compétences analytiques de biomarqueurs et pour déterminer les biomarqueurs pertinents permettant de caractériser les effets combinés de la température et du B[a]P. Ensuite une étude de terrain menée dans la lagune de Bizerte a permis de valider la pertinence des biomarqueurs pour une évaluation des effets biologiques des contaminants dans une lagune Méditerranéenne.

Le second objectif était de décliner les informations obtenues sur les variations saisonnières de biomarqueurs pendant un cycle physiologique de deux ans pour déterminer les

seuils de base et seuils d'effets des biomarqueurs étudiés afin de standardiser l'interprétation des biomarqueurs dans un programme de surveillance en Tunisie.

A l'issue d'une étude expérimentale menée sur des moules de Bizerte en condition contrôlée nous avons démontré les variations de six biomarqueurs (BPH, GST, CAT, MDA, MN et AChE) de moules exposées à une dose subléthale de B[a]P de 19 µg/l suivant un gradient de température variant de 18 à 26°C pendant 7 jours. Les résultats révèlent une forte corrélation entre la réponse des biomarqueurs et les variations de la température chez les moules exposées uniquement à un gradient de température. L'exposition des moules au B[a]P dans des conditions thermiques croissantes a permis de caractériser la différence des profils de bioaccumulation et la sensibilité des mécanismes de métabolisation de phase I (Benzo(a)pyrène hydroxylase) et de phase II (glutathion-S-transférase), de la génotoxicité (MN), et du stress oxydatif (CAT et MDA). On a constaté que l'augmentation de la température à 24 et 26°C s'accompagne d'une plus grande bioaccumulation du B[a]P chez la moule. L'activité BPH plus active pour les températures inférieures de 18 à 22°C semble confirmer une plus grande activité métabolique pour les températures inférieures à 24°C.

Les températures supérieures à 24°C favoriseraient donc une plus forte bioaccumulation de B[a]P. Ce résultat est intéressant car il est connu que c'est en hiver que la bioaccumulation des contaminants est plus élevée à cause des apports de contamination qui augmente et parce que les bivalves accumulent de manière combinée leur réserve de glycogène et certains contaminants comme les lipophiles. Le métabolisme de phase II caractérisé par une inhibition de l'activité GST à 26°C démontre une plus grande sensibilité aux températures élevées supérieures à 24°C, ce qui est pertinent dans la lagune de Bizerte où les températures montent à 30°C en été. Les cassures chromosomiques caractérisées par la mesure des micronoyaux démontrent comme la BPH et la GST une forte sensibilité à l'élévation de température doublant ainsi le nombre de micronoyaux entre 18° et 26°C. Le stress oxydatif caractérisé par la mesure de CAT illustre une induction progressive jusqu'à 22°C puis une chute de l'activité pour les températures supérieures ou égales à 24°C, signifiant ainsi une perturbation significative et probablement le dépassement de la capacité de régulation au-delà de 22°C. Les profils des MDA et de l'AChE montrent une élévation progressive suivant le gradient de température caractérisant ainsi une moindre sensibilité de régulation que la catalase aux températures supérieures à 22°C.

L'approche terrain menée pendant deux ans de manière continue dans le cadre de ma thèse avait pour objectif d'intégrer l'influence combinée de la température et d'un cocktail de

contaminants à des concentrations environnementales sur un habitat naturel lui-même influencé par des variations naturels des facteurs physico-chimiques.

L'étude des paramètres physico-chimiques des eaux correspond à l'évaluation de la température des eaux, des teneurs en salinité et en oxygène dissous. Ils évoluent constamment en fonction des conditions météorologiques et de la saisonnalité. Les variations mensuelles de la température des eaux de la lagune de Bizerte montre une différence de 20°C entre le mois le plus froid et le mois le plus chaud. Elle est directement liée à la température de l'air, à l'ensoleillement et aux vents. Le pH moyen annuel est de 8,2 des eaux de surface de la lagune de Bizerte montre que ces eaux de surface sont basiques sur une grande période de l'année. La salinité de la lagune de Bizerte varie entre 27,8 et 36,9 psu. D'une manière générale la salinité dépend du bilan hydrique, c'est-à-dire des échanges avec la mer, des apports d'eau douce et des pertes par évaporation. En effet, plusieurs travaux ont montré que les apports en eau de la lagune de Bizerte sont en fonction de la pluviométrie et du coefficient de ruissellement du bassin versant du lac Ichkeul (Kallel 1989 ; Ben Garali et al., 2009).

L'observation des paramètres physiologiques (les indices de condition et gonadosomatique) des moules pendant deux ans sur les deux sites d'étude a montré une forte composante saisonnière et une variabilité intersites. Sur les deux sites on constate deux périodes de pontes consécutives, la première a eu lieu en automne (octobre 2011) et le deuxième est hivernal (février 2012). Ces différentes étapes du cycle biologique de la moule sont observables sur les deux sites de Menzel Abdelrahmen et de la baie des carrières, avec des intensités différentes mais qui reste toute même synchrones dans le temps. Les variations de l'IC chez les mollusques bivalves constituent des indicateurs intégrés des conditions physiologiques de ces organismes, reflétant les effets de la pollution et de la qualité de l'environnement auxquels ils exposés tout au long de leur développement (Sukhoti et Maximovitch, 1994 ; Dame, 1996 ; Orban et al., 2001). Le suivi des variations des indices de condition et gonadique nous a permis d'évaluer l'état de santé des moules provenant de deux sites d'étude. Nous avons remarqué que la valeur moyenne de l'IC des moules du site 2 de la baie des carrières est plus élevée par rapport à celui des moules du site 1 de Menzel Abdelrahmen. Ces résultats liés montrent que la croissance des moules du site 2 de la baie des carrières est plus importante que celle de moules du site 2 de Menzel Abdelrahmen. De nombreuses études ont montré que la croissance des moules pouvait dépendre de divers facteurs abiotiques et biotiques tels que la composition du substrat, les conditions hydrodynamiques, les caractéristiques physico-chimiques de l'habitat, ainsi que la concentration en nourriture (Kleemann, 1973 ; Devescovi, 2009). En considérant,

l'emplacement géographique du site 2, cette forte croissance observée chez les moules du site 2 de la baie des carrières pourrait être liée à la richesse de ce site en matière organique. En effet, le bilan annuel des échanges d'eau entre la lagune de Bizerte et le milieu marin est accompagné d'un transfert de quantité importante de matières en suspension et de nutriments (Ben Garali et al., 2009). De plus, il a été démontré que la croissance des mollusques filtreurs peut être corrélée à la disponibilité en nourriture, exprimée en quantité de matières organiques particulières (Dame, 1996 ; Bayne, 1998 ; Sara et Pusceda, 2008).

Par ailleurs, bien que la variabilité de l'IC soit généralement attribuée à des changements dans la disponibilité en nourriture ou du cycle de gamétogenèse (Hummel et al., 1996 ; Pampanin et al., 2005), elle peut aussi être associée à des épisodes de stress chimiques qui impliquent une perte de poids des tissus des organismes, liée à une mobilisation des réserves énergétiques pour leur détoxification (Bayne, 1985 ; Modassir et Ansari, 2000). L'évolution dans le temps de l'indice gonado-somatique (IGS), qui est le rapport entre l'état des gonades et le poids corporel, nous a permis de mesurer l'effort de reproduction et de situer les périodes de ponte. La reproduction, le développement et la croissance des bivalves dépendent de l'intensité de stockage des matières de réserves, qui varient saisonnièrement pour des raisons principalement physiologiques (Cossa et al., 1990 ; Okumus et Stirling, 1998).

Ces changements physiologiques et comportementaux chez la moule peuvent influencer sa capacité de bioaccumulation des polluants tels que les métaux lourds, les HAPs et les PCBs. En effet, les fluctuations saisonnières des teneurs métalliques chez les moules pourraient être la conséquence liées à la fois à certains facteurs biologiques tels que le cycle de la reproduction, le métabolisme, le développement et l'âge (Kamaruzzaman et al., 2011) ainsi qu'à certains facteurs environnementaux tels que la température, la salinité et les éléments nutritifs (Sara et Pesceddu, 2008). Dans ce contexte, nous avons choisi d'établir un suivi des variations saisonnières de la bioaccumulation métallique (Cd, Cu, Zn et Ni), des HAPs et des PCBs chez *M.galloprovincialis* provenant des deux sites d'étude. Les niveaux de bioaccumulation des polluants ont été mesurés dans la glande digestive des moules et étaient plus élevés au niveau du site 1 qu'au niveau du site 2. En effet, les moules prélevées sur la station de Menzel Abdelrahmen (Site 1) accumulent trois fois plus de HAPs que les moules de la baie des carrières et deux fois plus de PCBs. Ainsi, la variation intersites de la réponse des biomarqueurs mesurés pourraient expliquer la différence entre les niveaux de bioaccumulation des contaminants organiques et des métaux traces. Les résultats de la variation des biomarqueurs mesurés montrent une variabilité saisonnière et intersites. Les biomarqueurs sur deux sites de

contamination différente permettent de comparer les amplitudes de réponses biologiques entre un site faiblement contaminé et un site fortement contaminé dans le but de discriminer l'effet polluant des autres facteurs environnementaux.

D'une manière générale, les études basées sur l'utilisation d'une batterie de biomarqueurs génèrent une importante quantité de données qui sont parfois difficiles à intégrer pour une bonne interprétation. Le recours à des indices permettant une intégration cohérente de ces données permet d'exploiter ces dernières dans un objectif de gestion de l'environnement (Beliaeff et Burgeot, 2002 ; Devin et al., 2013). Dans ce travail l'application de l'IBR nous a permis d'évaluer d'une manière globale la variation saisonnière de l'ensemble des biomarqueurs mesurés chez *M.galloprovincialis* et de classer les deux sites d'étude en se basant en premier lieu sur les valeurs de l'IBR obtenues pendant deux cycles annuels et en deuxième lieu sur le niveau des polluants chimiques bioaccumulés dans la glande digestive des moules. Globalement la variation saisonnière de l'IBR semble être synchrone entre les deux sites d'études. Toutefois, les moules du site Menzel Abdelrahmen s'avèrent être plus affectées par la variation des facteurs environnementaux notamment par l'élévation de la température en été et baisse de la salinité en hiver associée aux apports d'eau douce chargée en contaminants chimiques (Ben Garali et al., 2009).

Le second objectif qui visait à proposer pour la première fois des seuils de base et des seuils d'effets sur des biomarqueurs mesurés chez la moule *M. galloprovincialis*. La détermination des critères d'évaluation (niveau de base BAC et le seuil d'effet EAC) pour cinq biomarqueurs qui ont été mesurés pendant 24 mois chez des moules de la lagune de Bizerte nous a permis de représenter les niveaux de réponse pour lesquels on ne prévoit pas des effets délétères et ceux pour lesquels des effets sont prévisibles. Cette approche est aujourd'hui proposée de manière similaire aux seuils de contamination chimique pour une interprétation standardisée de la contamination chimique et des effets biologiques. C'est un enjeu européen de mise en œuvre de la DCSMM qui peut constituer un soutien pour le développement sur l'ensemble du bassin méditerranéen. Il importe de noter que les processus utilisés pour le calcul des BAC et des EAC ont été appliqués avec cohérence à toutes les analyses chimiques qui nous ont permis d'identifier le site Menzel Abdelrahmen comme le site le plus pollué et le site de la baie des carrières comme un site moins pollué.

Cette approche n'est qu'une première étape vers la définition de seuils qui devront être confirmés suivant une étude menée suivant une large échelle géographique à l'ensemble du bassin méditerranéen en tenant compte des typologies spécifiques des différentes zones côtières

comme les lagunes, les baies fermées ou les zones littorales ouvertes, la nature des fonds, le profil hydrologique et la proximité de sources de contamination chimiques.

Conclusion & Perspectives

Ce sujet de thèse entre dans le cadre général des recommandations de mise en œuvre par la convention de Barcelone d'un programme de surveillance en lien avec la directive européenne DCSMM. Il répond à l'objectif de développement d'indicateurs biologiques et chimiques pour la surveillance des contaminants chimiques dans un contexte méditerranéen impacté par un changement climatique qui amplifiera les pressions déjà existantes des activités humaines sur l'environnement naturel (modification du cycle de l'eau et de la biodiversité, augmentation de vague de chaleur et accélération de la désertification). Dans l'écosystème marin la dégradation des zones côtières et marines issues de sources de pollutions ponctuelles et diffuses telles que les rejets domestiques, agricoles et industriels, comme par exemple les eaux usées, les décharges sauvages, le ruissellement de contaminants chimiques et les apports atmosphériques constituent une menace.

Le sujet de thèse avait pour premier objectif d'évaluer les variations saisonnières de biomarqueurs combinées à celles d'indicateurs physico-chimiques, de marqueurs physiologiques et de contaminants chimiques suivant un cycle de deux ans pour déterminer et comparer les amplitudes de réponse de chaque paramètre ainsi que les périodes temporelles sensibles. Le facteur température était considéré comme un facteur abiotique déterminant du changement climatique et susceptible d'influencer significativement l'effort d'adaptation métabolique des moules.

L'étude des variations saisonnières menées dans la lagune de Bizerte permet de confirmer la sensibilité des biomarqueurs étudiés en laboratoire mais aussi de définir les profils temporels dans un habitat naturel. L'approche terrain considère l'influence combinée de la température et d'un cocktail de contaminants à des concentrations environnementales. L'étude intégrée des paramètres physico-chimiques, des marqueurs physiologiques (IC et IGS), des biomarqueurs sur deux sites de contamination différente permet de comparer les amplitudes de réponses biologiques entre un site faiblement contaminé et un site fortement contaminé dans le but de discriminer l'effet polluant des autres facteurs environnementaux. Bien que persistent de nombreuses incertitudes liées au terrain, les profils de réponse biologique intégrés de l'IBR obtenus suivant des contaminations variant d'un facteur 3 pour les HAP à 2 pour les PCB et 1.5 pour les métaux, pendant un cycle physiologique, permettent de souligner l'influence des effets de la température combinés aux effets des polluants en été (juillet 2011, Figure 40). Les valeurs maximales d'IBR sont ainsi 2,5 fois plus élevées sur le site 1 le plus pollué de Menzel Abdelrahmen en été. Cependant des valeurs de l'indice IBR également élevées en mars 2012 sur le site 1 semblent en lien avec l'augmentation des apports d'eau douce dans la lagune en

hiver. Les résultats obtenus montrent d'une part, que les biomarqueurs étudiés en laboratoire sont pertinents pour caractériser un profil d'adaptation métabolique chez la moule de la lagune de Bizerte. D'autre part, ils montrent que la température est un facteur pertinent en été car elle provoque une augmentation des effets biologiques mesurés. Cependant les apports d'eau douce chargée de contaminants et la baisse de salinité qui s'accompagne sont également des facteurs pertinents qui influencent les effets biologiques en hiver sur les sites les plus contaminés.

Le deuxième objectif de ce travail contribue à un besoin de détermination de seuils d'exposition et d'effets pour la standardisation de réponse des biomarqueurs chez *Mytilus galloprovincialis* en Méditerranée. Il n'existe pas encore de seuils déterminés pour la DCSMM dans les lagunes du bassin méditerranéen et seule une première approche a été développée en Espagne sur deux stations des côtes d'Andalousie sur certains biomarqueurs (Davies et Veetack, 2012). L'étude des variations saisonnières sur un cycle de deux ans apparaît la méthodologie la plus pertinente à développer sur différents sites. Elle a permis ainsi de proposer des amplitudes maximales sur le site pollué de Menzel a. qui peuvent -être interprétées comme un seuil d'effet. Les réponses les plus faibles de chaque biomarqueur déterminées sur le site le moins contaminé de la baie des Carrières permet de proposer un seuil de base illustrant une régulation métabolique normale. Cette approche ne constitue qu'une étape vers la détermination de seuils spécifiques des différents habitats en méditerranée. Il devra être confronté et conforter par des études menées chez la moule suivant la même méthodologie sur d'autres stations marquées par des typologies spécifiques et des niveaux de contaminations variés. Ce travail a été entrepris en atlantique Nord-est et il doit-être mené en méditerranée pour répondre aux exigences de la DCSMM. Pour ce faire la stratégie marine de l'union européenne fournit un cadre pouvant favoriser un renforcement de la coopération entre les pays de la méditerranée du nord et du sud. Parmi les développements utiles à l'interprétation des biomarqueurs comme outils de surveillance, une autre perspective intéressante qui n'a pu être menée dans ce travail, serait la comparaison des indices composites intégrateurs de l'IBR construit en atlantique et aujourd'hui le plus étudiés en Europe et l'indice du syndrome de stress (Viarengo et al., 2007) construit en méditerranée et proposé dans le cadre du MEDPOL.

Enfin, l'écosystème lagunaire est un milieu complexe dans lequel les effets de facteurs biotiques et abiotiques sur la chaîne trophique se superposent. A cause de cette complexité, l'interprétation des résultats sur les effets biologiques demande de prendre en compte des études complémentaires sur des sites variés. La détermination de seuils d'interprétation constitue ainsi un enjeu majeur pour une interprétation standardisée des données chimiques et biologiques en

surveillance de l'ensemble du bassin méditerranée. L'utilisation de la moule comme organisme sentinelle est probablement une des approches la plus simple et la moins coûteuse dans sa mise en œuvre, ce qui constitue un critère important pour la surveillance en méditerranée. L'intégration de la méthodologie OSPAR pour des moules de méditerranée constitue une démarche pertinente qui a été éprouvée en Atlantique. Elle permet également de tester la faisabilité et la pertinence de biomarqueurs supplémentaires à ceux proposés par le programme de surveillance MEDPOL. Enfin, L'ensemble de ces recherches devrait permettre d'élargir la batterie des biomarqueurs notamment les biomarqueurs de reprotoxicité et d'histopathologie de manière à caractériser plus finement la gamétogenèse des moules sur différents sites dans la perspective d'une meilleure évaluation de la qualité écologique des habitats.

Par ailleurs, en matière de perspective d'une surveillance intégrant chimie et biologie, il serait intéressant d'élargir les trois familles de contaminants persistants classiquement mesurées (PCB, PAH, métaux) par l'analyse de contaminants émergents de type pharmaceutiques, pesticides, nanoparticules, retardateurs de flammes, micro plastiques dans l'objectif d'évaluer leur niveau de concentration et d'affiner la réponse biologiques qui pour le moment est interprétée en référence à une contamination globale à partir de seulement trois familles chimiques.

Références bibliographiques

A

Abel et al, 1998, Abel D., Grobpietsch H., Portner H., Temporal fluctuations and spatial gradients of environmental pO₂, H₂O₂, and H₂S in its intertidal habitat trigger enzymatic antioxidant protection in the capitellid worm, *Heteromastus filiformis*, Mar. Ecol. Prog. Ser. 15, 1998, 179 - 191

Aissa, 1991, Aissa P., Écologie des nématodes libres de la lagune de Bizerte. Dynamique et biocoénose, 1991, Thèse de doctorat d'État. Faculté des sciences, Tunis

Akcha F, Izuel C, Venier P, Budzinski H, Burgeot T, Narbonne J-F (2000) Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Aquat Toxicol 49:269–287

Akcha F, Leday G, Pfohl-Leszkowicz A (2003) Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 534 (1-2) ; 21-32

Allan IJ, Vrana B, Greenwood R, Mills GA, Roig B, Gonzalez C (2006) A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive. Talanta 69:302–322

Allen, J.I. & Moore, M.N. (2004) Environmental prognostics : Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk assessment? Marine Environmental Research, 58, 227-232

Alzieu C, Abamou A, Bassoullet P, Boutier B (1999) Dragage et environnement marin : état des connaissances. Plouzane : Edition Ifremer, 223p

Amiard J.C, Caquet T, Lagadic L (1998) Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement.

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. Aquat. Toxicol. 76, 160–202.

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B., and Métayer, C. 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, Vol. 106, pp. 73-89.

Amiard, J.-C., Bacheley, H., Barill'è, A.-L., Barill'è, L., Geffard, A., Himery, N., 2004. Temporal changes in nickel and vanadium concentrations and in condition index and metallothionein levels in three species of molluscs following the Erika oil spill. Aquat. Living Resour. 17, 281–288.

Amri Z, Turki S, Trabelsi E, Ben Maiz N (2010) First recorded proliferation of *Coolia monotis* (Meunier, 1919) in the North Lake of Tunis (Tunisia) correlation with environmental factors. Environ Monitor and Assess 164: 423-433

Ana L.S. Tim-Tim a,b, Fernando Morgado b, Susana Moreira a,c, Rui Rangel d, António J.A. Nogueira b, Amadeu M.V.M. Soares b, Lúcia Guilhermino (2009) Cholinesterase and glutathione S transferase activities of three mollusc species from the NW Portuguese coast in relation to the 'Prestige' oil spill *Chemosphere* 77 ,1465–1475

Andrade VM, De Freitas TRO, Da Silva J (2004) Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 560(1) ; 57-67

Andral B, Galgani F and C Blotiere (2007) MYTILOS and MYTIMED projects : Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean Sea

Andrew S. Brierley and Michael J. Kingsford (2009) Impacts of climate Change on Marine Organisms and Ecosystems. *Current Biology* 19, DOI 10.1016/j.cub.2009.05.046

ANPE, (1990) Diagnostic préliminaire pour l'Etude de l'Equilibre Ecologique du lac de Bizerte. GIC-NNEA-TECI, ANPE, Tunisie

ANPE, (1994) Etude pour la sauvegarde du parc national de l'Ichkeul. Etude réalisée par le groupement de bureau d'études BCEOM, FRESINIUS CONSULT, CES SALZGITTER et STUDI pour le compte de l'Agence Nationale de Protection de l'Environnement (ANPE), Rapport de 3ème Partie, pp. 18-258.

Aust SD (1985) Lipid oxidation. In: Greenwald, R.A. (Ed.), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press Boca Raton FL :203–207

Avery E L, Dunstan RH, Nell JA, (1996) The detection of pollutant impact in marine environments: condition index, oxidative DNA damage, and their associations with metal bioaccumulation in the Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis*. *Arch Environ Contam Toxicol* 31: 192–198

B

Banni M, Negri A, Dagnino A, Jebali J, Ameur S, Boussetta H (2010) Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicol Environ Saf* 73: 842–848

Banni M, Negri A, Mignone F, Boussetta H, Viarengo A, Dondero F (2011) Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle. *PLoS One* 6(5): e18904. doi:10.1371/journal.pone.0018904

Banni, M., Dondero, F., Jebali, J., Guerbej, H., Boussetta, H. and Viarengo, A (2007) Assessment of heavy metal contamination using real time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression : a validation along the Tunisian coasts. *Biomarkers*. 2007.12(4): 369-383.

Banni, M., Jebali, J., Daubez, M., Clerandau, C., Guerbej, H., Narbonne, J. F., Boussetta, H (2005) Monitoring pollution in Tunisian coasts: Application of a classification scale based on biochemical markers. *Biomarkers*, 10(2–3), 105-116

Barceloux DG (1999) Manganese. *Clinical Toxicology*, 37:293–307

Barrett, A.J. & Heath, M.F. (1977) Lysosomal enzymes. In *Lysosomes a laboratory handbook* (ed J.T. Dingle), pp. 19-127. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam

Barsiene, J. Lehtonen, K. K. Koehler, A. Broeg, K. Vuorinen, P. J. Lang, T. Pempkowiak, J. Balk, L. Syvokiene, J. Dedonyte, V. Rybakovas, A. Repecka, R. Vuontisjärvi, H. and Kopecka, J. (2006) Biomarker responses in mussel (*Mytilus edulis*) and flounder (*Platichthys flesus*) in the Klaipeda-Butinge area (Baltic Sea). *Mar. Poll. Bull.* 53: 422–436.

Baturo W, Lagadic L (1996) Benzo[a]pyrene hydroxylase and glutathione S-transferase activities as biomarkers in *Lymnaea palustris* (Mollusca, Gastropoda) exposed to atrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms. *Environ Toxicol Chem* 15:771–781

Baudrimont, M., de Montaudouin, X., Palvadeau, A (2006) Impact of digenean parasites infection on metallothionein synthesis by the cockle *Cerastoderma edule*): a multivariate field monitoring. *Mar. Poll. Bull.* 52, 494–502.

Baumard P, Budzinski H (1997) Internal standard qualification method and gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS): a reliable tool for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) quantification in natural matrices. *Analusis* 25, 246-252

Baumard, P., Budzinski, H. & Garrigues, P. (1997)b Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: application to mussels. *Fresenius Zeitschrift Analytische Chemie* 359, 502–509.

Bayne, B. L., Brown, D. A., Burns, K., Dixon, D. R., Ivanovici, A., Livingstone, D. R., Lowe, D. M., Moore, M. N., Stebbing, A. R. D. and Widdows, J. (1985). *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*. New York: Praeger.

BAYNE, B.L. (1989). Measuring the biological effects of pollution : the mussel watch approach. *Wat. Sci. Tech.*, 21, 1089-1100.

Bayne, B.L., D.L. Holland, M.N. Moore, D.M. Lowe, and J. Widdows. 1978. Further studies on the effects of stress in the adult on the eggs of *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 58:825-841.

Bayne, B.L., Widdows, J., Thompson (1976) Physiological integrations (Ch. 7, 206– 309). In: Bayne, B.L. (Ed.), *Marine Mussels Their Ecology and Physiology*. International Biological Programme, vol. 10. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 506 p

Bebianno MJ, Langston WJ, (1992) Cadmium induction of metallothionein= synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. *Compara Pharmacol and Toxicol* 103 (1): 79–85

Bebianno, M.J., Barreira. L.A (2009) Polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations and biomarker responses in the clam *Ruditapes decussatus* transplanted in the Ria Formosa lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 , 1849–1860

Bebianno, M.J., Lopes, B., Guerra, L., Hoarau, P., Ferreira, A (2007) Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors. *Environment International*. 33, 550–558

BEJAOU B., BEN CHARRADA R., MOUSSA M., BEN HAMADOU R., HARZALLAH A. et CHAPPELLE A., (2005) Caractérisation hivernale de la lagune de Bizerte. *Les Bulletins de l'INSTM, Tunis*, Vol. 32, pp. 79-91.

Beji O (2000) Les ressources vivantes exportables du lac de Bizerte: Etat actuel et potentialités (première partie). Bull. Inst. Nat. Sci. Tech. Mer. Salammbô 27, 45– 60

Beliaeff B, Burgeot T (2002). Integrated biomarker response (IBR): a useful graphical tool for ecological risk assessment. Environ Toxicol Chem 21:1316–1322

Ben Ameer W, BenHassine S, Eljarrat E, ElMegdiche Y, Trabelsi S, Hammami B, Barcelo D, Driss MR (2011) Polybrominated diphenyl ethers and their methoxylated analogs in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from Bizerte Lagoon, Tunisia. Mar Environ Res 72: 258–264

Ben Ameer W, Lapuente J, El Megdiche Y, Barhoumi B, Trabelsi S, Camps L, Serret J, Ramos-López D, Gonzalez-Linares J, Driss M, Borràs M (2012) Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). Mar Pollu Bul 64: 241–251

Ben Garali A, Ouakad M, Gueddari M (2009) Bilans hydrologiques de la lagune de Bizerte (nord-est de la Tunisie). Revue des sciences de l'eau/Journal of water Science, vol 22 (4); 525-534.

Ben Garali A, Ouakad M, Gueddari M (2010) Contamination of superficial sediments by heavy metals and iron in the Bizerte lagoon, northern Tunisia. Arab J Geosci 3: 295-306.

Ben Guirat, S (1997). Contribution à l'étude de la pollution des terres agricoles par les rejets industriels et miniers. Cas de la sidérurgie de Menzel Bourguiba et de la mine de Bou Grine. DEA de Géologie appliquée à l'environnement. pp101. Faculté des Sciences de Tunis – INAT.

Ben Khedher, S., Jebali, J., Kamel, N., Banni, M., Rameh, M., Jrad, A., Boussetta, H., (2013) Biochemical effects in crabs (*Carcinus maenas*) and contamination levels in the Bizerta Lagoon: an integrated approach in biomonitoring of marine complex pollution. Environmental Science Pollution Research, 20(4): 2616-31. DOI 10.1007/s11356-012-1156-x

Binelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A (2005) Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in zebra mussels from the Italian Great Lakes. Chemos 61:1074–1082

Bisson M, Diderich R, Dujardin R, Hulot C, Lacroix G, Lamy M.H, Le fèvre J.P, Lévêque S, Magaud H, Tissot S (2006) Benzo[a]pyrène, Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques rapport de LINERIS, 2006 . 44pp

Blaise C, Gagne F, Pellerin J, Hansen P.D, Trottier S (2002) Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay fjord with the soft-shell clam, *Mya arenaria*. Environmental Toxicology 17 : 170-186

Bocchetti R, Fattorini D, Pisanelli B, Macchia S, Oliviero L, Pilato F, Pellegrini D, Regoli (2008) Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. Aquatic Toxicology 89 (4) ; 257-266

Bocchetti, R. & Regoli, F. 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. Chemosphere, 65: 913–921.

Bocquené G, Galgani F (2004) Méthodes d'analyse en milieu marin – Les marqueurs biologiques des effets de polluants : l'acétylcholinestérase. Ifremer, Plouzan

Bocquené G, Roig A, Fournier D (1997) Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). FEBS Letters 14: 1-6

Bocquené G., Chantereau S., Raffin B., Minier C., Clérendeau C., Leskiewicz A., Beausir E., Burgeot T., Ménard D (2004) The monitoring of the biological effects of the ERIKA oil spill on the blue mussel (*Mytilus edulis*). Aquatic Living Resources. 17. 309–316

BOCQUENE G., GALGANI F., BURGEOT T., LE DEAN L., TRUQUET P (1993) Acetylcholinesterase levels in marine organisms along french coasts. Mar. Pollut. Bull., 26 (2), 101-106.

Bocquene, G., Galgani, F (1998) Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. International Council for the Exploration of the Sea. 22, 1-12

Bodin N, Burgeot T, Stanisière JY, Bocquené G, Menard D, Minier C, Boutet I, Amat A, Cherel Y, Budzinski H (2004) Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. Compar Bioch and Physiol Part C 138: 411 –427

Bolognesi C, Frenzilli G, Lasagna C, Perrone E, Roggieri P (2004) Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. Muta Res 552: 153-162

Bolognesi, C., Lando, C., Forni, A., Landini, E., Scarpato, R., Migliore, L. and Bonassi, S. (1999) Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. Age Ageing, 28, 393–397.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principal of protein-dye binding. Anal Bioch 72:248–254

Bressan M, Marin MG (1985) Seasonal variations in biochemical composition and condition index of cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Lagoon of Venice (North Adriatic). Aquacul 48: 13-21

Bressling J (2006) Natural and toxic stress indicator in blue mussel *Mytilus edulis* along an offshore-inshore gradient (Weser estuary). Master's Thesis, University of Oldenburg, pp122.

Broeg K, Lehtonen K K (2006) Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: integrated assessment of the multi-biomarker approach. Marine Pollution Bulletin 53, 508–522

Broeg, K. Zander, S. Diamant, A. Körting, W. Krüner, G. Paperna, I. and von Westernhagen, H. (1999) The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring. I. North Sea. Helgoland Mar. Res. 53: 171–194.

Broeg, K., Zander, S., Diamant, A., Körting, W., Krüner, G., Paperna, I. & von Westernhagen, H.. (1999a). The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring. I. North Sea. Helgoland Mar. Res., 53, 171-194

Brown, R.J., Galloway, T.S., Lowe, D., Browne, M.A., Dissanayake, A., Jones, M.B. & Depledge, M.H. (2004) Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 66, 267-278

Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52:302-310

C

Cairns, J. Jr., B.C. Heath et B.C. Parker (1975) The effect of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia* 47:135-171.

Cajaraville M. P., Hauser L., Carvalho G., Hylland K., Olabarrieta I., Lawrence A. J., Lowe D., Goksoyr A. (2003) Genetic damage and the molecular/cellular response to pollution. In: (eds. Lawrence A. J., Hemingway K. L.), pp. 14-82. Blackwell Sciences.

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

Cajaraville, M.P., Abascal, I., Etxeberria, M. & Marigomez, I. (1995a) Lysosomes as cellular markers of environmental pollution: time- and dose-dependent responses of the digestive lysosomal system of mussels after petroleum hydrocarbon exposure. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10, 1-8

Canesi L, Ciacci C, Betti M, Scarpato A, Citterio B, Pruzzo C, Gallo G (2003) Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling *Aquat. Toxicol* 63 ; pp. 293–306

Cappello T, Maisano M, D'Agata A, Natalotto A, Mauceri A, Fasulo S (2013) Effects of environmental pollution in caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Mar Envr Reaserch* In press.

Carlson, E.A., Li, Y., Zelikoff, J.T., 2002. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses 346 immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquatic Toxicology* 56, 289-301

Cartier S, Pellerin J, Fournier M, Tamigneaux E, Girault L, Lemaire N. Use of an index based on the blue mussel (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) digestive gland weight to assess the nutritional quality of mussel farm sites. *Aquaculture* 2004;241:633–54.

Chan LM, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* 2004;21:25–51.

Chang LW (1996) *Toxicology of Metals*. Boca Raton, USA: CRC Lewis

Charissou AM, Cossu-Leguille C, Vasseur P (2004) Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro- 2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Sci Tot Environ* 322: 109–122

CHAUMONT M. (1956). Étude hydrologique du bassin versant du Lac Ichkeul pendant l'année agricole 1955-56. BIRH (Bureau d'Inventaires des Ressources Hydriques), Tunis, 83p.

Cheikh M, Derouiche A, Driss MR (2002) Détermination par (CPG-ECD) des résidus de pesticides organochlorés dans les sédiments de la lagune de Bizerte. Bull Inst Nat Sci Technol Mer 7:160-163

Cheung CC, Zheng GJ, Li AM, Richardson BJ, Lam PK (2001) Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. Aquat Toxicol 52: 189-203

Chipperfield P N J (1953) -Observations on the breeding and on the settlement of *Mytilus edulis* in the British waters. -1. Mar. biol. Ass. U.K. 32: 449-476.

Claiborne A. Catalase activity. In: Greenwald RA (eds) Handbook of Methods for Oxygen Radical Research (1985) Boca Raton, FL: CRC pp 283-284

Clairbone A (1985) Catalase activity. Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press Boca Raton : 283-284

Claissé D (1989) Chemical contamination of the french coasts. The results of a ten-year mussel watch. Marine Pollution Bulletin, 20 :523-528

Colborn T, Vom Saal F S, Soto A M (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ. Health Perspect. 101, 378-384

Copin-Montégut G (1996) Chimie de l'eau de mer. Collection »Synthèses«, Institut océanographique, Paris

Cossa D, Thibaud Y, Romeo M, Gnassia-Barelli M (1990) Le mercure en milieu marin : biogéochimie et écotoxicologie. Rapp. Scient. Tech. IFREMER.19, pp129.

Cossa D, Bourget E, Pouliot D, Pinze J, Chanut JP (1980) Geographical and seasonal variations in the relationship between trace metal content and body weight in *Mytilus edulis*. Marine Biology 58, 7-14

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

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

Cox R A (1965) The physical properties of sea water, in: Chemical oceanography, J.P. Riley et G. Skirrow, éd. Academic Press, Londres.

Cronin MT, Manga N, Seward JR., Sinks GD, Schultz TW (2001) Relation between physicochemical properties of phenols and their toxicity and accumulation in fish. Chem. Res. Toxicol. 14, 1498-1505

Crosby MP, Gale LD (1990) A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. J Shellfish Res 9:233-237

D

Da Ros L, Meneghetti F. and Nasci C (2002) Field application of lysosomal destabilisation indices in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: biomonitoring and transplantation in the Lagoon of Venice (north-east Italy), Mar. Environ. Res. 54: 817–822.

Dagnino A, Allen J I, Moore M N, Broeg K, Canesi L, Viarengo A (2007) Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. Biomarkers 12, 155–172

Dailianis S, Domouhtsidou GP, Raftopoulou E, Kaloyianni M, Dimitriadis VK (2003) Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.) on pollution monitoring. Mar Environ Res 56: 443–470.

Dame RF (1996) Bivalves as components of ecosystem health. In the Ecology of marine bivalves. An Ecosystem Approach, pp.213-226. Ed. by R.F.Dame. CRC Marine Science Series, CRC Press, Boca Raton, FA pp254.

Damiens G, Gnassia-Barelli M, Loquès F, Roméo M & Salbert V (2007) Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. Chemosphere, 66, 574-583

Damiens G, His E, Gnassia-Barellia M, Quiniouc F, Romeo M (2004) Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. Comp. Biochem. Physiol. 138C, 121–128.

Davies I M, Rodger G, Redshaw J, Stagg R M (2001) Targeted environmental monitoring for the effects of medicines used to treat sea-lice infestation on farmed fish. ICES J Mar Sci 52: 447–485

Davies I M, Vethaak D (2012) Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES cooperative research report 315

De Luca-Abbott S B, Richardson BJ, Mc Clellan K E, Zheng G J, Martin M, Lam P K S (2005) Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. Marine Pollution Bulletin e12, 694-707

Dellali M, Aissa P (1998) État de pollution de la lagune de Bizerte, Bull. Inst. Nat. Sci. Tech. Mer. 26, 56 - 60

Dellali M, Roméo M, Gnassia-Barelli M, Aissa P (2004) A multivariate 298 data analysis of the clam *Ruditapes decussatus* as sentinel organism of the Bizerta lagoon (Tunisia). Water, Air, and Soil Pollut 156(1):131–144

Dellali M, Roméo M, Aissa P (2001) Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. Oceanologica. 24, 263-271.

Depledge MH (2009) Novel approaches and technologies in pollution assessment and monitoring: A UK perspective. Ocean Coast Manag 52:336–341

Derouiche A, Sanda YG, Driss M R (2004) Polychlorinated biphenyls in sediments from Bizerte lagoon, Tunisia. Bul Environ Contam Toxicol 73: 810–817

Devescovi M (2009) Biometric differences between date mussels *Lithophaga lithophaga* colonizing artificial and natural structures. *Aca Adriat.* 20(2) ; 129-138.

Devin S, Burgeot T, Giambérini L, Minguez L. and Pain-Devin S. (2014) The Integrated Biomarker Response revisited : optimization to avoid misuse. *Environ Sc Pollu Res.* In press

Di Giulio RT, Washburn PC, Wenning RJ, Winston GW and Jewell CS (1989) Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 8, 1103-1123.

Dizer H, da Silva de Assis HC. and Hansen P (2001) Cholinesterase activity as a bioindicator for monitoring marine pollution in the Baltic Sea and the Mediterranean sea. pp331–342. In: *Biomarkers in marine organisms; a practical approach.* Edited by Ph. Garrigues, H. Barth, C.H. Walker and J.F. Narbonne. Eds Elsevier. 491p.

Domouhtsidou GP, Dimitriadis VK (2001) Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environ Pollu* 115: 123-137

Downs CA, Shigenaka G, Fauth JE, Robinson C E, Huang A (2002) Cellular physiological assessment of bivalves after chronic exposure to spilled Exxon Valdez crude oil using a novel molecular diagnostic biotechnology. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2987–2993.

Dridi S (1977) Recherches écologiques sur les milieux lagunaires du nord de la Tunisie. Thèse de spécialité, 1977, Faculté des sciences, Tunis

Durou C, Poirier L, Amiard JC, Budzinski H, Gnassia-Barelli M, Lemenach K, Peluhet L, Mouneyrac C, Roméo M, Amiard-Triquet C (2007) Biomonitoring in a clean and a multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environ. Pollut.* 148, 445-458

E

Eertman RHM, Wagenvoort AJ, Hummel H, Smaal A C (1993) Survival in air of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress. *J Experim Marin Biol and Ecol* 170: 179-195

Ellman GL, Courtney KO, Andres V, Featherstone RM, (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95

Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives in Biochemical Biophysics* 82, 70-77.

Elumalai M, Antunes C, Guilhermino L (2002) Single metals and their mixtures on selected enzymes of *Carcinus maenas*. *Water Air Soil Pollut.* 141, 273–280.

Ennaceur S, Driss MR (2010) Serum organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl levels measured in delivering women from different locations in Tunisia. *Int J Environ Anal Chem:* 821–828

F

Farrington J W (1991). Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms. *Environ. Health Persp.*, 90, 75-84.

Fenech M (1997) The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 392(1-2): 11-18

Ferrari B, Paxeus N, Giudice RL, Pollio A, Garric J (2003) Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters : study of carbamazepine, clofibric acid and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, 359-370

Fisher SW, Chordas SW, Landrum PF (1999) Lethal and sublethal body residues for PCB intoxication in the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Aquat Toxicol* 45:115-126

Fisher W, Schneider M, Bauchot ML (1987) Fiches FAO d'identification des especes pour les besoins de la peche: Mediterranee et Mer Noire. Vol. I, Végétaux et invertébrés. Rome, FAO

Fisher WS (1988) Environmental influence on bivalve hemocyte function. In: Fisher, W.S. (Ed.), *Disease processes in marine bivalve molluscs*. Am. Fish. Soc. Special Publication, pp. 225-237.

Forget J, Beliaeff B, and Bocquene G (2003) Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology*, 62, 195-204

Frolin L, Blom S, Clander M, Sturve J (1996) Effects on UDP glucuronosyl transferase glutathione transfrase, DT-diaphorase and glutathione reductase activities in rainbow trout liver after long-term exposure to PCB. *Marine Environmental Research* 42 :213-216.

Frouin H, Pellerin J, Fournier M, Pelletier E, Richard P, Pichaud N, Rouleau C, Garnerot F (2007) Physiological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on soft-shell clam *Mya arenaria*. *Aquatic Toxicology* 82 .120-134.

Fulton MH et Key P. B (2001) Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20 : 37-45.

Funes V, Alhama J, Navas JI, Lopez-Barea J, Peinado J (2006) Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral." *Environ. Poll.*, 139: 214-223.

G

Galloway TS, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Jones MB, Depledge MH (2004a) A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environ Sc Technol* 38: 1723-1731

Galloway TS, Sanger RC, Smith KL, Fillmann G, Readman JW, Ford TE & Depledge MH(2002) Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environ.Sci.Technol.*, 2002, 36, 2219-2226

George G S, Buchanan G (1990) Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione S-transferases. *Fish Physiol. & Biochem.*, v. 8, n° 6 : 437-449

Giarratano, E., Duarte, C.A., Amin, O.A (2010) Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73 , 270–279

Godet F, P Vasseur M. Babut (1993) In vitro and in vivo genotoxicity tests for studying contaminated aquatic environmental samples. *Essais de génotoxicité in vitro et in vivo applicables à l'environnement hydrique* 6(3): 285-314

Goldberg E D (1975) The mussel watch ; a first step in global marine monitoring. *Mar Poll Bull* 11 : 111

Gomiero A, Da Ros L, Nasci C, Meneghetti F, Spagnolo A, Fabi G (2011) Integrated use of biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis* for assessing off-shore gas platforms in the Adriatic Sea: Results of a two year biomonitoring program. *Mar Pollu Bul* 62: 2483-2495

Gowland B T G, McIntosh A D, Davies I M, Moffat C F, & Webster L (2002) Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. *Marine Environmental Research*, 54, 231-235

Gravato, C., Santos, M A, (2003) *Dicentrarchus labrax* biotransformation and genotoxicity responses after exposure to a secondary treated industrial/urban effluent. *Ecotox. Environ. Safe.*, 55: 300-306.

Gravato C, Santos M A (2003) Genotoxicity biomarkers' association with B[a]P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 352–358.

Guilhermino L, Soares A M V M, Carvalho A P, Lopes M C (1998) Effects of cadmium and parathion exposure on hematology and blood biochemistry of adult male rats, *Bull. Environ. Contam. Tox.*, 60 (1), 52–59

Guo L, Qiu Y, Zhang G, Zheng GJ, Lam PK, Li X (2008) Levels and bioaccumulation of organochlorine pesticides (OCPs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fishes from the Pearl River estuary and Daya Bay, South China. *Environ Pollu* 152: 604–611

H

Haaf, T., E. Raderschall, G. Reddy, D. C. Ward, C. M. Radding and E. I. Golub (1999)

Habig W, Pabst M, Jakoby W (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130–7139

Habig C, Di Giulio R T, Nomeir A A, Abou-Donia M B (1986) Comparative toxicology, cholinergic effects, and tissue levels of S,S,S-Tri-n-Butyl Phosphorothioate (DEF) to channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue crabs [*Callinectes sapidus*]. *Aquatic Toxicol.* 9: 193-235

Halliwell, B. and J.M. Gutteridge (1997) Lipid peroxidation in brain homogenates: The role of iron and hydroxyl radicals. *J. Neurochem.*, 69: 1330-1331.

Halliwell B, Gutteridge J.M.C (1997) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Anonymous. *Terminalia arjuna*. *Altern. Med. Rev.* 4, 436-437.

Handy R D, Galloway T S, Depledge M H (2003) A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* 12, 331-43

Hardin, C., Roberts, T (1997) Regulation of glycogen utilization, but not glucose utilization, by preconcentration glycogen levels in vascular smooth muscle. *Biochemistry* 36, 7444– 7453.

Holtzman, E. (1989) *Lysosomes*, New York and London, 439

Houston, A.H (1982) Effets de la pollution thermique sur les poissons. Centre national de recherches Canada, Comité associé sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement, Ottawa.

Hummel H, Amiard-Trique C, Bachelet G, Desprez M, Marchand J, Sylvand B, Amiard JC, Rybarczyk H, Bogaards RH, Sinke J, De wit Y, De Wolf L (1996) Sensitivity to stress of the estuarine bivalve *Macoma balthica* from areas between the Netherlands and its southern limits (Gronde). *J Sea Res* 35 (suppl 4) :315-321.

Hyotylanen, T., Karels, A., Oikari, A (2002) Assessment of bioavailability and effects of chemicals due to remediation actions with caging mussels (*Anodonta anatina*) at a creosote-contaminated lake sediment site. *Water Res.* 36, 4497– 4504

I

ICES (2010b) Report of the working Group on Biological Effect of Contaminants (WGBC), 11-15 January, 2010, Dublin, Ireland. ICES Document CM2011/SSGHIE:04

INSTM (2002) Etat actuel et évolution de l'exploitation halieutique et aquacole des lagunes Cas de la lagune de Bizerte.

Izquierdo, J. I., G. Machado, F. Ayllon, V. L. d'Amico, L. O. Bala, E. Vallarino, R. Elias and E. Garcia-Vazquez (2003). "Assessing pollution in coastal ecosystems: a preliminary survey

J

Jarry V, Fiala M, Frisoni GF, Jacques G, Neveux J, Panouse M (1990) The spatial distribution of phytoplankton in a Mediterranean lagoon (Étang de Thau). *Oceanologia Acta* 13: 503-512

Jett DA, Navoa RV, Lyons Jr MA (1999) Additive inhibitory action of chlorpyrifos and polycyclic aromatic hydrocarbons on acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicol. Lett.* 105, 223–229.

Jha Awadhesh N (2008) Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23 ; 207-221

Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner AP, Tyler CR (2004) Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat. Toxicol.* 65, 205–220

K

Kaaya A (2002) Contribution à l'évaluation de l'état de santé de la baie d'Agadir : étude de la physico-chimie du milieu et de certains biomarqueurs chez *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna* (stratégie de réserve, bioaccumulation métallique et enzymes de biotransformation). Thèse d'Etat, Univ. Ibn Zohr, Faculté des Sciences, Agadir, 485

Kallel M.R. (1989). Hydrologie du lac de Bizerte. DGRE (Direction Générale des Ressources en Eau), Tunis, pp. 41.

Kamaruzzaman BY, Mohd Zahir MS, Akbar John B, Jalal KCA, Shabbudin S, Al Barwani SM, Goddard JS (2011) Bioaccumulation of some metals by green mussel *Perna viridis* (Linnaeus 1758) from Pekan, Pahang, Malaysia. *International Journal of Biological Chemistry* 5 ; 54-60.

Kamel N, Attig H, Dagnino D, Boussetta H, Banni M (2012) Increased Temperatures Affect Oxidative Stress Markers and Detoxification Response to Benzo[a]Pyrene Exposure in Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Environ Contam Toxicol*. DOI 10.1007/s00244-012-9790-3

Kamens J, Pilkey O, Whalting P (1984) Étude sédimentologique des lacs de Bizerte et de Tunis. *Notes Serv. Géo. Off. Nat. Min.*, n° 49, pp 5-25.

Keppler C.J, A.H. Ringwood (2001) Expression of P-glycoprotein in southeastern oysters *Crassostrea virginica*, *Mar. Environ.Res.* 52 , 81–96.

Khessiba A, Hoarau P, Gnassia-Barelli M, Aissa P, Roméo M (2001) Biochemical Response of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* from Bizerta (Tunisia) to Chemical Pollutant Exposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 40: 222-229

Khessiba A, Roméo M, Aissa P (2005) Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environ Pollu* 133: 275–281

Kikagawa K. K, T and Kosugi H (1990) Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoid. *Journal of the National Cancer Institute*, 69, 205-209.

Kinne O (1963) The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. I. *Temp. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 1:301%340.

Kirchin MA, Moore M N, Dean RTand Winston G.W (1992) The role of oxyradicals in intracellular proteolysis and toxicity in mussels. *Mar. Environ. Res.* 34: 315–320.

Kiss, T., Zatta, P., Corain, B (1996) Interaction of aluminium (III) with phosphate-binding sites: biological aspects and implications.:*Coordination:Chemistry:Reviews.*:149,:329-346

Klerks P. L. et Levinton J. S. (1989) Effects of heavy metals in a polluted aquatic ecosystem. In: *Ecotoxicology: problems and approaches* (eds. Levin S. A., Harwell M. A., Kelly J. R., Kimball K. D.), pp. 40-67

Knapen D., Bervoets L., Verheyen E., Blust R. (2004) Resistance to water pollution in natural Gudgeon (*Gobio gobio*) populations may be due to genetic adaptation. *Aquatic Toxicology* 67,

Köhler, A., Alpermann, T., Lauritzen, B. & Van Noorden, C.J.F. (2004). Clonal xenobiotic resistance during pollution-induced toxic injury and hepatocellular carcinogenesis in liver of female flounder. *Acta Histochem.*, 106, 155-170

Köhler, A., Wahl, E. & Söffker, K. (2002). Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* (L)). *Environ.Toxicol. Chem.*, 21, 2434-2444

Kolarevic S, Knezevic-Vukcevic J, Paunovic M, Kracun M, Vasiljevic B, Tomovic J, Gacic B, Gacic (2013) Monitoring of DNA damage in haemocytes of freshwater mussel *Sinanodonta woodiana* sampled from the Velika Morava River in Serbia with the comet assay. *Chemosphere* 93(2) : 243.

Kumaravel, T. S. and Jha, A. N. (2006) Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat. Res* ; 605, 7–16

Kurelec, B (1992) The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 23–43

Kurelec, B., Pivcevic, B (1989) Distinct glutathione dependent enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 934–940

L

Labrot et al., 1996, Labrot F., Ribera D., Saint-Denis M., 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, 21 – 28

Lagadic L, Caquet T, Amiard JC (1997) Intérêt d'une approche multiparamétrique pour le suivi de la qualité de l'environnement. In: Lagadic,L., Caquet,T., Amiard, J.C.,Ramade,F. (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects Fondamentaux*. Masson,Paris,pp.393-401

Lagadic, L. & Amiard, J.-C., (1997) Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In "Biomarqueurs en Ecotoxicologie. Aspects Fondamentaux". Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C.Ramade, F. (Eds.). Paris, Masson: 1-9.

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F (1997) *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*. Paris, Masson. 418 p

Langston, W.J., Bebianno, M.J., Burt, G.R (1998) Metal handling strategies in molluscs. In: Langston,W.J., Bebianno, M.J. (Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, London, pp. 219–283.

Laurier F., (2001) Cycle du mercure en estuaire, baie de Seine et Pays de Caux. Spéciation chimique et biodisponibilité. Thèse de Doctorat, Université Paris 7 « Denis Diderot ».

Leiniö S, Lehtonen K (2005) Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comp Bioch Physiol C* 140: 408–421

Lima, F. P., N. Queiroz, P. A. Ribeiro, S. J. Hawkins, and A. M. Santos (2006) Recent changes in the distribution of a marine gastropod, *Patella rustica* Linnaeus, 1758, and their relationship to unusual climatic events. *J. Biogeogr.* 33:812- 822.

Lin, C.H., Chang, S.L., Hsieh, C.W., Lee, H.H (2008) Aromatic diamine-based benzoaxines and their high performance thermosets. *Polymer* 49:1220-1229.

Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Pascariello MF, Marinosci L, Schettino T (2003) Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzyme activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Mar Pollut Bull* 46:324–330

Livingstone DR (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* 42:656–66

Livingstone, D.R. (1993) Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 57, 195-211.

Livingstone, D.R., Garcia–Martinez P., Michel, X., Narbonne J.F., Ohara S., Riveria D., Winston, W., (1990) Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other mollusks. *Ecology* 4, 415- 424.

Lohse, J. (1990), Distribution of organochlorine pollutants in North Sea sediments. International Conference on North sea Pollution - technical Strategies for improvement IAWPRC, EWPCA, NVA, Amsterdam, pp.227-236

Lowe D M, Pipe R K (1994) Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aqua Toxicol* 30: 357–365

Lowe, D.M. & Fossato, V.U. (2000) The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon. *Aquatic Toxicology*, 48, 75-85

Lubet P. (1959) Recherches sur le cycle sexuel et remission des gametes chez les Mytilides et les Pectinides (Mollusques bivalves}. - *Rev. Treo, Inst. Peches merit*, 2'3 (4). p. 389-458.

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

Lucas A, Beninger P G (1985) The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44: 187-200

M

Maanan M, Zourarah B, Carruesco C, Aajjane A, Naud J (2004) The distribution of heavy metals in the Sidi Moussa lagoon sediments (Atlantic Moroccan Coast). *Journal of African Earth Sciences* 39: 473–483

MAERH (Ministère de l'Agriculture, de l'Environnement et des Ressources Hydrauliques) (2003) Etude sur la dépollution industrielle dans le bassin versant du lac de Bizerte. Etude réalisée par le groupement de bureaux d'études COMETE-Engineering et IHE pour le compte du MAERH.

Mahmoud N, Dellali M, El Bour M, Aissa P, Mahmoudi E (2010) The use of *Fulvia fragilis* (Mollusca: Cardiidae) in the biomonitoring of Bizerta lagoon: A mutimarkers approach. *Ecolo Indica* 10: 696-702

Makala, P.& Oikari, A.O.J (1990) "Uptake and body distribution of chlorinated phenolic in the freshwater mussel, *Anodonta atina* L", *Ecotox. Environ. Saf*, vol. 20, p.354-362

Mannervic B, & Danilson U H (1988). Glutathione transferases. Structure and catalytic activity. *Critical Reviews in Biochemistry* 23, 28 1-334.

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

Matozzo V, Tomei A, Marin MG (2005) Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Mar Pollut Bull* 50(12):1686-1693

McFadzen I, Eufemia N, Heath C, Epel D, Moore M, Lowe D (2000) Multidrug resistance in the embryos and larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res* 50: 1-5

MEDPOL Programme (2006) A Strategic Action Plan to eliminate pollution from land-based sources in the Mediterranean. UNEP. Mediterranean Action Plan. MED POL,

Michel X, Salaun J-P, Galgani F, Narbonne J-F (1994) Benzo(a)pyrene hydroxylase activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: a potential marker of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbon-type compounds. *Mar Environ Res* 38:257-273

Michel X, Salaün JP, Galgani F, Narbonne JF (1994) Benzo(a)pyrene hydroxylase activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: a potential marker of contamination by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon type compounds. *Mar Environ Res* 38: 257- 273

Miele, M, S. Bonatti, P. Menichini, L. Ottaggio and A. Abbondandolo (1989). "The presence of amplified regions affects the stability of chromosomes in drug-resistant Chinese hamster

Minier C, Galgani F (1995) Multi-xenobiotic resistance in *Mytilus edulis*, *Mar. Environ. Res.* 39 ; 267-270

Minier C, Borghi V, Moore MN, Porte C (2000) Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 50: 167-176

Minier C, Moore MN (1996) Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine. *Mar Ecol Prog Ser* 142: 165-173

Minier, C, Borghi, V, Moore, M.N, Porte, C (2000) Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 50, 167-176

Minier, C, Moore, M.N (1996) Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine. *Mar. Ecol, Prog. Ser.* 142, 165–173.

Minier, M.N. Moore, Induction of multixenobiotic resistance in mussel blood cells, *Mar. Environ. Res.* 42 (1–4) (1996) 389–392.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE, DE L'ENVIRONNEMENT ET DES RESSOURCES HYDRAULIQUES (MAERH). (2005). Etude sur la dépollution industrielle dans le bassin versant du lac de Bizerte, Rapport phase II version provisoire, 236p

Modassir Y, Ansari A (2000) Effect of petroleum hydrocarbon on physiological and biochemical parameters in an estuarine clam (*Paphia malabarica*). *Fichery Technology.* 37 ; 40-45.

Monteiro DA, de Almeida JA, Rantin FT, Kalinin AL (2006) Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600(methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 143 :141-149.

Moore MN, Icarus Allen J, McVeigh A (2006a) Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar Environ Res* 61: 278-304

Moore MN, Viarengo A, Donkin P, Hawkins JSA (2007) Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aqua Toxicol* 84: 80-91

Moore, M. N. Lowe, D. M. Wedderburn, R. J. Wade, T. Balashov. G. Büyükgüngör, H. Daurova, Y. Denga, Y. Kostylev, E. Mihnea, P. Moncheva, S.Tabagari, S. Ciocan, C. Özkoc, H. Depledge, M. H. (1998) International Mussel Watch (UNESCO/IOC) in the Black Sea: a pilot study for biological effects and contaminant residues. In: *Environmental degradation of the Black Sea*, (Eds. S. Beşiktepe et al.), pp. 273 – 289. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam.

Moore M N, Allen J I, and McVeigh, A (2006) Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Marine Environmental Research*, 61(3): 278–304.

Moore M N, Lowe D., and Köhler A (2004) Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, Vol. 36. 31 pp.

Moore M.N. & Allen I.J. (2002) A computational model of the digestive gland epithelial cell of marine mussels and its simulated responses to oil-derived aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 54, 579-584

Moore M.N. (1990) Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochem. J.* 22: 187–191.

Moore M.N. Allen J.I. and McVeigh A. (2006a) Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar. Environ. Res.* 61(3):278-304.

Moore M.N. Viarengo A. Donkin P. and Hawkins A.J.S (2007) Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquatic Toxicology* 84(1) 80-91.

Mora P, Fournier D, Narbonne JF (1999) Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* LmK. and *Mytilus edulis* from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Muller. *Comp Bioche Physiol C122*: 353– 361

Mora P, Michel X, Narbonne JF (1999) Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environ Toxicol Pharmacol* 7: 253–260

Morel, A., and J.-M. André (1991) Pigment Distribution and Primary Production in the Western Mediterranean as Derived and Modeled From Coastal Zone Color Scanner Observations, *J. Geophys. Res.*, 96(C7), 12685–12698.

Mougraud Y, Martinez, E Geffard A, Andral B, Stanisiere JY, Amiard J C, (2002) Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination : validation in the field. *Biomarkers* 7, 479– 490

N

Narbonne JF et Michel X, (1997) Systèmes de biotransformation chez les mollusques aquatiques. In *Biomarqueurs en écotoxicologie*. Collection Écologie, Masson, 419 p.

Nicholson, S. and Lam, P.K.S (2005) Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae : Bivalvia). *Environ. Internat.* 31: 121 132.

Nunes B F, Carvalho, L Guilhermino (2006) Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, 62: 581-594

O

Okumus I, Stirling HP (1998) Seasonal variations in the meat weight, condition Index and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis*) in suspended culture in two Scottish sea lochs. *Aquaculture*. 159(3-4), 249-261.

Orban E, Di Lena G, Nevigato T, Casini I, Marzetti A, Caproni R (2001) Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chemistry*. 77 ; 57-65.

OSPAR (2007) Lysosomal Membrane Stability as a global health status indicator in biomonitoring. In *Background Document on Biological Effects Monitoring Techniques. Assessment and Monitoring Series, Chapter 4*, page 20. ISBN 978-1-905859-72-6. Publication Number: 333/2007.

P, Q

Pagliassotti MJ, Davis SN, CherringtonAD (1994) The role of the liver in maintaining glucose homeostasis : AustinR.G. Landes Company.

- Pain S, Parant M (2003) Le mécanisme de défense multixénobiotique (MDMX) chez les bivalves. *C.R. Biologies* 326 ; 659-672
- Pampanin DM, Volpato E, Marangon I, Nasci C (2005) Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice. Survival in air and condition index. *Comparative Biochemistry and Physiology* 140 ; 41-52.
- Pan L, Ren J, Zheng D (2009) Effects of benzo(a)pyrene exposure on the antioxidant enzyme activity of scallop *Chlamys farreri*. *Chin J Oceanol Limnol* 27: 43-53
- Payne J.F., Mathieu A., Melvin W., Fancey L.L (1996) Acetylcholinesterase, and old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* 1996;32(2):225-231
- Pellerin-Massicotte J (1994) Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *J Aquat Ecosy Heal* 3: 101-111
- Pellerin-Massicotte J, (1997) Influence of elevated temperature and exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Journal de Recherche Océanographique* 22: 91-98
- Pereira CDS, Abessa DMS, Bainy ACD, Zaroni LP, Gasparro MR, Bicego MC, Taniguchi S, Furley TH, Sousa ECPM (2007) Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from Sao Sebastiao, Sao Paulo, Brazil. *Environ Toxicol Chem* 26:462-469
- Pérez-Ruzafa, A., Marcos, C (2005) Pressures on Mediterranean coastal lagoons as a consequence of human activities. In: Fletcher, C., Spencer, T., Da Mosto, J., Campostrini, P. (Eds.), *Flooding and Environmental Challenges for Venice and its Lagoon: State of Knowledge*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 545- 555
- Pérez-Ruzafa A, Marcos C (2008) Coastal lagoons in the context of water management in Spain and Europe. In: Gönenç, I.E., Vadineanu, A., Wolflin, J.P., Russo, R.C. (Eds.), *Sustainable Use and Development of Watersheds*. Nato Science for Peace and Security Series C – Environmental Security. Springer, Dordrecht, pp. 299-321
- Pérez-Ruzafa, J, Marcos C, Ros J (1991) Environmental and biological changes related to recent human activities in the Mar Menor. *Marine Pollution Bulletin* 23, 747-751
- Peters LD, Shaw JP, Nott M, O'Hara SCM, Livingstone DR (1999) Development of cytochrome P450 as a biomarker of organic pollution in *Mytilus* sp.: field studies in United Kingdom ('Sea Empress' oil spill) and the Mediterranean Sea. *Biomarkers* 4:425-441
- Pfeifer S, D Schiedek, Dippner JW (2005) Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. *J Exp Mar Biol Ecol* 320: 93-103
- Pisoni M, Cogotzi L, Frigeri A, Corsi I, Bonacci S, Iacocca A, Lancini L, Mastrototaro F, Focardi S, Svelto (2004) DNA adducts, benzo(a)pyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in *Mytilus galloprovincialis* from different areas in Taranto coastal waters (Italy). *Environ. Res.* 96: 163-175.

Porte C, Sole M, Albaigés J, Livingstone DR (1991) Responses of mixed-function oxygenase and antioxidase enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution. *Comp Biochem Physiol C* 100:183-186

Power, A., Sheehan, D (1996) Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 114, 99- 103.

Printes, L.B., Callaghan, A (2004) A Comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23 (5), 1241-1247

Quilliam, L. A., Huff, S. Y., Rabun, K. M., Wei, W., Park, W., Broek, D. and Der, C. J. (1994). Membrane-targeting potentiates guanine nucleotide exchange factor CDC25 and SOS1 activation of Ras transforming activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91, 8512-8516.

R

Rank J, Lehtonen KK, Strand J, Laursen M (2007) DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology* 84(1) ; 50-61

Regoli F (1992) Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Mar Ecol Prog Ser* 84: 63-69

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. *Mar. Environ. Res.* 54, 419-423

Regoli F, Pellegrini D, Winston GW, Gorbi S, Giuliani S, Virno-Lamberti C, Bompadre S (2002) Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Mar Pollu Bul* 44: 912-922

Regoli, F (2000) Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 50, 351-36

Rigollett V, Sfriso A, Marcomini A, De Casabianca ML (2004) Seasonal evolution of heavy metal concentrations in the surface sediments of two Mediterranean *Zostera marina* L. beds at Thau lagoon (France) and Venice lagoon (Italy). *Bioresource Technology* 95: 159-167.

Ringwood, A.H., Deanna, E.C., & Hoguet, J. (1998). Effects of natural and anthropogenic stressors on lysosomal destabilization in oysters *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series*, 166, 163-171.

Rocher B, Le Goff J, Peluhet L, Briand M, Manduzio H, Gallois J, Devier MH, Geffard o, Gricourt L Augagneur S, Budzinski H, Pottier D, Andrée V, Lebailly, Cachot J and P (2006) Genotoxicant accumulation and cellular defense activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquatic Toxicology* 79 (1) ; 65-77

Rodilla V (1993) "Origin and evolution of binucleated cells and binucleated cells with micronuclei in cisplatin-treated CHO cultures." *Mutation Research/Genetic Toxicology* 300(3-4): 281-291

Roesijadi G. (1992) Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 22, 81-114

Roko Žaja a, Göran I.V. Klobučar b, Roberta Sauerborn Klobučar a, Branimir K. Hackenberger c, Tvrtko Smital (2006) Haemolymph as compartment for efficient and non destructive determination of P-glycoprotein (Pgp) mediated MXR activity in bivalves. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 143 (2006) 103-112

Roméo M, Gnassia-Barelli M (1997) Effects of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean clam *Ruditapes decussates*. *Comp Bioch Physiol* 118: 33-37

Roméo M, Hoarau P, Garello G, Gnassia-Barelli M, Girard J P (2003) Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environmental Pollution* 122,369-378

Roose P, Albaigès J, Bebianno M.J (2011) Chemical pollution in Europe's Seas : programmes, Practices and priorities for Research, Marine Board Position Paper 16, Calewaert, J.B. and McDonough N. (Eds). Marine Board-ESF, Ostend, Belgium. 103pp

Rougier C, Pourriot R, Lam-hoi T (2000) The genus *Synchaeta* in a north western Mediterranean coastal lagoon (Étang de Thau, France): taxonomical and ecological remarks. *Hydrobio* 436: 105-117

S

Saarikoski, J., Viluksela, M (1982) Relation between physicochemical properties of phenols and their toxicity and accumulation in fish. *Ecotox. Environ. Saf.* 6, 501-512

Sainfeld P. (1952) : Les gîtes plombo-zincifères de Tunisie. *Annales des mines et de la géologie* N°9, 78p

Sanchez W, Burgeot T, Porcher JM (2013) A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. *Environ Sc Pol Res* 20: 2721-2725

Santovito, G., Piccinni, E., Cassini, A., Irato, P, Albergoni, V (2005) Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. *Comparative Biochemistry and Physiology:Part:C:Toxicology:and:Pharmacology*,:140,:321-329

Sara G, Puscedda A (2008) Scope for growth of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk., 1819) in oligotrophic coastal waters (Southern Tyrrhenian Sea, Italy). *Marine Biology*, 156 (2), 117-126.

Schiedek, D. Broeg, K. Barsiene, J. Lehtonen, K. K. Gercken, J. Pfeifer, S. Vuontisjärvi, H. Vuorinen, P. J. Köhler, A. Balk, L. Schneider, R (2006) Biomarker responses and indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and eelpout (*Zoarces viviparus*) from the western Baltic Sea. *Mar. Poll. Bull.* 53: 387-405.

Schiedek, D., Broeg, K., Barsien_e, J., Lehtonen, K.K., Gercken, J., Pfeifer, S., Vuontisjarvi, H., Vuorinen, P.J., Dedonyte, V., Koehler, A., Balk, L., Schneider, R (2006) Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin.* 74, 235-249.

Segien, P.O. (1983), Inhibitors of lysosomal function. *Meth. Enzymol.*, 96:737-765

Sensi SL & Jeng JM (2004). Rethinking the excitotoxic ionic milieu: the emerging role of Zn²⁺ in ischemic neuronal injury. *Curr Mol Med* 4, 87–111.

Serafim A, Company R, Lopes B, Fonseca VF, Franc S, Vasconcelos RP, Bebianno MJ, Cabra HN (2012) Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems. *Ecolo Indi* 19: 215–225

Serafim MA, Bebianno MJ (2001) Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: sex and seasonal effects. *Environ Toxicol Chem* 20: 544–552

Serafim MA, Bebianno MJ (2001) Variation of metallothionein and metal concentrations in the 844 digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: sex and seasonal effects. *Environ Toxicol Chem* 20: 544–552

Serafim MA, Company RM, Bebianno MJ, Langston WJ (2002) Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Mar Environ Res* 54: 361– 5

Sheehan, D, Power A (1999) Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.* 123, 193– 199.

Shimizu, N., N. Itoh, H. Utiyama and G. M. Wahl (1998). "Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase." *Journal of Cell Biology* 140(6): 1307-1320

Shimizu, N., T. Shimura and T. Tanaka (2000). "Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 448(1): 81-90

Simpson, C.D., Mosi, A.A., Cullen, W.R., Reimer, K.J (1996) Composition and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in surficial marine sediments from Kitimat Harbor, Canada. *Sci. Total Environ.* 181, 265–278.

Siokou-Frangou I., Christaki U., Mazzocchi M. G., Montresor M., Ribera d'Alcalà M., Vaqué D. and Zingone A. (2010): Plankton in the open Mediterranean Sea: a review. *Biogeosciences*, 7, 1543–1586.

Smital T, Sauerborn R, Pivcevic B, Krca S, Kurelec B (2000) Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. *Comp Bioch Physiol C* 126: 175–186

Snyder MJ (2000) Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrate: recent advances and future directions. *Aquat Toxicol* 48: 529–547

Soares-da-Silva, I.M, Ribeiro, J, Valongo, C, Pinto, R, Vilanova, M, Bleher, R, Machado, J (2002) Cytometric, morphologic and enzymatic characterization of haemocytes in *Anodonta cygnea*. *Comp", Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.*, vol. 132, p.541-553

Sokolova IM (2004) Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *J Exp Biol* 207:2639–2648

Solé M (2000) Assessment of the results of chemical analyses combined with the biological effects of organic pollution on mussels. *Trends Anal Chem* 19:1–9

Solé M, Porte C, Albaigés J (1994) Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: its relation with contaminant body burdens. *Aquat Toxicol* 30:271–283

Solé, M., Porte, C., and J. Albaigés (1995). Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environment. Toxic. Chem.* 14, 157-164

Speir TW, Van Schaik, A.P., Percival, H.J., Close, M.E., Pang, L (2003) Heavy metals in soil, plant and groundwater following high-rate sewage sludge application to land, *Water Air Soil Pollut.* 150, 319–358.

Splittergerber AG, Tappel AL (1979) Inhibition of glutathione peroxidase by cadmium and other metals. *Arch Biochem Biophys* 197 : 534-542.

Sprung M. Observations on shell growth and mortality of *Dreissena polymorpha* in lakes. In: Neumann D, Jenner HA, editors. *The zebra mussel Dreissena polymorpha*. *Limnologie Aktuell* Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1992. p. 19–28.

Srarfi F, Shimi N (2004) Evaluation simplifiée des risques : une approche qui s'applique au nord de Tunisie. *Larhyss Journal*, ISSN 1112-3680 (3) pp 185-196.

Stagg RM (1998) The development of an international programme for monitoring the biological effects of contaminants in the OSPAR convention area. *Mar Environ Res*, 46 : 307-313

Staples C, Mihaich E, Carbone J, Woodburn K, Klecka G (2004) A weight of evidence analysis of the chronic ecotoxicity of nonylphenol ethoxylates, nonylphenol ether carboxylates, and nonylphenol. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 10, 999–1017.

Stegeman J.J (1985) Benzo(a)pyrène oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel *Mytilus edulis* and other bivalve mollusc species from the Western North Atlantic. *Mar. Biol.* 89, 21-30

Stegeman, J (1992) Nomenclature for hydrocarbon-inducible cytochrome P450 in fish. *Marine Environmental Research*, 34, 133-138

Stephensen E, Sturve J, Forlin L (2002) Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology* 133 :435-442.

Stock, F., Hoffmann, J., Ranke, J., Stormann, R., Ondruschka, B., Jastorff, B (2004) Effects of ionic liquids on the acetylcholinesterase—a structure–activity relationship consideration. *Green Chem.* 6, 286–290.

Sukhotin AA, Maximovich NV (1994) Variability of growth rate in *Mytilus edulis* L. from the Chupa Inlet (the Withe Sea). *Journal of experimental Marine Biology and Ecology*, 176,15-26.

Sunderman J F.W (1987) Biochemical indices of lipid peroxidation in occupational and environmental medicine. In: Foa, V., Emmett, E.A., Maroni, M., Colomi, A. (Eds.), Occupational and Environmental Chemical Hazards: Cellular and Biochemical Indices for Monitoring Toxicity. Wiley, Interscience, New York, 151–158

Sunderman, FM., Hopfer, A., Zaharia, SM., Reid, MC (1985) Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 15, 229– 236.

Sureda A, Box A, Tejada S, Blanco A, Caixach J, Deudero S (2011) Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain). *Aquat Toxicol* 101: 540-549

Svendsen, C. and Weeks, J. M. (1995) The use of a lysosome assay for the rapid assessment of cellular stress from copper to the freshwater snail *Viviparus contectus* (Millet). *Mar. Poll. Bull.* : 31, 139–42.

Svendsen, C. Spurgeon, D.J. Hankard, P.K. and Weeks, J.M. (2004) A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotox. Environ. Safety*, 57: 20–29.

T

Tanguy A. et Moraga D. (2001) Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? *Gene* 273, 123-30.

Thain JE, Vethaak AD, Hylland K (2008) Contaminants in marine ecosystems: developing an integrated indicator framework using biological-effect techniques. *ICES J Mar Sc* 65:1508–1514

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*;76(9):4350-4.

Trabelsi S, Driss M R, (2005) Polycyclic aromatic hydrocarbons in superficial coastal sediments from Bizerte Lagoon, Tunisia. *Mar Pollu Bul* 50: 344–348

Tsangaris C, Vergolyas M, Fountoulaki E, Nizheradze K (2011) Oxidative stress and genotoxicity biomarker responses in grey mullet (*Mugil cephalus*) from a polluted environment in Saronikos gulf, Greece. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 61: 482–490.

Turner, A., Rawling, M.C. (2002) Sorption of benzo[a]pyrene to sediment contaminated by acid mine drainage: contrasting particle concentration-dependencies in river water and seawater. *Water Research* 36 (8):2011-2019.

U

Uguz C, Iscan M, Erguven A, Isgor B, Togan I (2003). The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Environmental Research* 92 :262-270.

Uluturhan E, Kontas A, Can E (2011) Sediment concentrations of heavy metals in the Homa Lagoon (Eastern Aegean Sea): Assessment of contamination and ecological risks. *Marine Pollution Bulletin* 62 : 1989–1997

UNEP (1999) Manual of recommended biological techniques. Mediterranean action plan. Meeting of experts to review the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP (OCA) / MED WG.132/6, United Nations Environment Programme, Athens, Greece

UNEP/IOC/IAEA: Determination of organotins in environmental samples. Reference Methods for Marine Pollution and Studies No. 59. UNEP, 1994.

V

Valavanidis A, Vlachogianni T, Triantafyllaki S, Dassenakis M, Androutsos, F., Scoullos, M., (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface seawater and in indigenous mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from coastal areas of the Saronikos Gulf (Greece). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 79 , 733–739

Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149

Van der Velde, G, Hermus K, van der Gaag, M., Jenner, H (1992) Cadmium, zinc and copper in the body, byssus and shell of the mussels, *Mytilopsis leucophaeta* and *Dreissena polymorpha* in the brackish noordzeekanaal of the Netherlands. *Limnologie Aktuell*, 2: 213-226.

Varanasi U (1989) Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. CRC Press, Boca Raton, FL, USA

Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Livingstone DR (1991) Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Compar Biochem Physiol* 100:187-190

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

Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A (2007) The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutantinduced stress syndrome in sentinel organisms. *Compar Bioch and Physiol C* 146: 281–300

Viarengo A, Nott J (1993) Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Compar Bioch and Physiol C* 104: 355–372

Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbri R (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar Environ Res* 44: 69– 84

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

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N., Orunesu, M (1990) Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* lam. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 97, 37-42

Viarengo, A., Zanicchi, G., Moore, M.N. & Orunesu, M. (1981) Accumulation and detoxification of copper by the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam.: a study of the subcellular distribution in the digestive gland cells. *Aquatic Toxicology*, 1, 147-157

Víctor M. León *, Rubén Moreno-González, Emilia González, Fulgencio Martínez, Víctor García, Juan A. Campillo (2013) Interspecific comparison of polycyclic aromatic hydrocarbons and persistent organochlorines bioaccumulation in bivalves from a Mediterranean coastal lagoon. *Science of the Total Environment* 463-464 (2013) 975-987

W

Waisberg, M, P. Joseph, B. Hale, D. Beyersmann (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis *Toxicology*, 192, pp. 95-117

Waldmann P, Pivcevic B, Mueller WEG, Zahn RK, Kurelec B (1995) Increased genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism : studies with the fresh water clam *Corbicula fluminea*. *Mutat Res* 342: 113-123

WGBEC 2013: ICES Working group on the Biological Effects of the Contaminants WGBEC report 2013. ICES CM 2013.SSGHIE:04.10-15 march 2013, Spain. 37pp

White, R. H., ME, Lockhart, WL, Stegeman, JJ (1994) Catalytic and immunochemical characterization of hepatic microsomal cytochromes P450 in beluga whale (*Delphinapterus leucas*). *Toxicology Applied Pharmacology*, 126, 45-57

Winston, G.W., Regoli, F., Dugas Jr., A.J., Fong, J.H., Blanchard, K.A (1998) A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radicals Biology and Medicine* 24, 480-493

Wootton A.N., Herring C., Spry J.A., Wiseman A., Livingstone D.R., Goldfarb P.S (1995) Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression (CYP1A) in the mussel *Mytilus* sp. *Mar. Env. Res.* 39, 21-26

Wootton, E.C., Dyrinda, E.A., Pipe, R.K., Ratcliffe, N.A (2003) Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquatic Toxicology*. 65, 13-25.

Wosniok, W., Broeg, K. & Feist, S.W. (2005). Review of the health indices used for the interpretation of data obtained from biological effects monitoring activities and associated research studies using pathology and disease, 2005 WGPDMO Report, Annex 8, 9 p

Y

Yawetz, A., Fishelson, L., Bresler, V., Manelis, R., (2010) Comparison of the effects of pollution on the marine bivalve *Donax trunculus* in the vicinity of polluted sites with specimens from a clean reference site (Mediterranean Sea). *Mar. Pollut. Bull.* 60, 225-229.

Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R., (2002) Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environ. Int.* 28, 215–226.

Yoshida, M., Hamdi, H., Abdunnasser, I., Jedidi, N., (2002) Contamination of potentially toxic elements (PTEs) in Bizerte lagoon bottom sediments, surface sediment and sediment repository. In: Ghrabi, A., Yoshida, M. (Eds.), *Study on Environmental Pollution of Bizerte Lagoon*. INRST-JICA Publishers, Tunisia, pp. 13–48.

Z

Zaja R, Klobucar GIV, Sauerborn Klobucar R, Hackenberger BK, Smital T (2006) Haemolymph as compartment for efficient and non-destructive determination of P-glycoprotein (Pgp) mediated MXR activity in bivalves. *Comp Biochem Physiol C* 143:103–112

Zhang Z, Li X, Vandeppeer M, Zhao W (2006) Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquac* 256: 502-509.

Zinkl G.J., Lockhart W.L., Kenny S.A., Ward F.J (1991) The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. In: Mineau P., editor. *Cholinesterase Inhibiting Insecticides*. Amsterdam: Elsevier; p. 233-254.

Résumé

L'application d'une approche intégrée chimie et biologie permet d'évaluer la qualité environnementale des milieux aquatiques en général et d'une lagune en particulier. La biosurveillance permet d'évaluer les effets dans le temps et dans l'espace de la présence de l'ensemble des contaminants et autres facteurs de stress dans le milieu naturel. L'influence de la température sur la réponse des biomarqueurs a été étudiée dans des conditions expérimentales sur des moules de la lagune de Bizerte exposées à du Benzo(a)pyrène. Des expérimentations *in situ* nous ont permis de suivre les variations des mécanismes biochimiques et physiologiques chez la moule *Mytilus galloprovincialis* provenant de deux sites peu et fortement contaminés de la lagune de Bizerte. Une approche couplant les interactions entre les facteurs abiotiques et biotiques dans l'espace et le temps a permis d'identifier l'élévation de température en période estivale et l'effort de ponte comme paramètres les plus impactant de la réponse métabolique d'adaptation. La réponse métabolique d'adaptation est basée sur un suivi mensuel pendant deux cycles saisonniers, d'une batterie de biomarqueurs d'exposition et d'effet (la benzopyrène hydroxylase, la glutathion S-transférase, les protéines de résistance aux multixénobiotiques, l'acétylcholinestérase, la catalase, le malonedialdéhyde, la stabilité des membranes lysosomales et les cassures des brins d'ADN (test Comet)) et des marqueurs physiologiques (indices de condition et gonadique) sur deux sites peu et fortement contaminés par les métaux lourds, les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les polychlorobiphenyles. L'étude mensuelle sur deux cycles saisonniers a également permis (1) d'appliquer l'indice de réponse biologique (IBR : Integrated Biological Response) pour une interprétation intégrée des biomarqueurs en cas d'exposition chronique et (2) de proposer des seuils sans effets (BAC : Background Assessment Criteria) et des seuils avec effets des contaminants chimiques (EAC : Evaluation Assessment Criteria) dans l'objectif de standardiser l'interprétation des biomarqueurs en surveillance d'une lagune méditerranéenne du nord de la Tunisie.

Mots-clés : approche multi-biomarqueurs ; *Mytilus galloprovincialis* ; variations saisonnières ; milieu lagunaire ; Integrated Biomarker Response ; Background Assessment Criteria ; Environmental Assessment Criteria

Abstract

The assessment of the environmental quality of aquatic ecosystem used an integrated approach of chemistry and biology. The influence of temperature on the Response of biomarkers has been studied in experimental conditions on mussels from the Bizerte lagoon exposed to Benzo [a] pyrene. *In situ* experiments have allowed us to track changes in biochemical and physiological mechanisms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from two little and heavily contaminated Bizerte lagoon sites. Spatial and seasonal variations in a battery of biomarkers were analyzed in relation to environmental parameters. Approach coupling interactions between abiotic and biotic factors in space and time identified the rise in temperature in summer and effort laying the greatest impact as parameters of metabolic adaptive response. The metabolic response of adaptation is based on an monthly monitoring for two seasonal cycles, a battery of effect and exposure biomarkers (benzopyrene hydroxylase, glutathione S-transferase, multixenobiotics resistance, the acetylcholinesterase, catalase, malondialdehyde, the stability of lysosomal membranes and DNA strand breaks (Comet assay)) and physiological markers (condition and gonadic indices) on two sites and some highly contaminated by heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorobiphenils. The monthly survey of two seasonal cycles also allowed (1) to apply the biological response index (IBR : integrated biological response) for an integrated interpretation of biomarkers for chronic exposure and (2) to propose thresholds no effect (BAC : background assessment criteria) and thresholds with effects of chemical contaminants (EAC : Environment assessment criteria) with the aim of standardizing the interpretation of biomarkers in monitoring a Mediterranean lagoon in northern Tunisia.

Keywords: Mussels, biomonitoring, biomarkers, Bizerta lagoon, IBR, EAC, BAC