

UNIVERSITE DE NANTES
UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

UNIVERSITE DE MONASTIR
INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE

ECOLE DOCTORALE V.E.N.A.M

ECOLE DOCTORALE S.B.B.S

Année 2012

N° attribué par la bibliothèque



Approche multi-marqueurs pour l'évaluation de
l'état de santé du golfe de Tunis: Etude des
réponses biochimiques, physiologiques et
cytologiques des mollusques bivalves exposés aux
effluents des oueds

THESE DE DOCTORAT

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé

Discipline : Pharmacie

Spécialité : Ecotoxicologie

Présentée

et soutenue publiquement par

Sofiène TLILI

Le 02 juillet 2012, devant le jury ci-dessous

<i>Président</i>	Mme Dalila SAIDANE-MOSBAHI, Professeur, Université de Monastir
<i>Rapporteurs</i>	Mme Carole COSSU-LEGUILLE, Maître de Conférences-HDR, Université Paul Verlaine, Metz M. Khaled HANI, Professeur, Université de Sousse
<i>Examineur</i>	Mme Aurore VERGNOUX, Maître de Conférences, Université de Nantes
<i>Co-directrice de thèse</i>	Mme Catherine MOUNEYRAC, Professeur, Université Catholique de l'Ouest, Angers
<i>Co-directeur de thèse</i>	M. Hamadi BOUSSETTA, Professeur, Université de Sousse

Avant propos

Ce travail de thèse en cotutelle a été financé pendant la première année par une bourse d'études doctorales de l'Institut Français de Coopération en Tunisie. Au cours de la deuxième et de la troisième année, les travaux ont été financés par une bourse doctorale de l'Agence Universitaire de la Francophonie.

II.1.3.2.4. Limites et critiques à l'égard de l'utilisation des biomarqueurs	53
II.1.3.2.5. Les biomarqueurs pertinents d'un point de vue écologique	55
II.1.3.2.6. L'approche multi-marqueurs	60
II.1.3.2.7. Les indices biomarqueurs	62
II.1.3.2.8. La problématique du lien entre les différents niveaux de l'organisation biologique en surveillance environnementale	65
II.1.3.2.9. La dynamique des populations en biosurveillance: vers une meilleure représentativité écologique ?	67
II.2. Les milieux estuariens et leurs équivalents	68
II.2.1. Concept et évolution des définitions	68
II.2.2. Caractéristiques écologiques et vulnérabilité	69
II.2.3. Les oueds en Tunisie	70
II.2.4. Cas du golfe de Tunis	70
II.3. Utilisation des mollusques bivalves en écotoxicologie	72
<u>CHAPITRE III. Le modèle biologique <i>Donax trunculus</i></u>	78
III.1. Classification	79
III. 2. Caractères Morphologiques	80
III. 3. Anatomie	80
III. 4. Biologie et écologie	82
III. 5. Régime Alimentaire	82
III. 6. Reproduction	83
III. 7. Distribution, abondance sur les côtes tunisiennes et exploitation halieutique	84
III. 8. <i>Donax trunculus</i> en écotoxicologie	86

<u>CHAPITRE IV. Matériel et Méthodes</u>	88
IV.1. Sites d'étude	89
IV.1.1. Le golfe de Tunis	89
IV.1.1.1. Généralités et géomorphologie du golfe	89
IV.1.1.2. Réseau hydrographique	90
IV.1.1.3. Paramètres hydrodynamiques	90
IV.1.1.3.1. Circulation des courants marins	90
IV.1.1.3.2. Les marées	91
IV.1.1.3.3. La houle	91
IV.1.1.4. Caractéristiques physicochimiques	92
IV.1.1.4.1. Température	92
IV.1.1.4.2. Salinité	93
IV.1.1.4.3. Les teneurs en oxygène dissous	94
IV.1.2. Sites sélectionnés	95
IV.1.2.1. Site de Sidi Jehmi	96
IV.1.2.2. Site de Radés Méliane	97
IV.2. Prélèvements : Stratégie d'échantillonnage et préparation des échantillons	100
IV.2.1. Stratégie d'échantillonnage	100
IV.2.2. Prélèvements	101
IV.2.3. Préparation des échantillons	102
IV.2.3.1. Paramètres biométriques et populationnelles	102
IV.2.3.2. Mesures biochimiques	102
IV.2.3.3. Histologie des gonades	102
IV.3. Caractérisation des sites d'étude	103
IV.3.1. Paramètres écologiques	103
IV.3.2. Caractérisation des sédiments	104
IV.3.2.1. Granulométrie	104
IV.3.2.2. Taux de carbonate de calcium	107

**CHAPITRE V. Des variables biochimiques à l'étude de la structure et 109
la dynamique des populations : Cas de deux populations de *Donax
trunculus* originaires de 2 sites différant par leur degré de
contamination dans le golfe de Tunis : Publication 1.**

V.1. Présentation du chapitre	110
V.2. Abstract	113
V.3. Introduction	114
V.4. Materiel and Methods	115
V.4.1. Studied sites	115
V.4.2. Field sampling	116
V.4.3. Biomarker quantification	117
V.4.4. Population structure and dynamics	117
V.4.4. Statistical analysis	118
V.5. Results	118
V.5.1. Ecological parameters	118
V.5.2. Biomarkers	119
V.5.2.1. Temporal variations	119
V.5.2.2. Intersite variations	119
V.5.2.3. Population level	124
V.6. Discussion	128
V.7. Conclusion	131
V.8. Conclusion partielle du chapitre	132

**CHAPITRE VI. Application d'indices intégratifs en biosurveillance : 136
Etude de cas de quatre sites de degrés de contamination différents dans
le golfe de Tunis : Publication 2.**

VI.1. Présentation du chapitre	137
VI.2. Abstract	141
VI.3. Introduction	142
VI.4. Materiel and Methods	144
VI.4.1. Studied sites	144

VI.4.2. Field sampling	145
VI.4.3. Biomarker quantification	146
VI.4.4. Integrated Biomarker Response	147
VI.4.5. Health Status Index	148
VI.4.6. Statistical analysis	148
VI.5. Results	149
VI.5.1. Temporal fluctuations of ecological parameters	149
VI.5.2. Integrated Biomarker Response	149
VI.5.3. Health Status Index	153
VI.6. Discussion	153
VI.7. Conclusion	156
VI.8. Conclusion partielle du chapitre	158
<u>CHAPITRE VII.</u> Combinaison des paramètres de la reproduction (Réserves énergétiques, cycle gamétogénique) et des relations allométriques comme nouvel outil de diagnostic environnemental : Publication 3.	160
VII.1. Présentation du chapitre	161
VII.2. Abstract	167
VII.3. Introduction	168
VII.4. Materiel and Methods	169
VII.4.1. Studied sites	169
VII.4.2. Field Sampling	170
VII.4.3. Energy reserves quantification	171
VII.4.4. Gametogenic cycle and sex ratio	171
VII.4.5. Allometry and Biological index	171
VII.4.6. Statistical analysis	172
VII.5. Results	172
VII.5.1. Gametogenic cycle	172
VII.5.1.1. Temporal variation	172
VII.5.1.2. Inter site variations	174
VII.5.2. Sex ratio	175

VII.5.3. Energy reserves cycle	176
VII.5.3.1. Temporal variation	176
VII.5.3.2. Inter site variations	176
VII.5.4. Condition index and Allometry	178
VII.5.4.1. Condition index	178
VII.5.4.2. Allometry (length-weight relationships)	179
VII.6. Discussion	181
VII.7. Conclusion	185
VII.8. Conclusion partielle du chapitre	186
<u>CHAPITRE VIII.</u> Synthèse générale et perspectives	188
VIII.1. Quelle pertinence de la batterie des biomarqueurs utilisés ?	189
VIII.2. Quel intérêt de l'utilisation d'indices biomarqueurs intégratifs ?	191
VIII.3. Quelles relations entre les réponses des biomarqueurs mesurées à l'échelle sub-individuelle et individuelle et celles au niveau populationnel ?	192
VIII.4. Quelles perspectives ?	201
<u>Références bibliographiques</u>	207

Liste des travaux

Liste des publications issues du master

- **Tlili, S.**, Jebali, J., Banni, M., Haouas, Z., Mlayah, A., Helal, A.N., Boussetta, H., 2010. Multimarker approach analysis in common carp *Cyprinus carpio* sampled from three freshwater sites. **Environmental Monitoring and Assessment**, 168:285–298.

Liste des publications issues de la thèse

- **Tlili, S.**, Métais, I., Boussetta, H., Mouneyrac, C., 2010. Linking changes at sub-individual and population levels in *Donax trunculus*: assessment of marine stress. **Chemosphere**, 81, Issue 6: 692-700.
- **Tlili, S.**, Métais, I., Ayache, N., Boussetta, H., Mouneyrac, C., 2011. Is the reproduction of *Donax trunculus* affected by their sites of origin contrasted by their level of contamination? **Chemosphere**, 84, Issue 10: 1362-1370.
- **Tlili, S.**, Boussetta, H., Mouneyrac, C. Biomarker indices for the assessment of the health status of the marine bivalve *Donax trunculus* along the Gulf of Tunis (Tunisia). *Soumise à Science of the Total Environment*.

Liste des communications issues de la thèse

- **Tlili, S.**, Boussetta, H., Mouneyrac. , 2011. Evaluation du risque environnemental de l'exposition chronique de populations naturelles de mollusques bivalves à des effluents urbains : étude de la perturbation de la reproduction chez *Donax trunculus* dans le golfe de Tunis. **In : Colloque national de l'ANCSEP : Contaminants, Environnement et Santé- CES1. Hammamet, Tunisie, 20-21 Décembre 2011.**
- **Tlili, S.**, Minguéz, L., Boussetta, H., Mouneyrac. , 2011. From biomarker responses to integrated health index: a comparative study for the ecotoxicological risk assessment of *Donax trunculus* in the Gulf of Tunis. **In: Tunisian Japanese Symposium on Science, Society and Technology, Hammamet, Tunisia, 11-13 November 2011, (Prix du meilleur poster).**
- **Tlili, S.**, Métais, I., Boussetta, H., Mouneyrac, C., 2011. Is the reproduction of *Donax trunculus* affected by their sites of origin contrasted by their level of contamination? **SETAC 21th Annual Meeting (Society of Environmental Toxicology and Chemistry), Milan, Italy, 15-19 May 2011.**
- **Tlili, S.**, Métais, I., Boussetta, H., Mouneyrac, C., 2010. Linking changes at sub-individual and population levels in *Donax trunculus*: assessment of marine stress. **In: SETAC 20th Annual Meeting (Society of Environmental Toxicology and Chemistry), Sevilla, Spain, 23-27 May 2010.**
- **Tlili, S.**, Métais, I., Boussetta, H., Mouneyrac, C., 2010. Validation *in situ* d'une batterie de biomarqueurs chez le flion tronqué (*D. trunculus*) dans le Golfe de Tunis. **In : V^{ème} congrès international QPE-TV R Qualité des Produits et de**

l'Environnement : Traitement et Valorisation des Rejets, Mahdia, Tunisie, 9-11 Avril 2010.

- **Tlili, S., Métais, I., Boussetta, H., Mouneyrac, C., 2010. Mise en évidence de la relation entre les réponses infra individuelles et populationnelles chez *D.trunculus*. : Evaluation des réponses à différents niveaux d'organisation biologique. In : **21^{ème} forum des Sciences Biologiques de l'ATSB, Mahdia, Tunisie, 15-18 Mars 2010.****
- **Tlili, S., Boussetta, H., Mouneyrac, C., 2009. Approche multi- marqueur à différents niveaux de l'organisation biologique chez le mollusque bivalve *Donax trunculus* originaire de différents sites du Golfe de Tunis. In : **Colloque International sur le thème Toxicologie Environnementale et Agroalimentaire dans l'Espace Francophone, Sousse, Tunisie, 8-11 Novembre 2009.****

Liste des Figures

Figure 1 : Schéma conceptuel illustrant la méthodologie adoptée pour mettre en évidence la cascade des effets du stress chimique à différents niveaux d'organisation biologique.

Figure 2 : Prototypes de différents échantillonneurs passifs. (A) : capteur type SPMD (Semi-Permeable Membrane Device) adaptés pour la mesure des Pesticides organochlorés, HAPs, PCBs ; (B) : capteur type SPME (Solid Phase Microextraction) adaptés pour les contaminants hydrophobes et polaires ; (C) : capteur polaire : POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) adaptés pour la mesure des herbicides, stéroïdes et les produits pharmaceutiques ; (D) : capteur type DGT (Diffusive Gradient in Thin-films) pour les métaux traces ; (E) : Stir Bar Sorptive Extraction : SBSE pour les contaminants organiques hydrophobes (HAPs, PCBs...) (Photos IFREMER).

Figure 3 : Représentation schématique des différents paramètres mesurables à différents niveaux d'organisation biologique pour évaluer l'état de santé des écosystèmes aquatiques (Lagadic et al., 1997).

Figure 4 : Représentation de l'ordre chronologique des différentes atteintes induites au sein de l'organisation des systèmes biologiques (Van Der Oost et al., 2003, modifié).

Figure 5 : Réponse d'une batterie de biomarqueurs couvrant les différents niveaux d'organisation biologique (Dagnino et al., 2007).

Figure 6: Organisation, propriétés et aspect chronologique des réponses biologiques aux stress induits par l'exposition à la pollution (Adams et al., 1989, modifié).

Figure 7: *Donax trunculus* (Linnaeus, 1767) (Photos INSTM).

Figure 8 : Morphologie des coquilles de *Donax trunculus* (FAO, 1987).

Figure 9 : Répartition spatiale de l'abondance (A) et de la biomasse (B) de *D. trunculus* dans le golfe de Tunis (INSTM, 2005).

Figure 10: Distribution géographique des indices d'abondance de *Donax trunculus* dans la partie marine du golfe de Gabès : (A) : nombre d'individus, (B) : Biomasse (INSTM, 2005).

Figure 11 : Distribution horizontale de la température de surface dans le golfe de Tunis (campagne effectuée en été 2002) (Zarrad et al., 2004).

Figure 12 : Distribution horizontale de la salinité des eaux de surface dans le golfe de Tunis (Zarrad et al., 2004).

Figure 13 : Distribution horizontale des teneurs en oxygène dissous en surface de l'eau dans le golfe de Tunis (Zarrad et al., 2004).

Figure 14 : Localisation des sites d'études dans le golfe de Tunis (1) : Sidi Jehmi, (2) : Radès Méliane (Images Google Earth, modifiées).

Figure 15 : La plage sableuse de Sidi Jehmi (photo S.Tlili).

Figure 16 : Site de Radès Méliane. (A) : Partie sableuse de la Plage de Radès Méliane, (B) : Eaux grises stagnantes en aval de la plage du site Radès Méliane, (C) : Station d'épuration Sud Méliane, (D) : Embouchure de l'Oued Méliane au niveau de la plage de Radès, (E) : Oued Méliane, (F) : Eaux grises se déversant dans l'embouchure (Photos S.Tlili).

Figure 17: Diagramme illustrant la stratégie d'échantillonnage adoptée.

Figure 18: Plan de collecte sur le terrain (exemple d'une campagne d'échantillonnage au niveau de l'estuaire de l'oued Méliane) (Photo S.Tlili).

Figure 19 : Histogrammes des fréquences des diamètres des grains de sédiments au niveau des sites d'études : (A) : Sidi Jehmi ; (B) : Radès Méliane.

Figure 20: Temporal variations (means±S.D) of biomarkers (AChE: A; GST: B; Catalase: C; TBARS: D; LDH: E; MTs: F) in *D. trunculus* collected from two sites in the Gulf of Tunis. Same letters indicate a significant statistical difference between sampling periods.

Figure 21: Annual mean values of AChE (A), GST (B), Catalase (C), TBARs (D), LDH (E) and MTs (F) activities in *D.trunculus* collected from the two studied sites. White bars: Sidi Jehmi, black bars: Radès Méliane. * Indicates an intersite statistical difference.

Figure 22: Bimonthly length frequency distributions from specimens collected between November 2008 and October 2009 from Sidi Jehmi.

Figure 23: Bimonthly length frequency distributions from specimens collected between November 2008 and October 2009 from Radès Méliane.

Figure 24: Pattern of shell growth of five cohorts between November 2008 and October 2009 determined from bimonthly progression of mean size of each cohort. A: Sidi Jehmi site (● Cohort A1, ■ Cohort A2, ▲ Cohort A3, ◆ Cohort A4, × Cohort A5). B: Radès Méliane (▲ Cohort B1, ■ Cohort B2, ◆ Cohort B3, ● Cohort B4).

Figure 25: Sites d'étude (A) : Plage de Sidi Jehmi, (B) : Estuaire de l'oued Medjerda au niveau de la plage de Kalaât El Andalous, (C) : Plage de Radès Plage, (D) : Eaux grises de l'oued Méliane, (E) : Estuaire de l'oued Méliane, (F) : Centrale thermique au niveau de Radès Plage, (A-E : Photos S.Tlili ; F : www.images de Tunisie.com).

Figure 26: Map of the studied sites in the Gulf of Tunis, Tunisia. 1: Sidi Jehmi (S.J), 2: Kalaât El Andalous (K.A), 3: Radès Plage (R.P), 4: Radès Méliane (R.M).

Figure 27: Annual IBR/n values calculated in *Donax trunculus* collected from four sites in the Gulf of Tunis. Mean and standard deviation calculated for IBR values obtained using all possible arrangements for biomarkers within each set. Same letters indicate a significant statistical difference between studied sites.

Figure 28: Star plots graphics representing the temporal variation of the integration of the set of biomarkers used in *Donax trunculus* collected in four sites in the Gulf of Tunis.

Figure 29 : Coupe de la gonade féminine et masculine de *Donax trunculus*, à différents stades de la gamétogenèse, et colorée à l'hématoxyline-éosine : (A) : Individu femelle, début de gamétogenèse. Apparition d'acini de taille réduite à l'intérieur desquels on distingue des ovogonies. CI : cellules indifférenciées ; OG : ovogonies. (B) : Stade de gamétogenèse de gonade femelle. OA : ovocyte adhérent ; OG : ovogonies ; OV : ovocyte vitellogénique ; TC : tissu conjonctif (C) : Stade de maturation de gonade femelle. Les ovocytes acquièrent une forme polygonale. Le tissu conjonctif est rétréci en faveur des follicules en développement. (D) : Stade d'émission gamétique de gonade femelle. OR : ovocyte résiduel. (E) et (F) : individu immature. Des acini de taille réduite renfermant des gonies. G : gonies. A ce stade, le sexe de l'animal est indéfinissable. (G) et (H) : Stade de gamétogenèse de gonade mâle. SPG :

spermatogonies ; SPZ : spermatozoïdes. (I) : Stade de maturation de gonade mâle: gonade mâle mature avec des follicules étouffés et quasi absence de tissu conjonctif. (G) : Stade d'émission gamétique de gonade mâle. Images prises à l'aide du logiciel de capture d'images « ImageJ 1.45 » (A, B, C, D, E, I et J : échelle de 100µm ; Fet H : échelle de 50 µm).

Figure 30: Sexual maturation with partitioning expressed in percent between each observed development stages of gonads and sexual maturity index (SMI) from *D. trunculus* collected in Sidi Jehmi (A) and Radès Méliane (B) from November 2008 to October 2009. $SMI = \sum (\% \text{ of each sexual state} \times \text{maturity factor})$. Each stage was categorized by a maturity factor (0, spent; 1, undifferentiated; 2, developing; 3, mature; 4, spawning).

Figure 31: Temporal variations (means±S.D) of energy reserves (Glycogen: A, Lipids: B) in *D. trunculus* collected from November 2008 to October 2009 in the Sidi Jehmi (●) and the Radès Méliane (■) sites in the Gulf of Tunis. Same letters indicate a significant statistical difference between sampling periods.

Figure 32: Temporal variations (means±S.D) of condition index (CI) in *D. trunculus* collected from November 2008 to October 2009 in the Sidi Jehmi (●) and the Radès Méliane (■) sites in the Gulf of Tunis. Same letters indicate a significant statistical difference between sampling periods.

Figure 33: Allometry relationships (A: Length-Total weight in S.J, B: Length-Total weight in R.M, C: Length-Wet weight in S.J, D: Length-Wet weight in R.M, E: Length-Dry weight in S.J, F: Length-Dry weight in R.M, G: Length-Shell weight in S.J, H: Length-Shell weight in R.M) in *D. trunculus* collected from the Sidi Jehmi and the Radès Méliane sites in the Gulf of Tunis.

Figure 34: (A) : Cercle de corrélation obtenu après Analyse en Composantes Principales des données issues des résultats des différents niveaux d'organisation biologique étudiés. (B) : Cartes factorielles obtenues après Analyse en Composantes Principales des données issues des résultats des différents niveaux d'organisation biologique étudiés. Ellipse bleu : Site Sidi Jehmi, Ellipse rouge : Site Radès Méliane.

Figure 35: Cascade des réponses à différents niveaux d'organisation biologique observés chez *D. trunculus* suite à une exposition chronique au stress chimique.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de travaux de biosurveillance utilisant diverses espèces de mollusques bivalves marins.

Tableau 2 : Principales sources de pollution et nature des rejets au niveau du site Radès Méliane (Ben Charrada, 1997; Hamrouni, 2006; Chouba, 2009; Tlili, observation personnelle).

Tableau 3 : Paramètres écologiques des sites d'étude en fonction des périodes d'échantillonnage.

Tableau 4 : Classification des particules sédimentaires selon la taille (Ibouily, 1981).

Tableau 5 : Classification d'Ibouily (1981) indiquant le taux d'envasement des sédiments.

Tableau 6 : Résultats de la répartition des principales fractions sédimentaires et la nature des sédiments prélevés des sites d'étude (S.J et R.M) selon la classification d'Ibouily (1981).

Tableau 7: Moyenne du taux de carbonate de calcium dans les sédiments superficiels des sites étudiés (S.J et R.M).

Table 8: Temporal fluctuations of ecological parameters (salinity, temperature). (S.J: Sidi Jehmi; R.M : Radès Méliane).

Table 9: Significance of differences in biomarker values between sampling stations (S.J: Sidi Jehmi; R.M: Radès Méliane) as a function of sampling dates (*p* values).

Table 10: Growth rate (mm/month) of cohorts from the two studied sites (A5 is a new cohort appeared at the end of the study, calculation of growth rate was impossible).

Table 11: Temporal fluctuations of ecological parameters (salinity, temperature) in the studied sites (S.J: Sidi Jehmi; K.A: Kalaât El Andalous, R.P: Radès Plage; R.M: Radès Méliane).

Table 12 : Stress levels of *Donax trunculus* collected from four sites in the Gulf of Tunis (S.J, K.A, R.P, R.M) from Nov 2008 to Oct 2009 according to the HSI (A : Healthy, C : medium stress).

Table 13: Percentages of male and female *Donax trunculus* collected bimonthly from November 2008 to October 2009 from two sites in the Gulf of Tunis: Sidi Jehmi and Radès Méliane.

Table 14: Intersite comparison of length-weight (Total weight, Wet weight, Dry weight and Shell weight) linear regressions after logarithm transformation (S.J: Sidi Jehmi, R.M: Radès Méliane).

Liste des abréviations

ACh : Acétylcholine
AChE : Acétylcholinestérase
ACP : Analyse en composantes principales
ADN : Acide désoxyribonucléique
ANOVA : Analyse de variance
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
BSA : Albumine Bovine Sérique
Cat : Catalase
Cd : Cadmium
CDNB : 1-chloro-2,4 dinitrobenzène
Cs : Carbamates
Cu : Cuivre
CYP 450 : Cytochrome P450
Cys : Résidu cystéine
DO : Densité optique
DTNB : 5-5'-dithio-bis (2-nitrobenzoate)
EDTA: Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique
FAO : Food and Agriculture Organisation (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture)
GFAAS : Absorption atomique avec atomisation en four graphite
GSH : Glutathion réduit
GST: Glutathion -S-Transférase
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCl : Acide chlorhydrique
Hg : Mercure
HNO₃ : Acide nitrique
HSI : Health Status Index
IBR : Integrated Biomarker Index
IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
INSTM : Institut National des Sciences et Technologies de la Mer, Tunisie.
KCl : Chlorure de potassium
K Da : Kilo Daltons
l : Litre
LDH: Lactate Déshydrogénase
MED-POL: Monitoring and Research Programme of the Mediterranean Action Plan (Plan d'Action pour le Programme de Surveillance et de Recherche en Méditerranée)
mg : Milligramme
min : Minute
ml : Millilitre
mM : Millimolaire
MTs : Méthallothionéines
Ni : Nickel
nmol: nano mole
OH° : Radical hydroxyl
OPs : Organophosphorés
Pb : Plomb
PCB: Polychlorobiphényles
PE : Perturbateurs endocriniens
pH: Potentiel hydrogène
PM : Poids moléculaire
PMSF: Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluoride
SAA : Spectrophotométrie d'absorption atomique
SD : Standard Deviation (Ecart Type)
SH : Groupement thiol

TBARs: Thiobarbituric acid reactive substances (Taux des Substances Réagissant avec l'Acide Thio barbiturique).

TH : Thiocholine

TNB : Thionitrobenzoate

Tris : Tris-(hydroxyméthylamino-méthane)

WHO : World Health Organisation (OMS : Organisation Mondiale de la Santé)

Zn : Zinc

µg : Microgramme

µl : Microlitre

% : Pourcent

°C : Degré Celsius

λ : Longueur d'onde

Δ DO : Variation de la densité optique par minute



***Chapitre I. Introduction
générale***

Chapitre I. Introduction générale

I.1. Contexte général et problématique

Les zones d'interférences; milieu hydrique continental/milieu marin jouent un rôle primordial dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques compte tenu de leur productivité biologique importante. Les estuaires sont des zones de haute productivité biologique. A titre indicatif, les estuaires et les littoraux océaniques fournissent 50% de la production halieutique mondiale alors qu'ils ne représentent que 8% du milieu marin (Kennish, 1999). La production primaire nette des zones estuariennes serait de $1,5 \text{ kg.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ pour une biomasse moyenne de 1 kg.m^{-2} (Dayton et al., 2005). Cependant, elles sont caractérisées par une vulnérabilité accrue envers les agressions environnementales dues principalement aux stress naturels (température, salinité...) et chimiques (pollution, urbanisation intensive...). Face à la dégradation de la qualité des écosystèmes marins (côtiers, estuariens, lagunaires...), des programmes de recherche et de développement ont été initiés afin d'unifier les efforts de recherche, standardiser les méthodes et surtout proposer des mesures de préservation et de réglementations. Parmi ces programmes, figurent le réseau ROCCH (Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du milieu marin) piloté par l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer), le réseau MEDPOL (Programme des Nations Unis pour l'Environnement, Plan d'Action pour la Méditerranée pour la Convention de Barcelone), la convention OSPAR (Oslo-Paris) pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est. Les évolutions de la Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE (DCE) initiée en 2000 par l'Union Européenne ont généré en 2008 la directive cadre « stratégie pour le milieu marin » (2008/56/CE). En Tunisie, bien que concernée par le programme MEDPOL, la quasi majorité des travaux sur l'état de l'environnement marin a été effectuée dans le cadre de recherches des institutions universitaires ou de recherche publique telles que l'INSTM (Institut National des Sciences et Technologies de la Mer). Les efforts mis en œuvre pour former un premier « réseau national de surveillance » ont été plus au moins dispersés entre les différentes institutions concernées (e.g. Ministère de la Santé Publique, Ministère de l'Agriculture et l'Environnement, Agence Nationale de Protection de l'Environnement, les Unités de Recherches universitaires...).

Par définition, dans les régions semi arides et arides, comme c'est le cas en Tunisie, un cours d'eau temporaire est dénommé « oued ». D'un point de vue géomorphologique, un oued est une dépression, dans les montagnes et/ou dans les plaines de gravier ou de zones de dunes,

provoquée par des processus naturels tels que le mouvement de la surface de la terre et les intempéries. Au niveau du golfe de Tunis, qui a une grande importance socio-économique et écologique, viennent se déverser quatre oueds : L'oued Mejreda, l'oued Méliane (qui sont les oueds les plus importants du point de vue hydrologique), l'oued Bezirk et l'oued Soltane. Les décharges permanentes d'effluents urbains, industriels et agricoles y drainent ainsi des quantités importantes de mixtures de polluants de divers types tels que des métaux traces, des résidus phytosanitaires, des polychlorobiphényles (PCBs) et des quantités importantes d'éléments minéraux (Ben Charrada, 1997; Rais, 1999; Masmoudi et al., 2007).

L'exposition chronique des peuplements benthiques marins, notamment les mollusques bivalves, aux effluents des oueds au niveau de leurs embouchures dans la mer, peut provoquer diverses perturbations susceptibles d'affecter les différents niveaux de l'organisation biologique (sub-individuel, individuel, population, communauté). Ainsi, l'équilibre écologique de l'écosystème dans son ensemble est menacé, voire en danger.

L'étude de l'état de santé des écosystèmes aquatiques repose sur deux approches complémentaires : l'analyse chimique de différents polluants environnementaux comme les pesticides, les métaux lourds, les PCBs, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les dioxines..., et l'étude des effets des contaminants à différents niveaux d'organisation biologique. La démarche actuellement préconisée au niveau international pour déterminer dans quelle mesure les stress naturels et chimiques peuvent affecter l'intégrité des populations est basée sur le contrôle des biomarqueurs au sein des populations exposées. Depledge a proposé en 1994 une définition qui fait toujours autorité (citée 118 fois selon Web of Science) : « un biomarqueur est défini comme étant toutes les variations biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementales qui peuvent être mesurées dans les tissus ou des fluides corporels ou au niveau des organismes entiers qui révèlent de l'exposition et / ou des effets de l'un ou plusieurs polluants chimiques (et / ou des radiations) ».

Plusieurs biomarqueurs moléculaires, cellulaires, biochimiques, physiologiques et comportementaux ont été proposés. Ils ont été tout d'abord classés en biomarqueurs d'exposition, biomarqueurs d'effets et biomarqueurs de vulnérabilité (National Research Council of the United States of America :NRC, 1987). De La Lafontaine et al. (2000) a proposé leur classification en biomarqueurs de défense et biomarqueurs de dommage. Cette classification est désormais adoptée par plusieurs écotoxicologistes.

Un diagnostic complet de la qualité de l'environnement ne peut reposer sur une seule variable biologique. Les informations fournies par différents biomarqueurs sont ainsi complémentaires et l'approche « multi-marqueurs » est dorénavant préconisée et employée par tous les spécialistes de l'écotoxicologie pour la biosurveillance des milieux (Amiard & Amiard-Triquet, 2008). Parmi les biomarqueurs conventionnels étudiés, les métallothionéines (MTs); protéines fonctionnelles de l'homéostasie des métaux essentiels (e.g. Cuivre, Zinc) et de la détoxification des métaux lourds toxiques (e.g. Cadmium, Plomb) sont utilisées comme biomarqueurs d'exposition aux polluants métalliques (Amiard et al., 2006 ; Viarengo et al., 2007). L'inhibition de l'activité des cholinestérases; enzymes impliquées dans la transmission de l'influx nerveux, est de plus en plus recommandée comme biomarqueur d'exposition aux composés neurotoxiques tels que les pesticides organophosphorés et carbamates, mais cette enzyme peut être également inhibée par certains métaux traces, des produits phytosanitaires de synthèse, des produits pétroliers et certaines toxines algales (Payne et al., 1996; Guilhermino et al., 1998; Lehtonen et al., 2003; Tim-Tim et al., 2009). Le stress oxydant résulte de l'accumulation des radicaux libres dans la cellule pouvant engendrer des effets génotoxiques et cytotoxiques variés : une inactivation enzymatique, une dégradation des protéines, un dommage à l'ADN et une mort cellulaire (Livingstone et al., 2001). Les xénobiotiques impliqués dans la production du stress oxydant cellulaire sont nombreux (e.g. métaux, PCBs, HAPs..). L'accumulation des lipides neutres, l'évaluation du contenu des lipofuscines, l'activité catalase (Cat), le taux des substances réagissant avec l'acide Thio barbiturique « Thiobarbituric acid reactive substances » (TBARs) et certaines enzymes de phase I et II (Glutathion-S transférase : GST, Ethoxy Resorufine O Deethylase : EROD, superoxydes dismutases : SOD...) sont reconnus comme biomarqueurs de stress oxydant (Cossu et al., 1997 ; Koehler, 2004 ; Nigro et al., 2006 ; Dagnino et al., 2007 ; Bergayou et al., 2009). La stabilité de la membrane des lysosomes (SML) est considérée comme une réponse des organismes aux facteurs de stress biotique et abiotique et également à l'exposition à des cocktails de polluants (Ferreira & Dolder, 2003 ; Viarengo et al., 2007). Considérée comme un excellent marqueur de stress général, la SML a été validée et appliquée également dans plusieurs études *in situ* chez une grande variété d'espèces sentinelles dont les mollusques bivalves (Einsporn et al., 2005; Schiedek et al., 2006).

Exposés à un stress naturel ou chimique, les organismes réagissent par la mise en place d'un nouvel état physiologique afin de maintenir l'homéostasie. Si les effets du stress dépassent

l'homéostasie, des dommages cellulaires peuvent avoir lieu et des mécanismes de réparation s'activent (Mouneyrac et al., 2011). Les marqueurs physiologiques reflétant le statut bioénergétique de l'animal permettent une meilleure compréhension de l'effet du stress environnemental à l'échelle individuelle. L'allocation différentielle de l'énergie pour le métabolisme de base, la croissance et la reproduction peuvent être modifiées en réponse à des changements des conditions environnementales comme l'exposition à des contaminants (Cohen & Janssen, 2003; Smolders et al., 2004; Voets et al., 2006).

Les indices biologiques (e.g. Indice de Condition, Indice Gonadosomatique, Indice Hépatosomatique) sont également d'un grand intérêt en raison des informations complémentaires qu'ils peuvent donner sur l'état de santé général des organismes (Mouneyrac et al., 2008).

Parmi les différents organismes aquatiques, les mollusques bivalves sont reconnus pour être d'excellentes espèces sentinelles du milieu, compte tenu notamment de leur sédentarité, leur large distribution géographique, leur facilité d'échantillonnage et de maintien au laboratoire ainsi que leur pouvoir bioaccumulateur des xénobiotiques (Narbonne & Michel, 1997 ; Cajaraville et al., 2000, Rank et al., 2005 ; Viarengo et al., 2007, Zorita et al., 2007, Berthet, 2008).

Donax trunculus, est un mollusque lamellibranche, abondant et représentatif des côtes sableuses des deux rives de la Méditerranée (Roméo & Gnassia-Barelli, 1988; Fishelson et al., 1999; Moukrim et al., 2004; Neuberger-Cywiak et al., 2007; Tlili et al., 2010, 2011). La production mondiale de *D.trunculus* a été estimée à 975 tonnes en 2008 (Statistiques FAO, 2010) dont 596 tonnes ont été capturées en Atlantique Nord, 347 tonnes en Méditerranée et en Mer Noire et seulement 32 tonnes en Atlantique Sud. Le Portugal demeure le premier pays producteur (588 tonnes) de ces bivalves dénommés « tellines » (Statistiques FAO, 2010).

Ce travail de thèse permettra d'une part de contribuer activement à la caractérisation de la réponse de biomarqueurs chez cette espèce (*D. trunculus*) et d'autre part, de participer à l'estimation de l'état de santé de l'environnement côtier du golfe de Tunis.

Parmi les différentes substances toxiques rencontrées dans l'environnement, une attention particulière dans ce travail sera accordée aux effets des substances à caractère perturbateur endocrinien (PE) sur la reproduction de *D. trunculus*. Depuis quelques années, la présence de PE dans les écosystèmes est devenue une préoccupation majeure en écotoxicologie. En effet, les effets biologiques induits par les PE vont des réponses primaires moléculaires et

cellulaires aux réponses secondaires tissulaires, morphologiques ou comportementales qui affectent la reproduction des individus et par conséquent mettent en péril le maintien des populations, des communautés et de l'écosystème dans son ensemble (Stentiford & Feist, 2005 ; Lafont & Mathieu, 2007).

In situ l'occurrence de ces xénobiotiques en milieu aquatique a été initialement associée aux rejets de stations d'épuration (Crain et al., 1997; Hashimoto et al., 2000; Noaksson et al., 2001). Les substances les plus incriminées étant des hormones stéroïdiennes (Whitehead & Rice, 2006). L'étude de la disponibilité et de l'effet de ces composés PE sur les vertébrés aquatiques, en particulier les poissons, a fait l'objet de nombreux travaux de recherches (Gimeno, 1998 ; Matthiessen, 2003 ; Langston et al., 2005). En revanche, peu d'études sur l'impact des PE ont concerné les invertébrés alors qu'ils constituent plus de 95 % des espèces vivantes et jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques (Barnes, 1987; Wilson, 1999). L'une des principales difficultés des recherches concernant l'effet des PE chez les invertébrés aquatiques, notamment les mollusques lamelibranches, résulte en partie du fait que leur système hormonal est peu connu par rapport à celui des vertébrés (Le Blanc, 1999 ; Lafont & Mathieu, 2007 ; Ketata et al., 2008), ce qui limite d'autant plus le développement de biomarqueurs spécifiques de cette classe de contaminants (Oetken, 2004 ; et littérature citée). La caractérisation et le développement de biomarqueurs de l'impact des PE sur les mollusques à l'échelle sub-individuelle et individuelle et leur conséquence sur la structure des populations s'avèrent un des défis majeurs de l'écotoxicologie, à la fois pour le diagnostic dans les milieux aquatiques mais aussi pour la prévision du danger potentiel.

Dans les programmes de biosurveillance, il s'avère utile de mettre en relation les effets des stress chimiques à différents niveaux d'organisation biologique. Une telle approche permettra de mieux comprendre l'effet de perturbations observées à l'échelle moléculaire, cellulaire et individuelle à un niveau plus pertinent d'un point de vue écologique (niveau populationnel notamment).

I.2. Objectifs de la thèse

Les objectifs majeurs de cette thèse sont :

1. Estimer l'état de santé du golfe de Tunis au niveau des zones des embouchures des oueds à travers une approche multi-marqueurs, moyennant une combinaison de biomarqueurs de défense (GST, Cat, MTs) et de dommage (AChE, TBARs, Lactate Déshydrogénase: LDH) chez un mollusque bivalve sentinelle des côtes sableuses *D. trunculus*, originaire de sites qui diffèrent par leur degré de contamination; au cours d'un cycle annuel (échantillonnage bimensuel de novembre 2008 à octobre 2009).
2. Etablir les éventuelles relations entre la réponse des bivalves à l'échelle (sub-)individuelle (biomarqueurs) et les réponses à l'échelle populationnelle (étude de la structure et la dynamique des populations de *D. trunculus*).
3. Intégrer les différents résultats issus du suivi spatio-temporel d'une batterie de biomarqueurs dans deux indices intégrateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques afin de modéliser et valider la réponse des biomarqueurs chez *D. trunculus*. Cette conversion des réponses biochimiques individuelles en indices intégratifs permettra de simplifier les relations parfois difficiles à interpréter et pouvant présenter un outil de gestion environnementale efficace et simple à utiliser.
4. Etudier les éventuelles perturbations des paramètres de la reproduction (sex-ratio, cycle gamétogénique, cycle des réserves énergétiques) et des indices biologiques (indice de condition, relations allométriques).

La figure 1 illustre la méthodologie adoptée dans ce travail afin de répondre aux différents objectifs proposés.

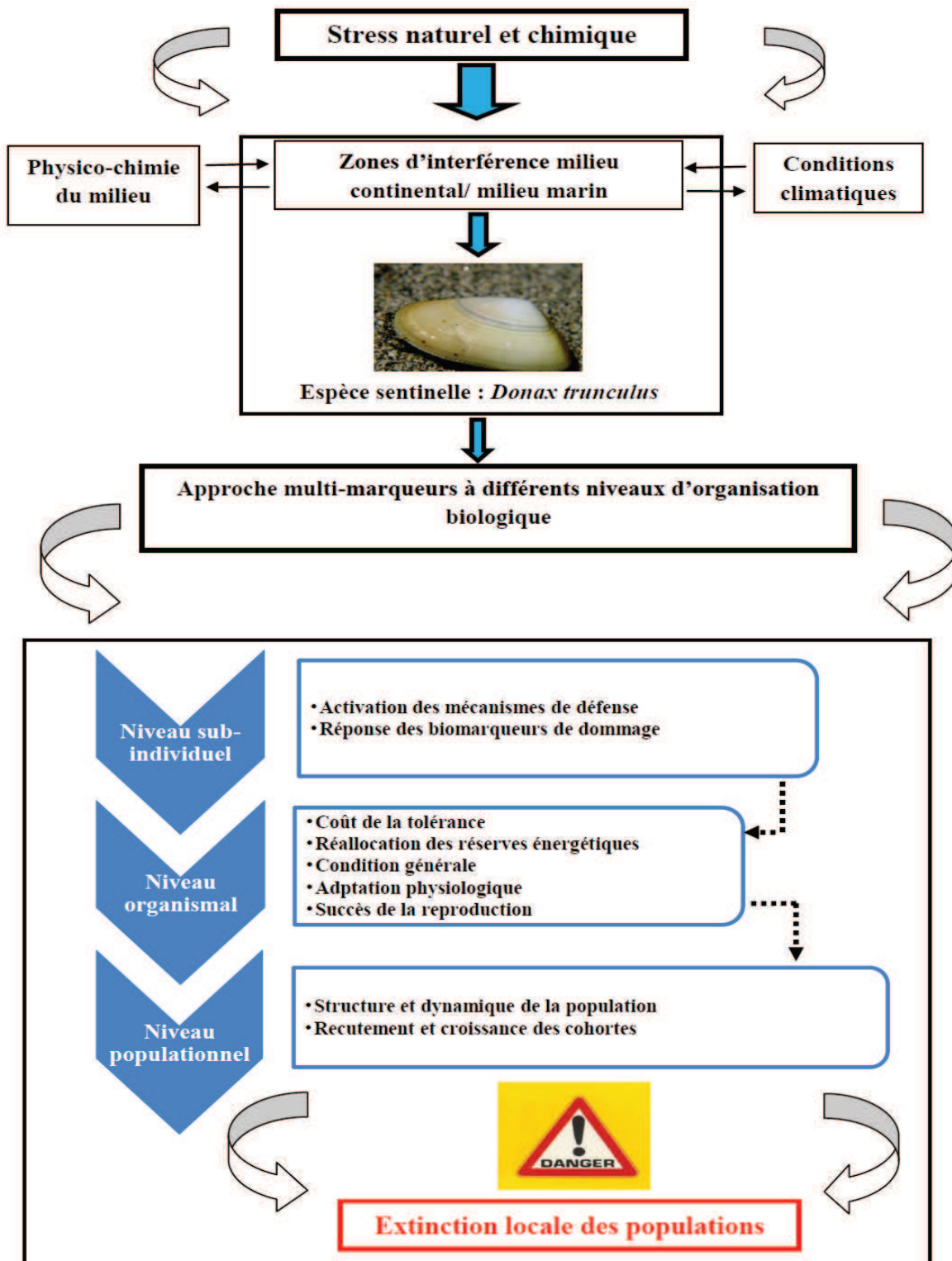


Figure 1 : Schéma conceptuel illustrant la méthodologie adoptée pour mettre en évidence la cascade des effets du stress chimique à différents niveaux d'organisation biologique.

Afin d'atteindre ces différents objectifs, le manuscrit de la thèse est organisé de la manière suivante :

Un deuxième chapitre est consacré à une synthèse bibliographique présentant un état de l'art concernant l'évolution du concept de la biosurveillance, les outils du diagnostic environnemental, la spécificité environnementale des milieux estuariens et des oueds en Tunisie, et l'utilisation des mollusques bivalves en tant qu'espèces sentinelles en écotoxicologie aquatique.

Un troisième chapitre est consacré au modèle biologique utilisé dans ce travail : le mollusque bivalve *D. trunculus*.

Dans *un quatrième chapitre* « Matériels et Méthodes », les caractéristiques des sites d'étude, la méthodologie d'échantillonnage ainsi que les différentes techniques et méthodes utilisées seront décrites.

Les résultats de ce travail, seront présentés tout d'abord au cours d'un *cinquième chapitre* qui a pour objectif d'étudier le lien entre des réponses sub-individuelles (biomarqueurs) et populationnelles (structure et dynamique des populations) chez *D. trunculus* originaires de deux sites fortement contrastés par leur degré de contamination. Cette étude combine un suivi spatio-temporel de la réponse d'une batterie de biomarqueurs à l'étude des réponses de la structure et de la dynamique des populations de *D. trunculus*. Ce suivi a été réalisé par une étude *in-situ* dans les deux sites sélectionnés (Sidi Jehmi et Radès Méliane), différant par leur degré de contamination, durant une année à raison d'une campagne d'échantillonnage bimensuelle (de novembre 2008 à octobre 2009).

Ces travaux ont été publiés dans le journal Chemosphere (**Publication 1**):

- S. Tlili, I. Métais, H. Boussetta & C. Mouneyrac. (2010). Linking changes at sub-individual and population levels in *Donax trunculus*: assessment of marine stress. Chemosphere 81, Issue 6: 692-700.

Un sixième chapitre sera consacré à l'intégration des données issues du suivi spatio-temporel des différentes réponses d'une batterie de biomarqueurs de défense et de dommage dans des modèles mathématiques en appliquant des indices intégratifs des réponses des biomarqueurs. Les modèles sélectionnés sont l'IBR (Integrated Biomarker Response), et le HSI (Health

Status Index). Les bivalves (*D. trunculus*) étaient originaires de quatre sites de degrés de contaminations différents dans le golfe de Tunis et ont été collectés durant un an tous les deux mois (de novembre 2008 à octobre 2009).

- Les résultats de ce volet ont été soumis au journal *Science of the Total Environment* (**Publication 3**): S. Tlili, H. Boussetta & C. Mouneyrac, Biomarker indices for the assessment of the health status of the marine bivalve *Donax trunculus* along the Gulf of Tunis (Tunisia).

Un septième chapitre concerne l'étude d'éventuelles perturbations des paramètres liés à la reproduction chez *D. trunculus* dans le golfe de Tunis. Les principaux paramètres étudiés sont:

- Le cycle gamétogénique annuel de *D. trunculus* (stades de maturité sexuelle, indices de maturité sexuelle, sex ratio)
- La quantification des réserves énergétiques (glycogène, lipides)
- Les indices biométriques (Indices de condition).

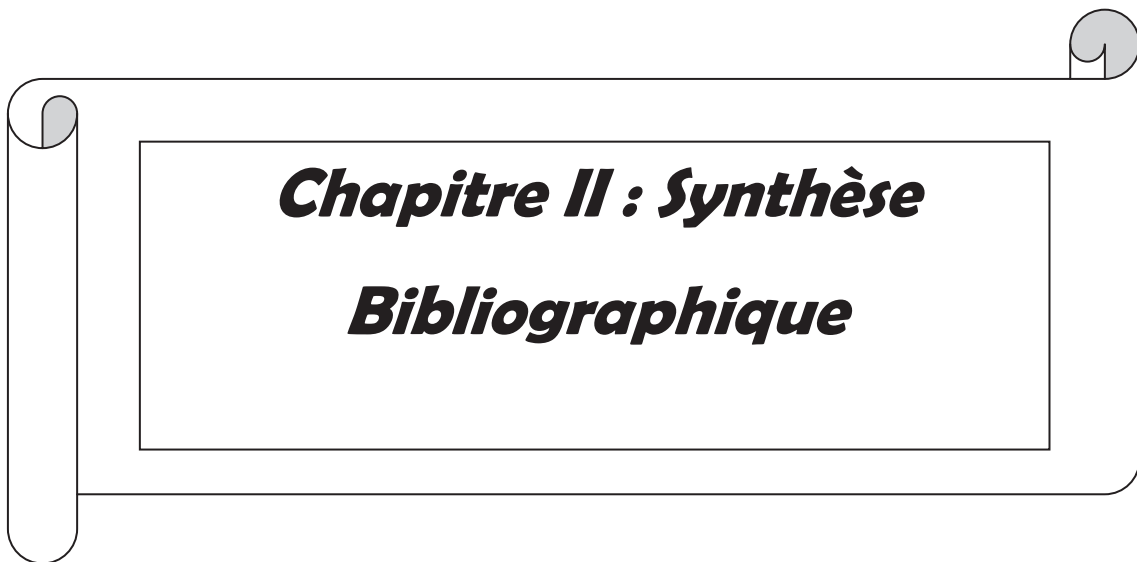
A ces paramètres, sera associée une étude des relations allométriques (relations entre les paramètres métriques et pondéraux) et de la variation saisonnière des indices biométriques des bivalves.

Les résultats de ce volet ont été publiés au journal *Chemosphere* (**Publication 3**) :

- S.Tlili, I. Métais, H. Boussetta, N. Ayache & C. Mouneyrac. (2011). Is the reproduction of *Donax trunculus* affected by their sites of origin contrasted by their level of contamination?

Chemosphere 84, Issue 10: 1362-1370.

Enfin, au cours du *huitième chapitre*, une synthèse générale de l'ensemble de ces travaux sera discutée et argumentée afin de présenter les perspectives de cette thèse.



***Chapitre II : Synthèse
Bibliographique***

Chapitre II : Synthèse Bibliographique

II.1. Evolution du concept de la surveillance environnementale

Pour évaluer l'état de santé des écosystèmes aquatiques, plusieurs méthodologies ont été développées et testées ces dernières années prenant en compte divers aspects de la représentativité écologique et de la rentabilité expérimentale. Malgré la grande diversité de ces méthodologies, on peut les regrouper en deux approches interactives et parfaitement complémentaires : *i*) l'approche chimique qui vise principalement à estimer qualitativement et quantitativement le comportement et le devenir des polluants de l'environnement dans les différentes matrices de l'écosystème (sédiments, eau et organismes vivants), *ii*) l'approche biologique qui se base principalement sur l'étude de la réponse des organismes (à différents niveaux d'organisation biologiques) face à des agressions de l'environnement (e.g. pollution chimique, changements climatiques).

II.1.1. L'Evaluation du risque environnemental

Face à la grande diversité de la nature et de l'origine des polluants chimiques, des stratégies d'évaluation des risques des xénobiotiques ont été développées. L'évaluation du risque environnemental (Environmental Risk Assessment : ERA) est définie comme étant la mise en place d'une procédure permettant l'évaluation des effets des polluants et des activités anthropogéniques sur les écosystèmes (et leurs composantes) en appliquant des méthodologies déjà maîtrisées et validées à l'échelle expérimentale (Depledge & Fossi, 1994; Van Deer Oost et al., 2003). La notion d'évaluation du risque environnemental comprend deux composantes : *i*) l'évaluation des risques environnementaux (Risk Analysis : RA) : qui s'intéresse particulièrement à l'identification, la caractérisation et l'évaluation des éventuels effets des risques environnementaux. *ii*) La gestion des risques environnementaux (Environmental Risk Management : RM) : il s'agit d'une étape complémentaire à l'évaluation des risques environnementaux, qui résume les démarches mises en œuvre pour trouver des solutions pratiques afin de gérer au mieux les risques d'exposition à de telles situations particulières de l'environnement. Elle peut être également une étape prédictive pour prévenir les comportements et les démarches nécessaires dans ce genre de cas (Suter, 1993 ; Power & McCarty, 1997 ; Van Deer Oost et al., 2003).

Dans cette démarche, l'évaluation du risque environnemental peut être résumée en huit étapes (Van Leeuwen & Vermeire, 2007) :

- L'identification du risque : identification des effets et du risque des xénobiotiques pour l'environnement.
- L'évaluation de l'effet : c'est l'estimation des relations doses-effets ou degré d'exposition-effets des xénobiotiques. Cette étape permet de déterminer des niveaux seuils par rapport à l'exposition à un polluant chimique comme par exemple les NOEC (No Effect Concentration : concentration sans effet observé), les LOEC : (Lowest observed effect concentration : plus petite concentration induisant un effet observé), et les PNEC (Predicted No Effect Concentration : concentration sans effet prévisible).
- L'évaluation de l'exposition : c'est l'estimation des doses et/ou des concentrations de polluants auxquelles sont exposés les différents compartiments de l'environnement ou les populations cibles directement. Pour une substance nouvellement synthétisée, par exemple, un paramètre appelé PEC (Predicted Environmental Concentration : concentration probable dans l'environnement) peut être proposé.
- La caractérisation du risque : il s'agit de l'intégration des étapes d'identification, d'évaluation des effets et des risques pour déterminer les éventuelles perturbations qui peuvent avoir lieu. Des indices tels que le quotient du risque (Risk Quotient) peuvent être proposés pour gérer certaines situations d'exposition accidentelle.
- La classification du risque : il s'agit de classer les risques identifiés et évalués afin de décider de la nature de la démarche à suivre. Cette étape permet de définir deux seuils ; le seuil maximal permis (Maximum Permissible Level : MPL) et le seuil négligeable (Negligible Level : NL).
- La balance analyse du risque-avantage : cette étape dresse une comparaison entre les risques analysés et la rentabilité de la démarche proposée.
- La réduction du risque : cette étape intègre les différentes mesures préventives/curatives qui tendent à protéger l'environnement et les populations à risque. Elle peut conduire à des standards de sécurité environnementale (safety standards).
- La surveillance : elle correspond à l'observation spatio-temporelle répétitive des éventuelles perturbations causées par les xénobiotiques dans l'environnement.

II.1.2. La surveillance chimique

Les premiers outils de la surveillance de la qualité environnementale ont reposé principalement sur le contrôle analytique des paramètres physico-chimiques et la détection/quantification des principales classes de polluants dispersés dans l'environnement. L'analyse qualitative et quantitative des xénobiotiques est réalisée au niveau de différentes matrices physiques (eau, sédiment/sols, air) et biologiques (organismes, fluides internes). Les principaux polluants chimiques mesurés sont les métaux traces, les HAPs, les PCBs et les composés phytosanitaires (pesticides organophosphorés, organochlorés et carbamates). Au fur et à mesure du développement croissant des industries chimiques et des activités urbaines, les recherches se sont orientées vers la détection et la quantification de nouvelles molécules synthétisées telles que les produits pharmaceutiques et leurs métabolites, les stupéfiants (cocaïne, héroïne), les alkylphénols, les dioxines et plus récemment les nanoparticules (Amiard & Amiard-Triquet, 2008 ; Mari et al., 2009 ; Buchberger, 2011 ; Buffet et al., 2011 ; Canesi et al., 2011). Toutefois, malgré l'évolution des techniques des méthodes analytiques, la détection et la quantification de ces contaminants demeurent parfois difficile, voire impossible à l'heure actuelle et souvent à des coûts élevés.

II.1.2.1. Les modalités de la surveillance chimique en milieu aquatique

II.1.2.1.1. L'étude de la disponibilité biologique des polluants

En milieu aquatique, les polluants chimiques tendent à s'accumuler dans les différentes composantes telles que la colonne d'eau, les sédiments qui représentent le compartiment de stockage à long terme des contaminants et les organismes vivants. L'accumulation des toxiques dans les différentes matrices biologiques (fluides internes, chair, organes) dépend principalement des facteurs physico-chimiques et des facteurs biologiques (assimilation, métabolisation, excrétion). La caractérisation de la disponibilité biologique des contaminants chimiques est une étape primordiale dans le contexte de l'évaluation des risques écotoxicologiques. L'estimation de la biodisponibilité d'un xénobiotique permet de définir sa capacité à interagir avec les organismes vivants (pénétration, assimilation, métabolisation, excrétion ...) (Gourlay-Francé et al., 2010). La biodisponibilité des contaminants dépend non seulement de leurs propriétés (e.g. hydrophobicité, spéciation physico-chimique) mais également des caractéristiques du milieu (e.g. pH, dureté, salinité, turbidité) et de la

physiologie des organismes (e.g. capacité à réguler et/ou détoxifier les contaminants), (Thorsen et al., 2007 ; Pelletier & Campbell, 2008 ; Gourlay-Francé et al., 2010; Palais, 2011). Pour évaluer la biodisponibilité des xénobiotiques dans l'environnement, l'étude de l'accumulation biologique de ces contaminants au sein même de matrices biologiques ou biomimétiques s'avère l'approche la plus fiable et la plus directe (Borgmann et al., 2001; Salazar & Salazar, 2007). Cette approche est basée sur l'utilisation de systèmes intégrateurs « naturels » ou « synthétiques » qui, par leur capacité à (bio)accumuler et (bio)concentrer les contaminants, intègrent les facteurs de variation temporelle de l'exposition (concentration, durée, fréquence) et permettent ainsi d'obtenir une estimation globale du niveau de contamination des milieux (Abarnou et al., 2000 ; Namieśnik et al., 2005 ; Salazar & Salazar, 2007 ; Gourlay-Francé et al., 2010).

II.1.2.1.2. Les intégrateurs biologiques au service de la surveillance chimique

Les stratégies de l'étude de la bioaccumulation des polluants chimiques sont généralement de deux types : la surveillance chimique passive et la surveillance chimique active. La première se distingue par l'utilisation de populations indigènes naturellement présentes dans les sites étudiés. C'est le cas par exemple du réseau ROCCH (Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du milieu marin) piloté par l'IFREMER (France) qui a pour objectif la détection et la quantification des contaminants chimiques dans des moules indigènes collectées de différents sites de l'ensemble du littoral français. Un autre exemple de programmes de surveillance chimique passive est le programme « Mussel Watch » qui concerne plus de 300 sites côtiers du littoral des Etats Unis d'Amérique (Center for Coastal Monitoring and Assessment, 2011).

Les stratégies de surveillance passive permettent sans doute une étude « historique » de la contamination des sites étudiés, mais elles ne garantissent pas une comparaison objective des réponses biologiques mesurées entre des sites géographiquement éloignés en raison d'une acclimatation physiologique ou d'une adaptation génétique potentielle des espèces résistantes à une contamination chronique du milieu (Klerks & Weis, 1987; Mersch et al., 1996). Par contre, les stratégies de surveillance active permettent de pallier ces inconvénients en transplantant dans les sites d'étude des organismes provenant d'une même population et

partageant donc un même passif d'exposition (De Kock & Kramer 1994 ; Andral et al., 2004; Palais, 2011).

En effet, la surveillance active permet de réaliser des mesures optimisées par l'utilisation d'échantillons homogènes au regard de la population d'origine (âge, sexe, taille, variabilité génétique intra-spécifique) et de contrôler la période d'exposition et le libre choix de la sélection des sites (indépendamment de la présence/ absence d'espèces sentinelles). Ce qui donne la possibilité d'associer à la fois le contrôle expérimental et le réalisme environnemental (Kraak et al., 1991 ; Mersch & Pihan, 1993 ; Salazar & Salazar, 1997 ; Andral et al., 2004 ; Palais, 2011). Ce type de surveillance chimique active a été appliqué dans plusieurs programmes, notamment le projet « Gulf Watch » qui vise la surveillance chimique du golfe du Maine (Etas Unis d'Amérique) (Chase et al., 2001).

II.1.2.1.3. Les capteurs biomimétiques passifs

Si l'utilisation de certains organismes comme les bivalves dans la surveillance chimique des milieux aquatiques permet d'étudier la bioaccumulation des contaminants chimiques, la complexité des interactions organismes-polluants l'empêche d'être un outil de surveillance chimique sans faille. En outre, la capacité de certains bivalves utilisés en surveillance (active ou passive) à s'isoler du milieu extérieur par fermeture des valves peut ainsi prévenir la détection d'épisodes de contamination aigus tandis que leur capacité à réguler et métaboliser certains contaminants peut prévenir la détection d'épisodes de contaminations chroniques (Salazar & Salazar, 2007 ; Van Hassel & Farris, 2007). Pour pallier ces inconvénients, des systèmes intégrateurs synthétiques, comme les systèmes d'échantillonnage passif susceptibles de reproduire l'accumulation de certains types de contaminants au sein des matrices biologiques, ont été proposés.

Ces échantillonneurs passifs sont dits des systèmes intégrateurs biomimétiques puisqu'ils tendent à reproduire les mêmes faits qu'assurent les systèmes biologiques quant à l'accumulation et la détection des contaminants chimiques. Ces dispositifs peuvent être ciblés vis-à-vis d'une classe de contaminants, tels que les métaux (e.g. systèmes DGT : « Diffusive Gradient in Thin-films ») (Davison & Zhang, 1994), les composés organiques hydrophobes (e.g. systèmes SPMD : « Semi-Permeable Membrane Device ») (Huckins et al., 1990) ou encore les composés organiques hydrophiles (e.g. systèmes POCIS : « Polar Organic

Chemical Integrative Sampler ») (Alvarez et al., 2004). Ces intégrateurs biomimétiques passifs (Figure 2) comportent principalement deux phases : une phase d'adsorption et une phase de fixation des contaminants chimiques (Gourlay-Francé et al., 2010). Une fois implantés dans les eaux, ces intégrateurs passifs tendent à fixer et concentrer les polluants. Ensuite, il est alors possible d'obtenir, sur les bases des connaissances des paramètres de la cinétique des échanges entre l'eau et les dispositifs, une mesure approchée de la fraction en contaminants disponibles dans l'eau (Gourlay-Francé et al., 2010).

L'avantage de ces capteurs passifs est l'évitement de toute interaction d'ordre biologique d'où leur applicabilité à tout type de milieu et dans toutes les conditions environnementales. Leur rendement ne dépend plus des facteurs de confusion classiquement rencontrés avec l'utilisation d'organismes vivants (e.g. âge, sexe, état physiologique, capacité de métabolisation ou d'évitement) ce qui leur confère la fiabilité d'interprétation des concentrations mesurées (Namieśnik et al., 2005; Zabiegała et al., 2010). Cependant ces capteurs passifs ne permettent pas d'appréhender la part de contaminants présents dans la phase particulaire qui peut être une importante source d'exposition chez les organismes aquatiques (e.g. par voie alimentaire avec désorption potentielle des contaminants dans la lumière de l'appareil digestif), (Björk, 1995; Pelletier & Campbell, 2008), d'où cette tendance à sous-estimer la charge en contaminants biodisponibles. L'utilisation de ces capteurs biomimétiques doit être complétée par les intégrateurs biologiques ; ces derniers offrant l'avantage supplémentaire de pouvoir mesurer dose et effets biologiques au sein d'un même organisme, facilitant ainsi l'analyse des relations dose – effets (Salazar & Salazar, 2007). L'utilisation de ce type de systèmes a fait l'objet de plusieurs applications dont l'action « Echantillonneurs passifs » mise en place par l'IFREMER (Munaron et al., 2011) .

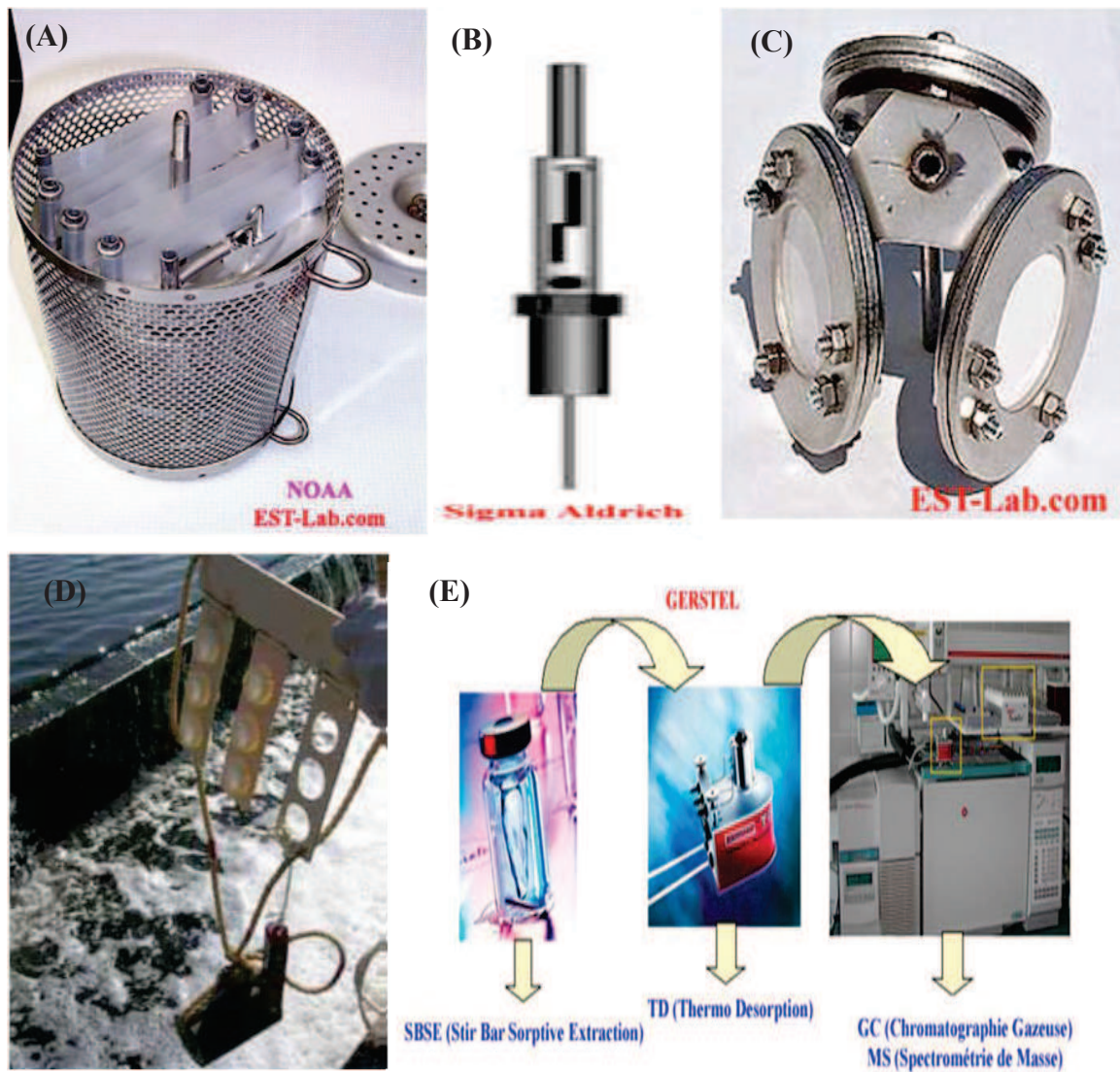


Figure 2 : Prototypes de différents échantillonneurs passifs. (A) : capteur type SPMD (Semi-Permeable Membrane Device) adaptés pour la mesure des Pesticides organochlorés, HAPs, PCBs ; (B) : capteur type SPME (Solid Phase Microextraction) adaptés pour les contaminants hydrophobes et polaires ; (C) : capteur polaire : POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) adaptés pour la mesure des herbicides, stéroïdes et les produits pharmaceutiques ; (D) : capteur type DGT (Diffusive Gradient in Thin-films) pour les métaux traces ; (E) : Stir Bar Sorptive Extraction : SBSE pour les contaminants organiques hydrophobes (HAPs, PCBs...) (Photos IFREMER).

II.1.3. La biosurveillance

Bien que la surveillance chimique fournisse des informations sur la contamination des milieux par les xénobiotiques recherchés, elle ne permet pas d'étudier les effets biologiques et les conséquences écologiques qui en découlent (Cajaraville et al., 2000; Vasseur & Cossu-Leguille, 2003). Par ailleurs, des cocktails de contaminants chimiques sont présents dans les écosystèmes aquatiques, or les techniques analytiques sont, dans la majorité des cas, incapables de détecter et quantifier ces mélanges de composés. D'autres problèmes comme le coût excessif des analyses, la « lourdeur » du matériel utilisé et l'influence des facteurs abiotiques (dégradation, dispersion, dilution, accumulation...) sont souvent évoqués. Initialement, l'approche biologique a été développée dans le but de pallier les insuffisances des analyses chimiques et pour déterminer l'effet des polluants chimiques sur le biota. Dans cette démarche globale, des outils de biosurveillance (ou encore biomonitoring) ont été proposés et développés dans le but de permettre une meilleure évaluation de l'état de santé des écosystèmes naturels. La biosurveillance peut être définie comme étant le suivi de l'état de santé d'un écosystème considéré moyennant des paramètres biologiques. Elle se base sur l'étude de la réponse biologique des polluants qui peut être assimilée à des indicateurs biologiques (Lafaurie et al., 1992 ; Namour, 1992 ; Peakal, 1994 ; Amiard & Amiard-Triquet, 2008). En complémentarité avec la surveillance chimique (Figure 3), la biosurveillance permet d'évaluer quels sont, pour les écosystèmes, les effets intégrés dans le temps de la présence de l'ensemble des contaminants et d'autres facteurs de stress dans le milieu naturel, à plus ou moins long terme (Amiard et al., 1998). Elle présente l'avantage de rendre compte de la biodisponibilité des polluants *in situ* (Forbes & Forbes, 1997). La notion de biosurveillance concerne par définition l'ensemble des différents niveaux d'organisation biologique : du niveau sub-organismal (cellule, molécules) jusqu'aux niveaux individuels et supra-individuel (population, communautés).

A l'échelle des communautés, des méthodes reposant sur les indices de qualité moyennant des populations benthiques, (par exemple les macros-invertébrés benthiques), ont été largement appliquées en Europe et partout dans le monde. Certaines d'entre elles ont même été normalisées (Leclercq, 2001).

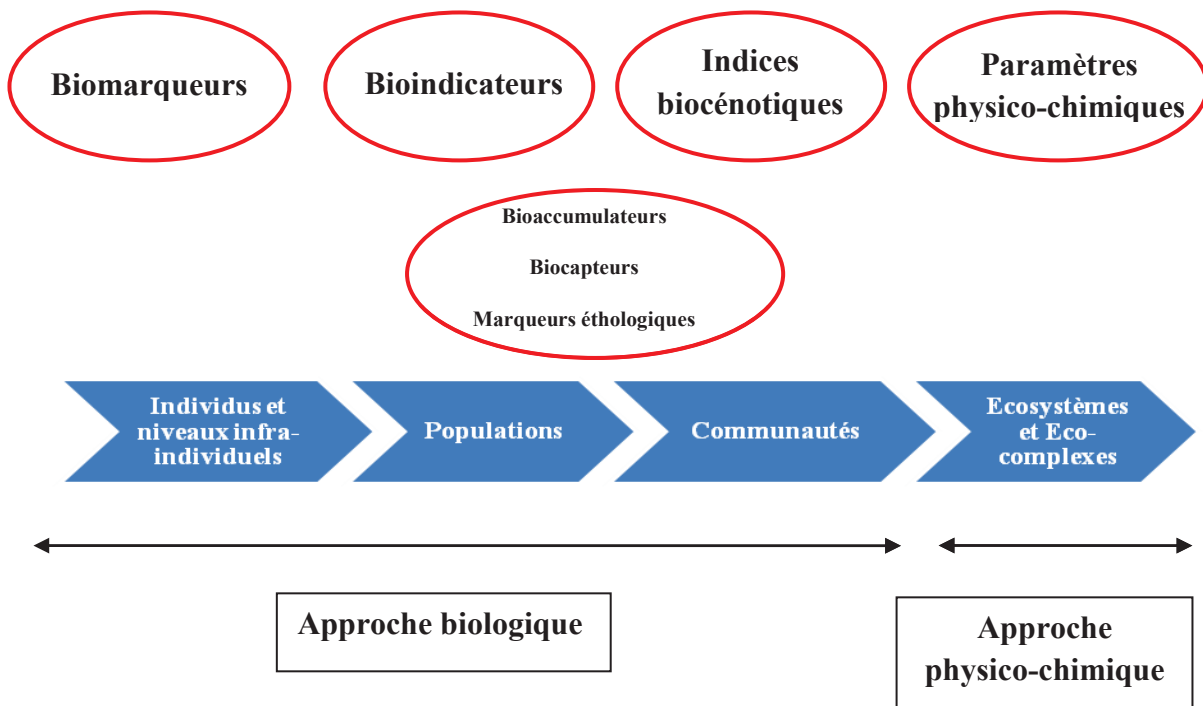


Figure 3 : Représentation schématique des différents paramètres mesurables à différents niveaux d'organisation biologique pour évaluer l'état de santé des écosystèmes aquatiques (Lagadic et al., 1997).

II.1.3.1. Les bioindicateurs et les indices biotiques

On désigne par le terme « bioindicateurs », les espèces animales ou végétales qui, du fait de leur particularité écologique (sédentarité, position dans la chaîne trophique, bioaccumulation...), réagissent à un polluant par une modification nette et spécifique de leur fonction vitale, et constituent donc, l'indice précoce de modifications biotiques ou abiotiques de l'environnement (Widdows, 1985). D'autres auteurs définissent les bioindicateurs comme étant une espèce ou un groupe d'espèces qui, par leur présence ou leur absence et/ou leur abondance, nous renseigne sur la qualité du milieu (Widdows, 1985; Timbrell, 2001). Les bioindicateurs sont donc des organismes qui peuvent être utilisés afin d'obtenir des informations sur les variations spatiales et temporelles des concentrations de polluants biodisponibles.

Parmi les avantages de l'utilisation des bioindicateurs dans les études d'évaluation de l'état de santé des écosystèmes aquatiques, la quantification des concentrations des polluants dans ces organismes est d'un grand intérêt en écotoxicologie puisque ces derniers n'incorporent que la fraction biodisponible des xénobiotiques. Les écotoxicologistes mentionnent qu'un organisme bioindicateur de pollution marine doit répondre aux critères suivants (Depledge & Fossi, 1994 ; Lafaurie, 1998 ; Kaiser, 2001 ; Berthet, 2008) :

- être sessile ou sédentaire,
- avoir une sensibilité aux contaminants,
- avoir une large distribution spatio-temporelle,
- ne doit pas figurer sur la liste des organismes en voie de disparition,
- avoir une anatomie et une biologie connues.

Cette notion d'indicateur paraît par ailleurs polyvalente et prête parfois à confusion, d'où la nécessité de distinguer entre les espèces sentinelles, les espèces indicatrices de la pollution, les espèces bioaccumulatrices et les espèces indicatrices de la qualité de l'eau (Charles & Smol, 1994 ; Lagadic et al., 1997 ; Durou, 2006). Une espèce sentinelle est toute espèce susceptible de donner une indication, par sa présence/ présence relative/absence, sur les déséquilibres subis par le milieu et les éventuels dérèglements du fonctionnement d'une communauté (Lower & Kendall, 1990). Les espèces bioaccumulatrices, sont les espèces qui, par leur mode de vie et leur métabolisme, tendent à accumuler les xénobiotiques soit par concentration tissulaire, soit par bioamplification *via* la chaîne alimentaire. Les espèces indicatrices de la qualité des eaux sont des espèces qui disparaissent lors de l'exposition des milieux à une pollution du fait de leur faible capacité d'adaptation à la pollution. Les espèces indicatrices de la pollution sont en revanche des espèces à dominance écologique majeure dans un environnement contaminé et ce grâce à des mécanismes d'adaptation à la pollution et au stress. L'étude de l'abondance relative ou encore de la présence/ absence de certaines espèces associées à un biotope donné peut avoir des interprétations écologiques exploitables pour évaluer la qualité d'un milieu. Cela correspond au principe des indices biotiques et des communautés benthiques par exemple. Il s'agit d'indices d'évaluation qui s'inspirent principalement d'indices écologiques classiques. A titre d'exemple, dans le milieu marin, on peut citer l'indice biotique benthique « BENTIX » (Simboura & Zenetos, 2002), l'AZTI Marine Biotic Index (AMBI), (Borja et al., 2000), l'indice de qualité benthique (Rosenberg et

al. 2004), le « Benthic Opportunistic Polychaetes Amphipods index » (BOPA), (Gomez-Gesteira and Dauvin, 2000), l'indice de l'évaluation de l'endofaune côtière (Grall & Clémarec, 2003). En dépit de l'avancement des recherches concernant ces indices, certains auteurs restent prudents quant à la généralisation de leur application pour l'évaluation de l'état de santé des écosystèmes, compte tenu du fait que chacun de ces indices a été initialement développé pour répondre à un stress particulier (Quintino et al., 2006; Salas et al., 2006; Chainho et al., 2007, Afli et al., 2008).

Néanmoins, les xénobiotiques présents dans l'environnement sont susceptibles d'altérer tous les niveaux d'organisation biologique (Figure 4) (Van Der Oost, 2003). Cependant, ces méthodes fournissent des indices qui reflètent l'impact de l'activité anthropogénique sur l'écosystème, bien après que des modifications aient déjà altéré l'écosystème étudié (Vasseur & Cossu-Leguille, 2003), représentant ainsi une des limites quant à leur utilisation. C'est dans ce contexte que les recherches sur les biomarqueurs, et notamment ceux pertinents d'un point de vue écologique, se sont développées ces dernières années.

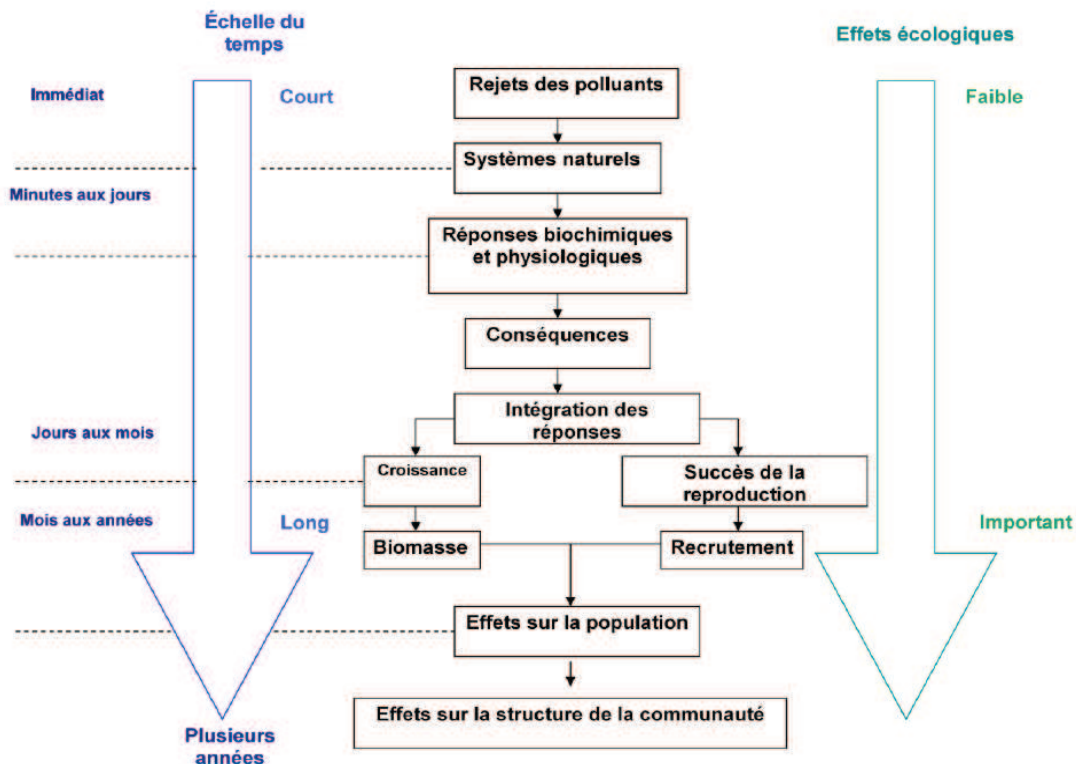


Figure 4 : Représentation de l'ordre chronologique des différentes atteintes induites au sein de l'organisation des systèmes biologiques (Van Der Oost et al., 2003, modifié).

II.1.3.2. Les biomarqueurs

II.1.3.2.1 Définitions et classifications

Le terme biomarqueurs désigne « les changements observables ou mesurables de certains paramètres moléculaires, biochimiques, cellulaires ou physiologiques qui révèlent une exposition présente ou passée de l'organisme à au moins une substance à caractère polluant » (Lagadic et al., 1997). Compte tenu du nombre élevé de variables biochimiques, moléculaires, cellulaires et physiologiques qui peuvent être utilisées en tant que biomarqueurs de pollution, plusieurs classifications ont été proposées. Van Der Oost et al. (2003) rappellent les différentes classifications des biomarqueurs, s'inspirant principalement des classifications de l'Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organisation, 1993) et du Conseil National de la Recherche aux Etats-Unis (National Research Council, 1987):

- **Les biomarqueurs d'exposition** sont des changements moléculaires ou cellulaires intervenant à un moment précoce pour atténuer ou inhiber les effets des xénobiotiques.
- **Les biomarqueurs d'effet** sont des changements moléculaires ou cellulaires résultant des effets des xénobiotiques et utilisés pour évaluer les dommages cellulaires.
- **les biomarqueurs de susceptibilité** incluent les capacités naturelles ou acquises qui permettent à un organisme de s'adapter et de répondre à une exposition spécifique à un polluant, incluant les facteurs génétiques et moléculaires qui altèrent la susceptibilité d'un organisme à la pollution.

Dans ce sens, ces biomarqueurs peuvent être regroupés selon leur degré de spécificité vis-à-vis d'une classe particulière d'un contaminant. Il existe des biomarqueurs « spécifiques », adaptés à la détection d'un polluant donné et des biomarqueurs « non spécifiques » qui intègrent les effets de différents facteurs de stress (Lagadic et al., 1997).

Delpedge (1994), propose la classification suivante des biomarqueurs:

- **Les Biomarqueurs d'exposition** : ils reflètent l'exposition d'un organisme, d'une population, d'une communauté à un contaminant ou un groupe de contaminants.
- **Les Biomarqueurs d'effet** : ils traduisent l'altération d'un organisme, d'une population, d'une communauté à un contaminant ou un groupe de contaminants. Ce qui ne permet pas de fournir des indications selon la nature de la contamination.
- **Les Biomarqueurs mixtes d'effet et d'exposition** : ils établissent une relation de causalité entre exposition et effet.
- **Les Biomarqueurs d'exposition chronique** : ils indiquent que des organismes à apparence sans altération quantifiable, ont été exposés à une exposition chronique à des contaminants.

Toutefois en éco-toxicologie, la relation cause-effet n'est pas toujours bien nette, c'est une des raisons pour laquelle d'autres auteurs comme De Lafontaine et al. (2000) proposent la classification suivante :

- **Les Biomarqueurs de défense** : ils traduisent une acclimatation/adaptation au stress comme la mise en place chez les organismes exposés de divers mécanismes de détoxification et de métabolisation des xénobiotiques. Ce type de biomarqueurs tend à atténuer ou à s'opposer à l'effet toxique à l'échelle infra individuelle (cellule, molécules) et individuelle (organisme) et par conséquent leur éventuelle répercussion à d'autres échelles d'organisation biologique (niveau populationnel par exemple). C'est le cas, par exemple, des protéines type MTs et certaines enzymes de phase II (e.g. GST, EROD...).
- **Les Biomarqueurs de dommage** : ils traduisent un véritable dommage quantifiable chez l'organisme exposé. Ces biomarqueurs peuvent être de différents types comme par exemple l'inhibition de l'activité AChE, les dommages à l'ADN, et les perturbations de la reproduction.

II.1.3.2.2. Utilisation des biomarqueurs dans la surveillance environnementale

Par définition, les biomarqueurs peuvent être mesurés à différents niveaux d'organisation biologique (molécules, cellules, individu, population), ce qui leur confère le caractère intégrateur de l'ensemble de la cascade d'événements qui suit l'exposition à une pollution (McCarthy et al., 1990 ; Vasseur & Cossu-Leguille, 2003). Les biomarqueurs, utilisés à l'échelle sub-individuelle, peuvent fournir des informations sur les stratégies / les mécanismes moléculaires et cellulaires qu'un organisme développe pour faire face aux effets néfastes de l'exposition à des xénobiotiques. Cet aspect préventif leur permet donc de diagnostiquer de façon précoce des dysfonctionnements physiologiques de l'individu, c'est-à-dire avant que des dommages tissulaires ou des effets néfastes sur les principales fonctions biologiques ne soient détectables (Van der Oost et al., 2003). Les biomarqueurs ont été proposés par plusieurs auteurs comme un outil fiable dans les études de biosurveillance qualitative et quantitative de l'exposition à différents agents agresseurs de l'environnement (Ringwood et al., 1999 ; Peakall, 1994 ; Van Der Oost et al., 2003 ; Viarengo et al., 2007).

II.1.3.2.3. Classification des biomarqueurs

II.1.3.2.3.1. Les biomarqueurs de défense

- **Activité Ca^{2+} ATPase**

L'activité Ca^{2+} -ATPase au niveau de la membrane plasmique (PMCA) joue un rôle important dans la régulation et l'homéostasie de la concentration cytosolique du Ca^{2+} libre. Elle représente chez la plupart des cellules le premier mécanisme d'élimination du Ca^{2+} dans le fluide extracellulaire (Carafoli, 1991,1994 ; Strehler, 1991). La fonction physiologique et biochimique de l'activité Ca^{2+} -ATPase a été décrite aussi bien chez les vertébrés (Carafoli, 1987 ; Gandhi & Ross, 1988) que chez les invertébrés, notamment les bivalves (Viarengo et al., 1991 ; Dondero et al., 2006). L'inhibition de l'activité Ca^{2+} -ATPase, souvent associée d'une façon directe ou indirecte à l'effet de certaines classes de polluants (Bellomo et al., 1985; Viarengo & Nicotera, 1991 ; Ermak & Davies, 2001; Burlando et al., 2004) entraîne ainsi une augmentation du Ca^{2+} cytosolique libre montrant un état de cytotoxicité qui se manifeste par une activation incontrôlée des phospholipases, des endonucléases et des

protéases (Orrenius et al., 1989; Nicotera & Orrenius, 1998), ainsi qu'une altération des fonctions lysosomales (Burlando et al., 2004).

- **Les protéines type métallothionéines (MTs)**

Isolées pour la première fois en 1957 par Margoshes & Vallee, à partir du cortex de rein de cheval, les MTs ont été d'abord décrites comme des protéines responsables de l'accumulation du Cd dans les reins de mammifères, en tant que ligands spécifiques de ce métal ("Cd-binding proteins"). Leur rôle prépondérant dans le métabolisme cellulaire des métaux essentiels ne fut révélé que bien plus tard, au terme de nombreux travaux (Kägi, 1991). Les principales propriétés biochimiques des MTs découlent de différentes caractéristiques structurales observées principalement chez les mammifères. Ce sont des protéines cytosoliques de faible poids moléculaire, compris entre 6 et 7 kD (61 à 62 acides aminés). Elles présentent un pourcentage élevé en résidus "cystéine" (Cys- acide aminé soufré), compris entre 30 et 35%, avec une absence d'acides aminés aromatiques, leur conférant une absorption UV spécifique et maximale à 254 nm et nulle pour une longueur d'onde de 280 nm. L'ensemble de ces résidus "cystéine" se répartit sous forme de motifs récurrents et invariants au sein de séquences peptidiques relativement spécifiques Cys-X-Cys, Cys-X-X-Cys, Cys-X-Y-Cys et Cys-Cys, dans lesquelles X et Y représentent des acides aminés (Hamer, 1986 ; Maroni, 1990 ; Roesijadi, 1992). De façon générale, chez la plupart des organismes aquatiques étudiés, les MTs ont trois principaux rôles physiologiques (Viarengo et al., 1999 ; Amiard et al., 2006):

- L'Homéostasie et la répartition intracellulaire des métaux essentiels :

Les métaux essentiels, tels que le Zn et le Cu, jouent un rôle crucial dans le développement, le fonctionnement, la prolifération et la différenciation cellulaire. Un système élaboré qui régule la concentration cytosolique, le stockage et la distribution cellulaire du Zn et du Cu a été mis en évidence chez les mammifères (avec certaines homologues chez les invertébrés) (Maret, 2000). Pour le Zn ou le Cu, ce système implique la coordination dynamique de protéines, dont les MTs, interagissent avec le métal pour son transport et son maintien sous la forme d'un "pool" labile dans le cytoplasme, mais aussi dans les organites des cellules (compartimentation), (Maret, 2000).

- Le Rôle de détoxification des métaux non essentiels

Le fort pouvoir « thioloprive » des métaux est à l'origine de l'importante capacité de séquestration de ces éléments par les MTs et de l'induction de leur biosynthèse. Aussi, les MTs sont associées à un rôle de protection à l'égard de la toxicité des éléments métalliques, en limitant leur accessibilité à d'autres sites cellulaires et en participant à leur détoxification. Cependant, face à une forte pression de contamination induisant des entrées massives d'ions métalliques dans les cellules, les taux de synthèse des MTs et les capacités de fixation des métaux sur ces protéines peuvent avoir un effet limité. Ces phénomènes sont illustrés par la théorie du débordement ou "spill-over" (Mason & Jenkins, 1995). Ce dernier survenant dans des conditions de contamination pour lesquelles les flux d'entrée des métaux sont supérieurs aux capacités de biosynthèse des MTs.

- Le Rôle antioxydant :

Chez les invertébrés aquatiques, les études évaluant le rôle des MTs dans la protection contre le stress oxydant sont moins nombreuses que chez les mammifères. Notons toutefois que certains résultats vont dans ce sens : (i) les MTs présentent *in vitro* une remarquable activité de séquestration des différentes espèces de radicaux libres, telles que l'ion hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) et l'anion superoxyde (O_2^-) (Thornalley et Vasak, 1985) ; (ii) le niveau cellulaire des MTs peut être augmenté par différents composés oxydants (Andrews, 2000). A ce sujet, Moreau et al., (2008) ont étudié chez des *Escherichia coli* transformées génétiquement, la réponse de deux variantes chimériques des MTs au Cd, Cu et Zn. Ils ont mis en évidence la différence des propriétés des MTs entre les isoformes : rôle pro-oxydant pour un chimère à trois domaines (α - β - α MTs domained) et anti-oxydant pour le deuxième chimère à quatre domaines (α - β - α - β MTs domained).

• Les marqueurs de stress oxydant

Le stress oxydant correspond à l'accumulation des radicaux libres dans la cellule pouvant engendrer des effets génotoxiques et cytotoxiques variés : une inactivation enzymatique, une dégradation des protéines, un dommage à l'ADN et une mort cellulaire (Livingstone et al., 2001). Plusieurs travaux ont montré que des activités anti-oxydantes peuvent être induites par des polluants organiques comme les HAPs et les PCBs ou encore par certains métaux traces (Cossu et al., 1997).

Parmi les enzymes anti-oxydantes du système de défense cellulaire, on relève la Cat, la SOD, la glutathion peroxydase, les GSTs et la glutathion réductase. Ce sont des enzymes qui assurent la transformation des radicaux libres en composés plus stables. Parmi les marqueurs de stress oxydant, la peroxydation lipidique est considérée comme marqueur d'exposition aux espèces réactives de l'oxygène (ERO) générées par des contaminants tels que les HAPs, les PCBs ou les métaux traces (e.g. Cu et Cd) (Roméo et al., 2000). Le dosage du taux de malonedialdéhyde (MDA) cellulaire, produit de la dégradation des réactions de peroxydation lipidique, est largement utilisé chez les bivalves (Doyotte et al., 1997 ; Cajaraville et al., 2000, Bergayou et al., 2009, Tlili et al., 2010) comme biomarqueur de stress oxydant induit par les contaminants chimiques. Les GSTs appartiennent à une super famille d'enzymes de métabolisation de phase II dont la fonction est de conjuguer une molécule de glutathion à une grande variété de substrats pour permettre leur élimination. Ces substrats peuvent être des molécules endogènes, mais aussi des xénobiotiques comme les pesticides, les HAPs et les PCBs. Les GSTs (EC 2.5.1.18¹) représentent un groupe d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques qui catalysent la conjugaison d'un tripeptide, le glutathion réduit (glutamyl-cystéinyl-glycine : GSH) à une multitude de substances hydrophobes présentant un centre électrophile (Habig et al., 1974). Ces enzymes sont présentes sous plusieurs isoformes dont certaines sont inductibles par les contaminants qu'elles détoxifient (Jebali, 2006).

Les SODs regroupent les métalloenzymes capables de dismuter l'anion superoxide. Ces enzymes possèdent au niveau de leur site actif un métal de transition (qui peut être le cuivre, le manganèse, ou le fer) qui va capter un électron de l'anion superoxide et le transférer au noyau imidazole de l'une des histidines du site actif (Cossu et al, 1997). Chaque métal présent au site actif va conférer des propriétés particulières à la SOD, notamment en termes de localisation dans la cellule (Paoletti et al, 1986).

La Cat est une hémoprotéine tétramérique dont chaque sous unité contient un atome de fer. Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Cette enzyme ubiquitaire est impliquée dans les premiers mécanismes de défense contre le stress oxydant (Pellerin-Massicotte, 1997). *In vivo*, la réponse de la Cat est souvent une réponse en « cloche », distinguée par une induction de l'activité, une stagnation puis une diminution de l'activité si le stress est continu (Dagnino et al., 2007).

¹ EC 2.5.1.18 : Enzyme Code, classe des transférases.

II.1.3.2.3.2. Biomarqueurs de dommage

- **Stabilité des membranes lysosomales**

Les lysosomes intervenant dans plusieurs processus physiologiques et immunologiques peuvent entre autres séquestrer divers contaminants de différents types. La fragilité de la membrane lysosomale est considérée comme une réponse des êtres vivants aux facteurs de stress biotique et abiotique ou à la présence de polluants, notamment les métaux lourds et les hydrocarbures (Ferreira & Dolder, 2003; Viarengo et al., 2007). De fortes corrélations entre la concentration en contaminants, la fragilité de la membrane lysosomale et les lésions hépatiques chez des mollusques bivalves (*Mytilus edulis* et *Mya arenaria*) exposés ont été mises en évidence (Pellerin-Massicotte & Tremblay, 1998). Ce marqueur est considéré comme hautement sensible à la pollution et a été proposé comme étant un premier marqueur de stress général à appliquer dans une démarche de biosurveillance (Viarengo et al., 2007). L'action toxique des polluants environnementaux sur la SML est due en partie à l'action directe de ces derniers sur la membrane mais aussi à l'activation (ou l'inhibition) des voies calcium et tyrosine-kinase dépendantes (Burlando et al., 2002; Canesi et al., 2004; Marchi et al., 2004).

Considérée comme un excellent marqueur de stress général, la SML a été appliquée également dans plusieurs études *in situ* chez une grande variété d'espèces sentinelles dont les mollusques bivalves (Lowe et al., 1995; Fernley et al., 2000; Einsporn et al., 2005; Schiedek et al., 2006). Ce choix a été ensuite adopté dans plusieurs programmes de recherche, en particulier le projet européen « Biological Effects of Environmental Pollutants in marine coastal ecosystems » (BEEP) (Koehler et al., 2002).

- **Evaluation du contenu des lipofuscines**

Les produits finaux de la peroxydation lipidique tendent à s'accumuler au niveau des lysosomes sous forme de granules insolubles, contenant des pigments auto-fluorescents, appelés lipofuscines (Viarengo et al., 2007). Les lipofuscines sont composés de protéines oxydées et de produits de la dégradation lipidique (Viarengo & Nott, 1993; Terman & Brunk, 2004). Ils sont tous non dégradables du fait de la présence de peptides formant des liaisons aldéhydes à l'intérieur de structures insolubles (Kikugawa et al., 1989).

Durant l'exposition des bivalves à des polluants environnementaux, la réponse de ce biomarqueur montre une induction progressive en fonction de la charge polluante, ce qui a été à l'origine de son utilisation comme un marqueur cellulaire fiable du stress général mais aussi comme un indicateur d'exposition au stress oxydant (Moore, 1988 ; Petrovic et al., 2004 ; Nigro et al., 2006).

- **Accumulation des lipides neutres**

L'action des xénobiotiques chimiques est souvent associée au métabolisme des acides gras et à l'accumulation des lipides neutres dans les vacuoles des lysosomes (Lüllman-Rauch, 1979). Le niveau de stockage des lipides neutres dans les lysosomes est ainsi considéré comme un indicateur utile pour l'évaluation de l'état physiologique des cellules (Koehler et al., 1992, 2002; Koehler, 2004).

- **Lactate déshydrogénase (LDH)**

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme catalysant la réduction du pyruvate pour soutenir le processus de la glycolyse en condition d'hypoxie (environnementale et/ou physiologique). Elle peut donc être utilisée pour suivre l'état métabolique des organismes (Gonzales & Quinones, 2000). L'énergie assimilée est allouée à deux demandes compétitives : l'entretien et la production (McNab et al., 2002). Les coûts d'entretien sont destinés à la fois au métabolisme de base et aux activités comme la locomotion et la prospection de la nourriture. L'énergie allouée à la production est attribuée aux processus en faveur de la continuité de la vie comme la croissance et la reproduction. L'exposition des organismes à des contaminants chimiques est coûteuse d'un point de vue énergétique (hypothèse du coût métabolique) (Calow, 1991). Pour faire face à un coût métabolique additionnel imposé par l'exposition aux contaminants, une allocation préférentielle de l'énergie disponible vis-à-vis des mécanismes de défense mis en place se fait aux dépens de celle allouée à la croissance et la reproduction. L'utilisation de la LDH chez les mollusques bivalves a été validée chez plusieurs lamellibranches (Nicholson & Lam, 2005; Boldina-Cosqueric et al., 2010).

- **L'inhibition de l'activité des cholinestérases**

Les cholinestérases (ChE) sont divisées en deux classes, l'acétylcholinestérase ou AChE (EC 3.1.1.7²) et la butyrylcholinestérase ou pseudo-cholinestérase (BChE, EC 3.1.1.8). Ces deux enzymes peuvent être distinguées par leur spécificité aux substrats préférentiels et leur susceptibilité aux inhibiteurs sélectifs (Kozlovskaya et al., 1993 ; Lagadig et al., 1997).

L'acétylcholinestérase ou (AChE) est une enzyme impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux à travers l'organisme. Dans les jonctions inter neuronales et neuromusculaires, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui permet la transmission du message nerveux d'une cellule à une autre. Une fois l'information transmise, l'acétylcholine est rapidement inactivée par l'acétylcholinestérase (AChE), ce qui permet au système de revenir à l'état de repos. L'inhibition de l'enzyme par de nombreux neurotoxiques entraîne une accumulation du médiateur chimique dans la fente synaptique et maintient de ce fait une transmission permanente de l'influx nerveux conduisant généralement à la tétanie puis à la mort (Boquené, 1997). La mesure de l'activité acétylcholinestérase chez les organismes aquatiques est un outil efficace pouvant apporter des informations sur l'impact neurotoxique provoqué par la contamination du milieu en pesticides organophosphorés et carbamates (Flammarion et al., 1996). Les butyrylcholinestérases (BuChE) et les propionylcholinestérases (PChE) sont également appelées pseudo-cholinestérases ou cholinestérases non spécifiques. Elles possèdent une forme moléculaire amphiphile, semblable à celle de l'acétylcholinestérase et contiennent jusqu'à 65% des acides aminés en commun (Allderdice et al., 1991). Contrairement à l'AChE qui hydrolyse l'acétylcholine plus rapidement que les autres cholinestérases, les pseudo-cholinestérases agissent préférentiellement sur les esters butyriques, propioniques et succiniques de la choline, mais hydrolysent également l'acétylcholine (Chatonnet & Lockridge., 1989; Ekholm, 2001).

L'utilisation de l'inhibition de l'activité AChE a été largement utilisée dans les études de biosurveillance comme étant un indicateur de neurotoxicité, caractéristique de l'exposition à des substances à caractère neurotoxique telles que les pesticides de tout genre mais également de certains métaux traces (Labrot et al., 1996; Cajaraville et al., 2000 ; Fulton & Key, 2001, Dellali et al., 2001 ; De la Torre et al., 2002). Cependant certains auteurs attirent l'attention sur le fait que chez les mollusques bivalves, l'inhibition nette de l'activité AChE n'est observée et validée que lors d'une exposition à de fortes concentrations de produits à

² EC 3.1.1.7 : Enzyme Code, classe des hydrolases agissant sur les liaisons esters (estérases).

caractère neurotoxique (Galloway et al., 2002; Rickwood & Galloway, 2004; Dagnino et al. 2007). Ces auteurs proposent alors de l'intégrer comme étant un biomarqueur de stress général chez les bivalves dans le cadre du projet MusES (Mussel Expert System) affilié au programme BEEP.

II.1.3.2.4. Limites et critiques à l'égard de l'utilisation des biomarqueurs

Selon Cairns (1992), pour qu'une variable biologique soit utilisée comme biomarqueur de pollution, sa réponse doit avoir une variation supérieure (signal) à la variation naturelle de la variable biologique due aux fluctuations naturelles (« bruits de fonds »). De ce fait, plus le rapport « signal/bruit de fond » est fort, plus la réponse de la variable biologique considérée est hautement significative et peut être utilisée en tant que biomarqueur. Or, plusieurs facteurs, autres que de contamination, peuvent influencer la réponse de ces biomarqueurs. Les travaux de recherche et de validation de l'utilisation des biomarqueurs *in situ* pointent l'interférence de certains facteurs abiotiques à l'instar de la température, la salinité ou encore des facteurs biotiques comme la taille, l'âge, le sexe, les disponibilités alimentaires, les processus physiologiques tels que la reproduction et la croissance, sur la réponse des biomarqueurs (Amiard-Triquet & Rainbow, 2009 ; Kalman et al., 2010). Ces facteurs de confusion rendent l'utilisation et l'interprétation des résultats des biomarqueurs une tâche parfois délicate. De plus, le profil de réponse des biomarqueurs varie en fonction du niveau de l'exposition au stress chimique (Figure 5). A titre d'exemple, des biomarqueurs comme l'ACHé, la SML ou le « Stress on stress », réagissent d'une manière inversement proportionnelle au gradient du stress subi : plus la pollution chimique est intense, plus la réponse de ces marqueurs diminue, ce qui peut être interprété comme une inhibition. Alors que la réponse d'autres biomarqueurs, comme l'accumulation des lipides neutres ou les dommages à l'ADN est proportionnelle au gradient du stress subi : plus le stress chimique est intense, plus la réponse de ces biomarqueurs est induite. Par contre, un troisième « groupe » de biomarqueurs réagissent au gradient du stress chimique observé d'une manière caractérisée par la succession de trois phases : une phase d'induction, une phase de transition et une phase de diminution d'activité. Cette réponse en « forme de cloche » caractérise les MTs, la Cat et les GSTs.

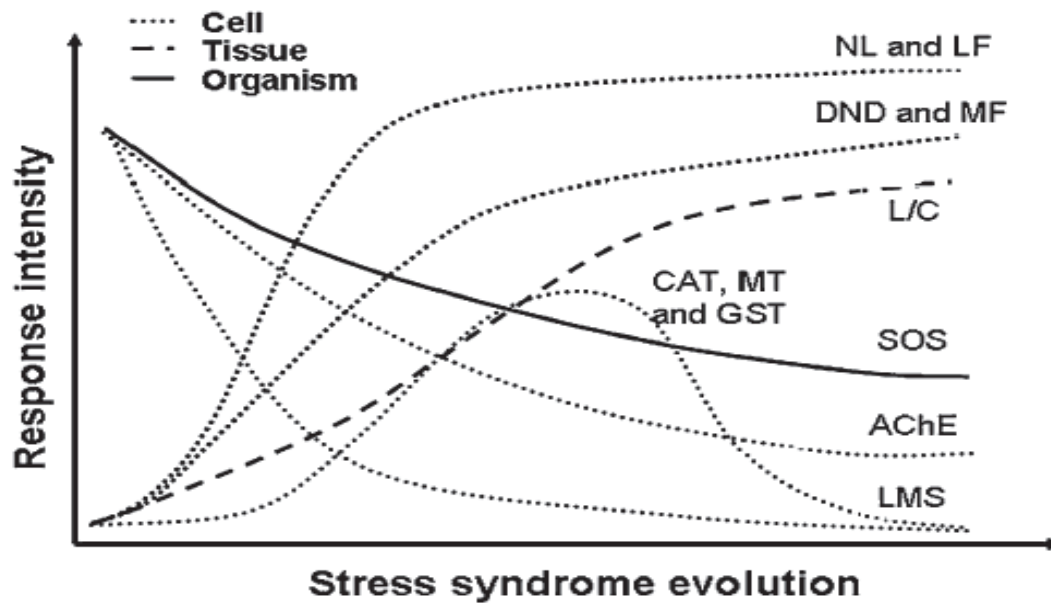


Figure 5 : Réponse d'une batterie de biomarqueurs couvrant les différents niveaux d'organisation biologique (Dagnino et al., 2007).

Les recherches dans ce contexte ont permis à ce jour de standardiser l'utilisation d'un certain nombre de biomarqueurs recommandés en biosurveillance et de limiter les effets de ces bruits de fonds en contrôlant les conditions de mesures et d'échantillonnage. Les biomarqueurs qui ont fait l'objet de plusieurs études de standardisation, de validation (*in vivo* et *in situ*) sont considérés comme des biomarqueurs conventionnels ou des « core biomarkers ». Ils sont d'ailleurs couramment utilisés dans les études de biosurveillance et validés dans le cadre de programme de surveillance (e.g. MEDPOL, OSPAR). C'est le cas de l'inhibition de l'activité de l'AChE, la SML, l'activité EROD (principalement chez les poissons), les adduits à l'ADN, les MTs, la vittélogénine (Vtg), l'imposex et certaines lésions hépatiques (Roméo & Giambérini, 2008 ; Mouneyrac & Amiard-Triquet, *in press*). Par ailleurs, malgré ces efforts, l'interprétation des réponses des marqueurs biologiques reste toujours une tâche délicate, vu la complexité des systèmes naturels.

Une autre critique formulée à l'égard de l'utilisation des biomarqueurs moléculaires et cellulaires notamment est leur faible pertinence écologique (Forbes et al., 2006 ; Mouneyrac & Amiard-Triquet, *in press*). Une meilleure compréhension des relations entre les biomarqueurs à différents niveaux d'organisation biologique (des molécules aux cellules,

organes, individus, populations, communautés) devrait permettre une meilleure évaluation de l'état de santé des écosystèmes, en particulier ceux qui sont impliqués - directement ou indirectement –dans le succès de la reproduction (Mouneyrac & Amiard-Triquet, *in press*).

II.1.3.2.5. Les biomarqueurs pertinents d'un point de vue écologique

Malgré la grande diversité des biomarqueurs conventionnels, ils appartiennent pour la plupart aux niveaux moléculaire et cellulaire de l'organisation biologique. Comme évoqué précédemment, l'une des critiques majeure quant à leur utilisation en surveillance environnementale est leur manque de pertinence écologique puisqu'ils sont incapables d'assurer le rôle prédictif sur les effets éventuels de la contamination à l'échelle supra-organismale, notamment au niveau populationnel (Forbes et al., 2006 ; Mouneyrac & Amiard-Triquet, *in press*). Le succès de la reproduction étant la clé ultime de la conservation des populations et le garant de la biodiversité, il n'est pas surprenant que les biomarqueurs impliqués dans les processus reproductifs soient de plus en plus pris en considération dans la palette des biomarqueurs à haute significativité écologique. D'ailleurs, certains auteurs considèrent même que la détermination de tout paramètre toxicologique, dans le contexte des biomarqueurs, sans lien avec la reproduction est un effort perdu (Tannenbaum, 2005). Les biomarqueurs comportementaux, de génotoxicité, d'immunotoxicité, de la SML ou encore ceux liés au métabolisme énergétique ; sont également considérés comme biomarqueurs pertinents d'un point de vue écologique et sont détaillés ci-après (Mouneyrac & Amiard-Triquet, *in press*).

- **Les biomarqueurs comportementaux**

Les biomarqueurs comportementaux sont indicatifs des réponses au niveau individuel qui peuvent être reliées à des effets au niveau populationnel. En effet, suite à une exposition à la pollution chimique, des phénomènes de dysfonctionnements des activités locomotrices ou de comportement sexuel peuvent affecter des processus physiologiques vitaux des animaux exposés (e.g. capture des proies pour l'alimentation, recherche de partenaires pour l'accouplement, perturbation de la prise en charge et la protection des juvéniles...). Ces perturbations d'ordre physiologique reflètent des altérations du système nerveux telles que l'activité des voies des neurotransmetteurs dans la perception sensorielle (e.g. chimio-

réception, réception de la lumière) ou de l'activité motrice (e.g. performance de la nage, locomotion, enfouissement...). Les effets indirects peuvent être des perturbations dans le succès de la reproduction en raison des modifications de l'alimentation et donc du métabolisme énergétique. Ces biomarqueurs sont des outils sensibles qui contribuent à évaluer l'impact des contaminants sur les concentrations bien en dessous des seuils létaux (Mouneyrac & Amiard-Triquet, *in press*). Les effets en cascade depuis les altérations infra-individuelles jusqu'aux effets populationnels ou même au niveau de la communauté ont donné lieu à plusieurs travaux de synthèses (Amiard-Triquet, 2009; Weis et al., 2011; Fossi-Tankoua, 2011). L'un des grands avantages de l'utilisation des biomarqueurs de perturbation du comportement est leur caractère « non destructif » qui permet l'observation des effets sans pour autant sacrifier l'animal. Ce qui permet facilement dans un contexte de biosurveillance de coupler ces biomarqueurs aux autres biomarqueurs moléculaires, cellulaires et physiologiques. La mise en évidence des liens entre les perturbations du comportement et des troubles d'ordre neurologique est bien documentée (Amiard-Triquet, 2009). A titre d'exemple, une corrélation positive significative a été observée entre l'inhibition de l'activité de l'AChE et la performance de nage chez des poissons (*Pomatoschistus microps*) exposés aux métaux (Vieira et al., 2009). Vu le rôle essentiel de cette enzyme (AChE) dans la neurotransmission, l'inhibition de son activité observée chez les animaux exposés aux métaux peut contribuer à des changements comportementaux (Vieira et al., 2009). Par contre, chez le ver polychète marin *Nereis diversicolor*, l'exposition à des sédiments contaminés par un cocktail de polluants organiques et métalliques (HAPs, PCBs, pesticides organophosphorés et métaux traces) provoquent une diminution du taux d'assimilation alimentaire sans pour autant affecter l'activité AChE (Moreira et al. 2006). Cette modification comportementale a été associée à une augmentation de l'activité de la LDH reflétant une augmentation du métabolisme énergétique anaérobie. L'altération de la fonction thyroïdienne peut également influencer certaines activités comportementales telles que l'alimentation et la mobilité de la morue de l'Atlantique *Gadus morhua* (Castonguay & Cyr, 1998). De même chez les poissons Choque-mort *Fundulus heteroclitus* exposés à des mélanges mixtes de métaux et de polluants organiques, des troubles du comportement ont également été associés à des altérations de la fonction thyroïdienne (Weis et al., 2000).

- **Les biomarqueurs du métabolisme énergétique**

L'exposition des organismes vivants à des cocktails de polluants dans l'environnement est susceptible d'engendrer une perturbation de leur métabolisme énergétique. En effet, les

mécanismes de défense vis-à-vis des facteurs de stress environnementaux sont considérés comme métaboliquement coûteux (Calow, 1991), impliquant une diminution de l'énergie disponible en faveur d'autres processus : le métabolisme basal, la croissance et la reproduction (Holloway et al., 1990). Parmi les biomarqueurs du métabolisme énergétique couramment utilisés (Le Gal et al., 1997 ; Mayer et al., 2002 ; Durou, 2006 ; Mouneyrac et Amiard-Triquet, *in press*), on peut citer :

- Les réserves énergétiques (Glycogène, lipides et protéines).
- La charge énergétique en adénylates.
- L'allocation énergétique à la reproduction et la croissance ou « Scope For Growth »
- L'activité des enzymes clés du métabolisme énergétique
- L'allocation cellulaire énergétique (Cellular Energetic Allocation).

La mesure de l'allocation cellulaire énergétique chez des organismes subissant un stress chimique révèle des altérations au niveau cellulaire qui peuvent être liées à d'autres niveaux d'organisation biologique (De Coen & Janssen, 2003). Pour mieux modéliser l'approche énergétique, le modèle du budget énergétique dynamique (Dynamic Energy Budget : DEB) a été proposé (Kooijman, 1986; Kooijman et al., 2009). Ce modèle permet, entre autres, de modéliser l'extrapolation des effets du niveau individuel (croissance, fertilité, survie) au niveau populationnel (Lopes et al., 2005; Jager et Klok, 2010), permettant ainsi d'observer les éventuels changements dans la structure de la population suite à un stress chimique (Billoir et al., 2007).

L'énergie allouée à la reproduction et à la croissance des bivalves dépend principalement de la balance énergétique (estimée comme la différence entre l'énergie assimilée par l'alimentation et les dépenses énergétiques de base) (Stoeckmann & Garton, 2001). L'exposition au stress chimique peut perturber la balance énergétique des animaux comme résultat direct des coûts de tolérance adoptés (e.g. mécanismes de défense, réparation des dommages), (Mouneyrac et al., 2011) et ce aux dépend de l'énergie allouée à la reproduction et à la croissance (Smolders et al., 2004; Voets et al., 2006; Palais et al., 2011). Cette balance énergétique peut également être négative, sous certaines conditions de l'environnement (e.g. température, disponibilité alimentaire), ce qui engendre une consommation des réserves énergétiques pour activer/mettre en place des mécanismes de tolérance et de défense (Palais et al., 2011).

- **Les biomarqueurs de génotoxicité**

Les sous-produits métaboliques dérivés des xénobiotiques bioaccumulés dans les tissus et les cellules, peuvent engendrer des effets négatifs sur l'intégrité du matériel génétique. Il arrive que, dans certains cas, les xénobiotiques organiques soient biotransformés en plusieurs métabolites mutagènes et cancérigènes par les enzymes du cytochrome P-450 et par la fonction époxyde-hydrase. Ces métabolites sont des sous-produits très réactifs ayant une grande affinité pour les sites nucléophiles des macromolécules cellulaires comme l'ADN (Leonardo et al., 1980 ; Lafaurie, 1991). La génotoxicité d'un xénobiotique peut être évaluée par plusieurs effets biologiques : *i*) l'altération de l'ADN au niveau moléculaire (Wogon & Gorelick, 1985), *ii*) la rupture de la molécule d'ADN (Lagdic & Caquet, 1997), *iii*) l'altération de l'expression des gènes (Malin et al., 1996).

De nombreux polluants organiques de l'environnement, tels que les HAPs, sont connus pour leur effet pro-cancérigène ou suspecté de l'être (Canova et al., 1998). En effet, ces xénobiotiques ou leurs métabolites (produits de biotransformation) possèdent une forte réactivité aux composés nucléophiles intracellulaires, et de ce fait, ils peuvent établir des liaisons covalentes avec ces biomolécules. Les adduits sont le résultat d'une liaison covalente des xénobiotiques ou de leurs métabolites à l'ADN provoquant ainsi des modifications qui peuvent avoir des répercussions importantes sur l'expression des gènes et l'altération de la transcription protéique. Ce biomarqueur est désigné dans plusieurs travaux comme un indicateur précoce des dommages à l'ADN dus à l'exposition à divers xénobiotiques génotoxiques (Van Der Oost et al., 2003).

Les micronoyaux sont des petits corps contenant de l'ADN situés près du noyau de la cellule pendant l'interphase de la mitose. Ces corps résultent à la fois d'une cassure des chromosomes et d'un mauvais fonctionnement du fuseau mitotique. Le type de mutation qui pourrait contribuer à la production des micronoyaux, inclut :

- des mutations au niveau des protéines du kinétochore, des centromères et de l'appareil du fuseau achromatique,
- Des ruptures non réparées du brin d'ADN induites par des agents génotoxiques de l'environnement (Udroiu, 2006).

Le test de fréquence de micro-noyaux assure la détection des effets clastrogéniques et aneugéniques subis par le matériel génétique ainsi que la génotoxicité causée par une large

variété de substances toxiques (Heddle et al., 1991). La détermination de la fréquence des micro-noyaux classée comme biomarqueur d'effet s'avère être une méthode simple et reproductible qui nous renseigne sur l'état de contamination à long terme d'un site donné (Bolognesi et al., 1999).

Actuellement, le test comète "COMET Assay" est largement utilisé pour l'évaluation de l'effet génotoxique de certains polluants. Dans cette technique, des cellules isolées sont directement insérées dans l'agarose dans lequel l'ADN nucléaire va subir une électrophorèse. Il en résulte que les fragments d'ADN clivés se séparent de la chromatine nucléaire. L'ADN marqué par des marqueurs fluorescents montre une « comète » dans laquelle la distance de la migration de l'ADN fragmentée de la masse de chromatine reflète le taux de dommage au niveau de l'ADN bicaténaire (Viarengo et al., 2007). Cette technique a été employée avec succès en utilisant des extraits d'ADN issus de poissons et de mollusques (Regoli et al., 2004; Siu et al., 2004). D'autres marqueurs de génotoxicité existent également et sont largement utilisés dans les études de biosurveillance, parmi lesquels, on peut citer les biomarqueurs nucléaires. Actuellement, la panoplie des caractéristiques nucléaires a été appliquée avec succès pour l'estimation des effets des radiations sur des embryons de poissons et l'effet cytotoxique de certains polluants chimiques sur les invertébrés et les végétaux (Arkhipchuk, 1995; Arkhipchuk et al., 2000; Arkhipchuk & Garanko, 2002). Les biomarqueurs nucléaires ont été proposés, également pour l'évaluation de la cytotoxicité des eaux (Arkhipchuk & Garanko, 2002). Par ailleurs, la combinaison des biomarqueurs nucléaires et le test de fréquence des micro-noyaux dans le même organisme étudié ont été proposés comme étant un outil efficace et intégratif pour les études de génotoxicité et de cytotoxicité dans les écosystèmes aquatiques (Arkhipchuk et al., 2000). Parmi la batterie des biomarqueurs nucléaires actuellement utilisés figurent également la fréquence des cellules binucléées, trinucélées, et le pourcentage des cellules apoptotiques. Ces cellules anormales résultent d'un dérèglement mitotique qui peut être dû à l'effet génotoxique de certains polluants chimiques et physiques.

- **Les biomarqueurs des perturbations endocriniennes (PE)**

Le terme PE désigne toutes les substances d'origine naturelle ou anthropique qui peuvent altérer le système endocrinien et par conséquent causer des perturbations à l'échelle de l'organisme, sa progéniture ou encore au niveau de la population (Vos et al., 2000). Les PE agissent principalement sur le développement des gonades, la maturité sexuelle et le mécanisme reproducteur des animaux exposés. *In situ*, la plupart des études qui ont mis en évidence des effets des PE ont été observées chez des animaux sauvages peuplant des milieux exposés à des rejets importants des STEP (Stations d'épuration) (Crain et al., 1997; Couillard et al., 1999; Hashimoto et al., 2000; Jobling et al., 1998; Noaksson et al., 2001). Plus de 550 substances naturelles ou de synthèse ont été identifiées comme PE avérés ou potentiels parmi l'ensemble des produits chimiques susceptibles d'être présents dans l'environnement selon le rapport de la commission des communautés européennes (CCE, 2001). Parmi ces substances, on dénombre les œstrogènes de synthèse, les phyto-œstrogènes (mycotoxines, lignines...) et un certain nombre de xéno-œstrogènes de natures différentes comme par exemple les biocides (pesticides, fongicides, herbicides), les alkyphénols et les PCBs (CCE, 2001 ; Whitehead & Rice, 2006). Chez les vertébrés, les PE les plus puissants sont les stéroïdes sexuels des vertébrés eux-mêmes, mais aussi leurs dérivés et analogues synthétiques car ils interagissent avec les récepteurs nucléaires impliqués dans l'activation des gènes sous contrôle hormonal (Depledge, 1999). Chez les bivalves l'effet des PE peut se manifester par l'altération de la balance des hormones stéroïdiennes, la perturbation de la production gonadique ou de la structure des gamètes, la perturbation du cycle gamétogénique et dans des cas plus aigus, le dysfonctionnement du dimorphisme sexuel (Ketata et al., 2008). L'implication des PE sur la fertilité des espèces menace d'un point de vue théorique l'équilibre total des peuplements et les recherches sur ce type de contaminants se sont avérées capitales ces dernières années (Okten et al., 2004 ; Sumpther & Johnston, 2005, Ketata et al., 2008). Pour mettre en évidence les effets des PE sur les organismes exposés, plusieurs biomarqueurs d'exposition à ce type de substances ont été développés. Le TBT (tributylétain), substance biocide utilisée dans les peintures antisalissure des bateaux induit le développement d'un pseudopenis non fonctionnel chez de nombreux gastéropodes femelles, parmi lesquels l'espèce la plus sensible est *Nucella lapillus*. Ce phénomène est appelé imposex ou encore « pseudohermaphrodisme » (Smith, 1971 ; Gibbs & Bryan, 1986 ; Gibbs et al., 1991). La masculinisation des femelles provoque la stérilité chez ces dernières et conduit dans certains cas à l'extinction locale des populations (e.g. cas des populations de *N. lapillus* en

mer du Nord) (Gubbins et al., 2010). Ce phénomène de masculinisation est spécifique au TBT et son intensité est proportionnelle au degré de contamination (Axiak et al., 2003). Aussi son utilisation comme biomarqueur de dommage spécifique du TBT a été proposée notamment chez *N. lapillus* en raison de son extrême sensibilité. En effet, des concentrations de 0,3 ng.L⁻¹, difficilement détectables par des analyses chimiques sont capables d'induire les premiers signes d'imposex (Huet et al., 2009).

La vitellogénine (Vtg), lipoprotéine précurseur de la synthèse du vitellus, est hautement impliquée dans le processus de la reproduction. Sa mise en évidence chez les mâles et les femelles immatures est considérée comme un signe d'une exposition à des substances à caractère oestrogénique (Wheeler et al., 2005). En effet, la Vtg est induite chez les individus par la présence d'oestrogènes ou de substances qui miment l'action des oestrogènes (e.g. les phyto-estrogènes ou les hormones de synthèse) (Aarab, 2004 ; Roméo & Giambérini, 2008). Ainsi, l'induction de la Vtg chez les poissons mâles est largement utilisée pour détecter leur exposition à des composés oestrogéniques (Ferreira et al., 2009).

Si les marqueurs d'exposition à des PE ont été bien développés chez les vertébrés notamment les poissons, on ne dispose pas encore à l'heure actuelle de véritables biomarqueurs d'exposition aux PE chez les bivalves. Un des objectifs de la présente thèse est d'optimiser ce genre de marqueurs pour les mollusques bivalves représentatifs des plages sableuses comme *D. trunculus*. Des variables biologiques en relation avec les processus de la reproduction (e.g. le cycle gamétogénique, les réserves énergétiques, l'indice de maturité sexuelle, le sex ratio et) peuvent être utilisées à cette fin.

II.1.3.2.6. L'approche multi-marqueurs

En biosurveillance, la majorité des milieux à étudier sont exposés à des mélanges complexes de contaminants chimiques. Cette complexité est d'autant plus remarquable dans le cas des milieux estuariens. Aussi l'analyse de la situation environnementale ne peut reposer sur une seule variable biologique d'autant plus que ces biomarqueurs ne sont pas pour la plupart spécifiques à un stress particulier. Parmi les stratégies proposées pour pallier l'insuffisance de l'application singulière d'un type de marqueur, figure l'utilisation conjointe d'une batterie de biomarqueurs de différentes classes (décrits dans la section II.1.3.2.2 du chapitre II) et

couvrant différents niveaux d'organisation biologique, (De Lafontaine et al., 2000; Moore et al., 2004; Galloway et al., 2006; Viarengo et al., 2007).

II.1.3.2.7. Les indices biomarqueurs

L'approche multi-marqueurs a été préconisée et est actuellement largement utilisée dans les études de biosurveillance (Amiard & Amiard-Triquet, 2008). L'expansion de ce genre d'approche a rendu de plus en plus nécessaire le développement de stratégies d'intégration et de modélisation des données issues de la réponse des biomarqueurs. La complexité des résultats, notamment dans des études de variation spatio-temporelle, empêche parfois de valoriser les données en un outil simple de diagnostic facilement exploitable. L'application des modèles statistiques comme les analyses multi-variés (Analyse Discriminante, Analyses en Composantes Principales, la corrélation canonique) a permis de mieux visualiser la contribution de chaque facteur (Beyer et al., 1996; Goksøyr et al., 1996; Astley et al., 1999; Schmolke et al., 1999; De Lafontaine et al., 2000; Machala et al., 2001; Roméo et al., 2003; Galloway et al., 2006).

Adams et al. (1993) ont proposé un indice d'évaluation de la santé (Health Assessment Index : HAI) qui est un indice quantitatif permettant des comparaisons statistiques de la santé des animaux évaluée à partir d'une base de données intégrant des marqueurs de lésions tissulaires principalement . Cet indice a été conçu pour évaluer l'état de santé général de populations de poissons dulcicoles originaires du Lac Hartwell et de la rivière Pigeon (Etats Unis d'Amérique). Narbonne et al. (1999) ont présenté, par la suite, une échelle de classification dans le cadre d'une approche multi-marqueurs. Ils ont utilisé une batterie de biomarqueurs d'exposition permettant de différencier les différents types de contaminants et d'en déterminer leur nature. Les signatures biologiques de plusieurs contaminants ont été établies au moyen d'études en laboratoire permettant ainsi de déterminer les niveaux de base de certaines biomarqueurs (e.g. AChE et GSTs). Des études de terrain ont permis de vérifier la sensibilité et la robustesse des protocoles développés. Pour chaque site étudié, chaque biomarqueur utilisé reçoit une valeur prédéfinie. L'échelle de pollution est alors construite en effectuant la somme des valeurs données pour chacun des biomarqueurs, à chaque site (Bouraoui, 2010). A chaque gamme de valeur correspond une couleur (bleu à rouge) permettant de visualiser les sites en fonction de leur niveau de pollution. Beliaeff & Burgeot

(2002) ont développé l'IBR (Integrated Biomarker Response index) qui consiste à calculer, au moyen de formules mathématiques le « poids » statistique de chaque biomarqueur dans la batterie utilisée et présenter la somme des « poids » en une seule valeur pour chaque groupe considéré (site par exemple). Les réponses des biomarqueurs sont alors illustrées par une représentation en radar, l'aire définie permettant de réaliser une réponse intégrée.

Par la suite, cet indice a été amélioré par Broeg & Lehotonen (2006) en divisant l'IBR calculé pour chaque groupe étudié par le nombre de biomarqueurs utilisés. Cette modification a permis par la suite de visualiser clairement la différence entre les groupes. L'indice d'évaluation d'effet biologique (BAI : Bioeffect Assessment Index) a été proposé (Broeg et al., 2005) afin d'estimer la situation de la contamination multifactorielle des milieux côtiers en intégrant la réponse de biomarqueurs de stress général de différents niveaux d'organisation biologique. Ensuite, Yeom & Adams (2007) ont proposé un indice plus complexe applicable pour l'évaluation de l'état de santé environnemental basé sur une variété de paramètres à différents niveaux d'organisation biologique (sub-individuel, individuel populationnel, et communautés). Cet indice appelé AEHI (Aquatic Ecosystem Health Index) intègre en effet les résultats de calcul des scores métriques (issus d'une grande variété de mesures biométriques et d'indices biologiques), les résultats issus des représentations en radar des réponses de l'échelle sub-organismale déjà accessibles par l'IBR (Beliaeff & Burgeot, 2002) et enfin l'ensemble des paramètres populationnels disponibles (distribution des fréquences de taille, relations taille-âge...) des différentes espèces de poissons vivant en communautés dans l'écosystème considéré. Il est clair que cet indice garantit une véritable évaluation de l'état de santé d'un écosystème en intégrant plusieurs niveaux d'organisation biologique (du niveau sub-individuel aux communautés). En dépit du grand intérêt de cet indice, il est loin d'être un outil simple de biosurveillance comme le précisent ses auteurs et doit encore être amélioré pour s'adapter aux contraintes des études de surveillance plus sensibles et moins coûteuses. Hagger et al. (2008) ont proposé un nouvel indice issu d'une intégration et d'un raffinement de deux anciens indices : le BAI (Broeg et al., 2005) et le HAI (Adams et al., 1993). Cet indice appelé BRI (Biomarker Response Index) a été élaboré dans le cadre de la Directive 2000/60/EC (European Commission's Water Framework Directive). Tout d'abord, les réponses d'une batterie des biomarqueurs standardisés sont mesurées chez des moules (*Mytilus edulis*) collectées dans plusieurs milieux estuariens. Ensuite ces résultats sont comparés aux valeurs d'une base de données déjà établie (par l'incorporation de l'ensemble des résultats issus d'études antérieures). Finalement, un classement selon un score

d'évaluation du risque est attribué pour chaque site d'étude. Cet indice est principalement adapté à *M. edulis*, espèce largement utilisée dans les études de surveillance et bénéficiant d'une large gamme d'études écotoxicologiques.

Viarengo et al. (2007) ont proposé une approche « non coûteuse » de biosurveillance qui a intégré les avancées déjà acquises dans le domaine de l'utilisation des biomarqueurs chez les bivalves dans le cadre d'une approche en deux temps « The two-tier approach » qui consiste à utiliser tout d'abord des marqueurs de stress général non coûteux et à haute significativité comme le taux de mortalité ou la SML. Ensuite, une série de biomarqueurs cellulaires et biochimiques variés et bien ciblés (validation et pertinence) est proposée (Scope of growth, fréquence des micro-noyaux, lipides neutres, dommage à l'ADN, « stress on stress », AChE, MTs, TBARs). L'intégration des résultats est assurée par un système expert « Expert System » qui a été développé par le même groupe de recherche dans le cadre du projet européen BEEP (Biological Effects of Environmental Pollutants in marine coastal ecosystems) (Dagnino et al., 2007). Ce système est capable d'intégrer une batterie de biomarqueurs d'exposition et d'effets, mesurés à différents niveaux (de la molécule à l'organisme) et de prendre en compte leurs interférences possibles. Le système expert classe ensuite les niveaux de syndromes de stress induits par une pollution. En effet, chaque biomarqueur est classé selon le degré d'altération (DA) allant d'un état de « non altération » (NA) à un état de large altération (LA). Le système intègre des fonctions algorithmiques basées sur des relations « cause-effet » qui permettent de classer les niveaux de contamination des groupes (par exemple sites) allant d'un état de bonne santé (A), jusqu'à un état pathologique (E) en passant par des états intermédiaires (B : stress faible, C : stress moyen, D : stress élevé).

Initialement appelé DISAV Expert system, ce logiciel à interface graphique simple a fait l'objet de plusieurs améliorations, et est actuellement appelé « MusES » (The Mussel Expert System).

II.1.3.2.8. La problématique du lien entre les différents niveaux de l'organisation biologiques en surveillance environnementale

La figure 6 (Adams et al., 1989) décrit la nature et l'aspect chronologique des réponses biologiques en fonction des niveaux d'organisation biologiques. Suite à l'exposition à la pollution chimique, les premiers niveaux à être touchés (moléculaires, cellulaires et moléculaires) sont ceux qui sont caractérisés par une faible pertinence écologique. Il est clair que les effets à des niveaux d'organisation biologique élevés (population, communauté écosystème) sont chronologiquement précédés d'effets à des niveaux d'organisation biologique beaucoup plus faible (moléculaire, cellulaire, individuel). Dans le cas où seulement certaines macromolécules sont affectées par la pollution, cela peut être sans conséquence au niveau cellulaire ou tissulaire. Dans le cas d'une exposition croissante, un plus grand nombre de macromolécules sont affectées, des altérations cellulaires ou tissulaires vont probablement se produire. De la même sorte, si un nombre suffisant de cellules est encore fonctionnel, les fonctions majeures peuvent être maintenues ; l'individu est capable de tolérer le stress chimique. Au niveau supra-individuel (populations et communautés), le facteur temps devient de plus en plus important, puisque les effets à ce niveau ne sont clairs et mesurables qu'après un certain temps d'exposition (échelle annuelle). Dans une situation pareille, il est pratiquement impossible d'attribuer précisément les effets observés à un stress spécifique parce que les modifications environnementales ont été multiples et ont potentiellement agi en interaction. Les niveaux population et communauté, possèdent des caractéristiques émergentes par rapport aux niveaux inférieurs (sub-individuel et individuel). Ces caractéristiques émergentes sont le résultat d'interactions complexes entre individus et populations. De ce fait, ces niveaux ne peuvent pas être définis comme la simple sommation des niveaux hiérarchiques immédiatement inférieurs. Tout niveau d'organisation biologique est susceptible de « compenser » des dommages subis par des perturbations. Ainsi, le temps de latence dans la réponse au niveau écologique peut s'expliquer par l'accumulation successive de niveaux hiérarchiques et donc d'aptitudes à compenser les perturbations. Les changements observés dans la composition spécifique d'une communauté sont le reflet de l'évolution d'une situation perturbée depuis longtemps. Par contre, un changement au niveau sub-individuel (e.g. biochimique ou cellulaire) constitue une réponse biologique précoce et peut être considéré comme système d'alerte. Il est souvent difficile de mettre en relation ces réponses précoces et des conséquences aux niveaux d'organisation biologique plus élevés

(population, communauté). Dans le schéma d'Adams et al. (1989), la bioénergétique permet de faire le lien entre les niveaux sub-individuels et populationnels. Quant à la reproduction, elle assure une transversalité tout au long des différents niveaux d'organisation biologique. Les recherches actuelles en écotoxicologie tendent à mieux caractériser les liens entre les réponses au niveau sub-individuels, les plus précoces et sensibles, et les réponses au niveau supra-individuels ayant plus de pertinence et de significativité écologique (Forbes et al., 2006 ; Amiard-Triquet & Rainbow, 2009). L'étude de la structure et de la dynamique de populations exposées chroniquement à des polluants de l'environnement pourra être un moyen d'investigation utile des liaisons entre différentes échelles d'organisation biologique.

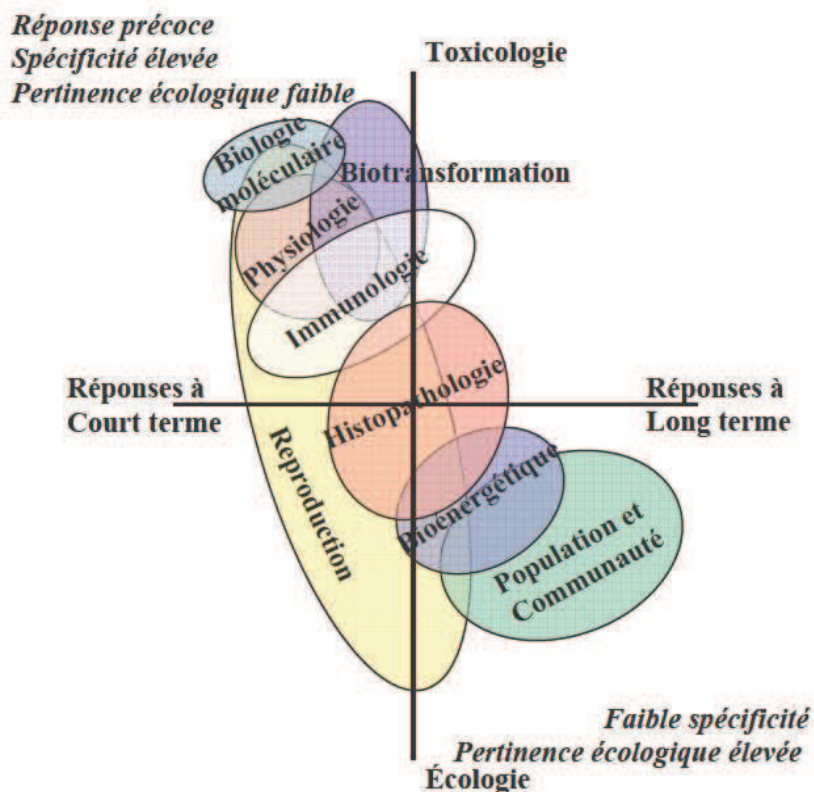


Figure 6: Organisation, propriétés et aspect chronologique des réponses biologiques aux stress induits par l'exposition à la pollution (Adams et al., 1989, modifié).

II.1.3.2.9. La dynamique des populations : vers une meilleure représentativité écologique ?

La dynamique des populations est définie comme étant l'étude quantitative des variations d'abondance des populations dans le temps et/ou l'espace et des facteurs qui en sont responsables. En d'autres termes, la dynamique des populations vise à quantifier et à déterminer la croissance, la diminution ou la stabilité de la population, ainsi que les modifications de sa structure (Jacquet, 2000). En tant que discipline scientifique, la dynamique des populations s'est construite par fusion de diverses approches, empiriques comme théoriques. Elle s'appuie sur la notion centrale de système population- environnement. On considère alors les individus d'une population et les interactions les plus directes avec leur environnement comme un système biologique raisonnablement isolé, en première approximation, d'un réseau d'interactions plus complexes au niveau de la communauté (ensemble d'espèces apparentées d'un point de vue phylogénétique ou fonctionnellement dans un même habitat) ou de l'écosystème (ensemble des êtres vivants et de leurs interactions biotiques et abiotiques). Le système population-environnement reste cependant encore un objet biologique complexe. Pour tenter d'en comprendre les mécanismes, la dynamique des populations « moderne » recourt de façon permanente à la modélisation. L'étude de la dynamique des populations intègre donc plusieurs paramètres tels que la croissance, le taux de natalité, de fécondité et de mortalité. Ces mêmes facteurs sont eux-mêmes soumis aux interactions plus complexes avec l'environnement (facteurs biotiques et abiotiques). En milieu marin, on distingue en général la dynamique des populations halieutiquement exploitées et la dynamique des populations non exploitées. Les recherches dans le premier axe (populations halieutiquement exploitées) visent principalement à définir des termes liés à la gestion des stocks et l'aménagement des stratégies de pêche en relation directe avec l'aspect législatif encadrant les activités d'exploitations (Laurec & Le Guen, 1981).

Malgré les recommandations issues des rapports et des activités des perspectives de la bio surveillance environnementale insistant sur la nécessité d'inclure l'étude de la dynamique des populations comme étape nécessaire pour comprendre le comportement des populations suite à une exposition à la pollution mixte et chronique (Van Der Oost et al., 2003 ; Forbes et al., 2006 ; Amiard-Triquet & Rainbow, 2009), les travaux publiés dans cet axe sont malgré tout peu nombreux notamment pour les mollusques bivalves. Les travaux qui se sont intéressés à relier les réponses des organismes au niveau individuel (indices de condition, fécondité, réserves énergétiques) à celles au niveau populationnel, ont été effectués principalement chez

le polychète marin *Nereis diversicolor* (Durou et al., 2007), le lombricoïde *Aporrectodea caliginosa* (Maboeta et al., 2003) et chez certaines espèces de poissons (Yeom & Adams, 2007).

Pour comprendre ou interpréter les éventuelles modifications qui peuvent avoir lieu au niveau populationnel, il est nécessaire tout d'abord de rechercher les paramètres pertinents à étudier et à appliquer dans ce genre d'investigation. L'étude de la structure des populations par classes d'âge, les modalités de recrutement, la croissance pondérale ou longitudinale ainsi que la dynamique des cohortes identifiées représentent des paramètres adaptés pour qualifier et quantifier ce genre de perturbations écologiques dont la pollution peut être la cause.

II.2. Les milieux estuariens et leurs équivalents

II.2.1. Concept et évolution des définitions

L'embouchure d'un cours d'eau dans la mer représente un domaine intermédiaire où s'affrontent les influences marines et dulcicoles. Les cours d'eau (fleuves, rivières) apportent une panoplie de matériaux (sédiments, éléments nutritifs...) qui s'accumulent et gagnent la mer; cette dernière déblaie et remanie ces matériaux. Le résultat géomorphologique dépend du rapport de force/interaction existant entre la mer et le cours d'eau. Lorsque ce dernier a une influence dominante, il construit un delta et lorsque la mer est dominante, l'embouchure est un estuaire. Il existe des intermédiaires entre ces deux types. En 1967, Pitchard définit un estuaire comme étant : « une masse d'eau côtière semi-fermée, qui est en libre connexion avec la mer et dans laquelle l'eau de mer est mélangée à une quantité mesurable d'eau douce provenant du drainage continental ». D'un point de vue géomorphologique, certains auteurs contestent cette définition (Elliott & McLusky, 2002 ; Potter et al., 2010). Fairbridge (1980), propose l'explication suivante pour définir un estuaire : « un bras de mer pénétrant le lit d'une rivière jusqu'à la limite de la marée dynamique, pouvant généralement être divisé en trois secteurs : (i) un estuaire marin ou estuaire aval en libre connexion avec la mer ; (ii) un estuaire moyen sujet à un intense mélange des eaux douces et salées ; (iii) un estuaire amont ou fluvial, caractérisé par l'eau douce mais sujet au balancement des marées. Les limites entre ces zones étant variables et sujettes aux constants changements de débit du fleuve. Récemment, Potter et al., (2010) proposent une actualisation du concept « estuaire » en intégrant l'influence de la variation saisonnière des régimes hydrologiques et les

spécifications écologiques : « Un estuaire est une zone côtière partiellement close qui est en permanence ou périodiquement, ouverte sur la mer et qui reçoit au moins une décharge périodique d'eau douce (rivière, fleuve). Sa salinité est donc généralement inférieure à celle de l'eau de mer naturelle et varie dans le temps et sur toute sa longueur. Un estuaire peut devenir hypersalin dans les régions où la perte d'eau par évaporation est élevée et les apports d'eau douce et les marées sont négligeables. Les estuaires sont donc considérés comme des écosystèmes uniques, ce qui dans le cas des poissons, par exemple, sont peuplés par des espèces qui représentent collectivement un ensemble particulier d'association écologique. »

II.2.2. Caractéristiques écologiques et vulnérabilité

Les estuaires sont donc des zones de transition écologiques caractérisées principalement par l'interaction entre eau douce et eau marine (Attrill & Rundle, 2002). Cette particularité leur permet d'assurer un rôle essentiel dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du phosphore (Cloern, 2001), dans la production et le relargage de CO₂ dans l'atmosphère (Frankignoulle et al., 1998). Les estuaires peuvent être des aires de ponte, de nourricerie, d'alimentation ou de transit pour plusieurs populations de mollusques, crustacés, poissons et oiseaux (Elliott & Hemingway, 2002). Ainsi de nombreuses espèces présentent des écophases de durée variable : les organismes autochtones y réalisent l'ensemble de leur cycle de vie et pour les espèces amphihalines ou euryhalines, les estuaires peuvent être des aires de ponte, de nourricerie, d'alimentation ou de transit (Elliott & Hemingway, 2002).

Les estuaires sont considérés comme étant des écosystèmes à haute productivité écologique qui se traduit par une richesse des relations trophiques entre les différents peuplements. Outre leur rôle écologique, les estuaires ont été depuis toujours des zones d'exploitation anthropique (pêche, installations portuaires et industrielles, urbanisation intensive). Ils contribuent à près de 33% de la valeur économique des zones côtières (soit 20 % de la valeur économique totale des écosystèmes marins), bien qu'ils ne représentent que 6% de la surface de ces zones (soit 0,5% de la surface totale des écosystèmes marins), (Costanza et al., 1997). La pression anthropique ne cesse d'augmenter sur ses écosystèmes avec une population mondiale vivant à moins de 100 km estimée à 61% en 1998 et qui devrait atteindre les 75 % en 2025 (Alongi, 1998). Les estuaires sont par ailleurs considérés comme des habitats à risque en raison de cette interférence milieu hydrique/milieu marin. En plus de la variabilité naturelle (salinité, teneur en oxygène...), les écosystèmes estuariens sont ainsi le siège de nombreuses altérations biologiques, chimiques et physiques qui peuvent menacer l'équilibre fragile de ces biotopes

en réduisant la diversité inter et intra spécifique, la mobilisation excessive des composantes biotiques, l'introduction d'espèces non indigènes ainsi que l'accumulation des xénobiotiques (McLusky & Elliott., 2004; Ducrotoy, 2010; Modéran, 2010). L'apport permanent des apports d'eau via les fleuves et les cours des rivières favorise l'acheminement dans ces milieux de divers effluents anthropogéniques souvent chargés de polluants de tous genres : dioxines, HAPs, PCBs, métaux traces, produits phytosanitaires, molécules pharmaceutiques et des PE (Thomas & Hilton, 2004; Munaron et al., 2006 ; Durou et al., 2006 ; Mouneyrac et al., 2006, 2008, 2009).

II.2.3. Les oueds en Tunisie

L'étymologie du terme « oued » ou encore « wadi » est arabe et désigne en Afrique du Nord une rivière et dans les régions arides un cours d'eau temporaire (Le Petit Robert, dictionnaire de la langue française, 2002). Si l'on s'intéresse à l'aspect hydrologique, la seule différence entre un fleuve et un oued est la permanence des apports en eau. Les eaux de ruissellement des zones limitrophes se collectent dans ces oueds et rejoignent selon le cas les rivières, les barrages (ou lacs collinaires) ou se déversent directement dans la mer. Les oueds jouent un rôle important dans la collecte des eaux pluviales et l'alimentation des eaux de surfaces. En Tunisie par exemple, plus de 29 barrages, 190 barrages collinaires et 720 lacs collinaires ont été aménagés pour mobiliser et gérer au mieux les eaux de surface provenant principalement des oueds, avec un volume total d'eau stockée estimé à 1530 millions de m³ (Agence Nationale de Protection de l'Environnement, Tunisie : ANPE, 2006).

II.2.4. Cas du golfe de Tunis

Malgré la construction de barrages tout le long des transects des oueds, le régime hydrologique du golfe de Tunis est commandé principalement par le réseau exoréique le plus important de la Tunisie : les oueds Medjerda et Méliane. Deux autres oueds non négligeables, mais de moindre importance : l'oued Soltane et l'oued Bézirk, viennent aussi se jeter dans le golfe (El Arrim, 1996). Selon l'importance du débit de ces oueds en fonction des crues et des apports pluviaux, des zones d'embouchure sur la mer se sont développées au cours du temps

au niveau du golfe de Tunis. Les caractères principaux des oueds se déversant dans le golfe de Tunis sont présentés ci-dessous:

- ***L'oued Mejerda***

L'oued Mejerda est le cours d'eau le plus important de la Tunisie avec un bassin versant de l'ordre de 23 500 km² et une longueur de 430 km. Son débit liquide moyen est de 29 m³.s⁻¹ son débit solide est en moyenne de 10 g.L⁻¹; ceci représente un apport solide annuel au golfe de Tunis de 17 millions de tonnes (Pimienta, 1959). Cet apport, estimé actuellement à 9 millions de tonnes, a diminué au cours du temps suite à l'édification des barrages Sidi Salem et Mallégué (Ben Mammou, 1998). Les apports solides de l'oued Mejerda dans le golfe de Tunis seraient actuellement de 5 millions de tonnes (Added et al., 2003). La composition chimique des eaux de l'oued Mejerda montre généralement des concentrations faibles en métaux (Added et al., 2003). Toutefois, des concentrations plus importantes ont été localement notées notamment en aval des laveries minières, des rejets urbains et industriels et aux niveaux des eaux de drainages chargées de produits couramment utilisés dans l'agriculture (Ben Hamza, 1994).

- ***L'oued Méliane***

L'oued Méliane draine un bassin versant de 2 280 km² et a une longueur de 160 km. Il a un apport liquide de l'ordre de 50 Mm³.an⁻¹, avec une charge solide de l'ordre de 20 400 T.an⁻¹ (Ben Mammou, 1998). Les deux ouvrages hydrauliques (Barrage El Kébir et Bir M'chergua) construits dans le bassin versant ont réduit considérablement les apports solides et liquides au niveau du golfe de Tunis. Ses eaux sont très polluées par les rejets de 50% des eaux usées à l'état brut dans l'oued et surtout dans sa partie aval (Ben Cherrada, 1997).

- ***L'oued Soltane***

L'Oued Soltane a un bassin versant de 100 Km² et traverse d'amont en aval des collines marno-calcaires, la plaine alluviale de Soliman et les dunes littorales, avant de se déverser dans le petit golfe de Tunis (baie de Tunis) au niveau de Borj Cedria. Son apport solide annuel est estimé à 0,3 million de tonnes (Zeggaf-Tahri, 1999).

- ***L'oued Bezirk***

Prenant naissance sur le front Ouest de Jbal Abderhman (Cap Bon, Nord Est de la Tunisie), l'oued Bezirk débouche entre les dépressions salées de Soliman et Ain Okor (Kourbous : station thermique, Cap Bon). Il a un bassin versant de 84 Km² et reçoit deux affluents : L'oued Houass et l'oued Mellouka. L'apport solide annuel est estimé à 0,06 millions de tonnes (Zeggaf-Tahri, 1999).

II.3. Utilisation des mollusques bivalves en écotoxicologie

Au cours des années, divers organismes animaux de différentes classes ont été utilisés dans les programmes de biosurveillance. Les mollusques ont été les premiers organismes sentinelles utilisés dans les études de surveillance de la contamination chimique des écosystèmes aquatiques marins et dulçaquicoles. Etant des organismes benthiques, les mollusques ont un rôle clé dans la structure des communautés. Leur position trophique en tant que consommateurs primaires permet d'assurer un rôle de transition pour l'ensemble de la chaîne alimentaire des écosystèmes aquatiques et par conséquent ils participent au maintien de l'équilibre des écosystèmes aquatiques (Reice & Wohlenberg 1993). Parmi les différentes espèces de mollusques, les bivalves représentent de bons candidats pour être utilisés en tant qu'organismes sentinelles pour plusieurs raisons, notamment leur sédentarité, leur large distribution géographique, leur mode d'alimentation filtreur de type suspensivore, leur capacité d'accumulation des contaminants (Viarengo et al., 2007, Zorita et al., 2007, Berthet, 2008). D'un point de vue pratique, les bivalves sont faciles à collecter et à maintenir au laboratoire en raison de leur bonne résistance aux stress des prélèvements et de manipulation (Narbonne & Michel., 1997 ; Cajaraville et al., 2000, Rank et al., 2005).

Ces critères ont permis de valider l'utilisation des mollusques bivalves pour la surveillance des différents écosystèmes marins : les écosystèmes côtiers (Cajaraville et al., 2000; Dailianis et al., 2003; Damiens et al., 2007 ; Banni et al., 2009 ; Raftopoulou & Dimitriadis, 2010), les écosystèmes estuariens (Nasci et al., 2002 ; Mouneyrac et al., 2008 ; Bergayou et al, 2009 ; Boldina-Cosqueric et al., 2010) et les écosystèmes lagunaires (Dellali et al., 2001, 2004 ; Matozzo et al., 2011). D'un point de vue quantitatif, les mollusques bivalves représentent le

groupe le plus étudié dans les programmes de biosurveillance marine (Viarengo & Canesi, 1991; Alves et al., 2002; Ricciardi et al., 2006; Zanette et al., 2006).

Cependant, initialement la plupart des mollusques bivalves utilisés étaient des organismes représentatifs des substrats rocheux, tels que la moule *M. galloprovincialis*, ce qui ne permet pas de surveiller l'état de santé des plages sableuses, biotopes à grande importance d'un point de vue écologique et socio-économique (Moukrim et al., 2004). Outre les avantages en commun des bivalves (sédentarité, pouvoir accumulateur, adaptation...); leur choix en biosurveillance s'avère principalement lié aux caractéristiques de l'écosystème à surveiller. Ainsi, plusieurs espèces de bivalves ont été testées et utilisées en milieu marin. Les familles des mytilidés, des ostreidae, des veneridae et des mydiae sont par ailleurs les plus communément utilisées dans ce genre d'études.

Le tableau 1 présente quelques exemples de travaux de biosurveillance utilisant diverses espèces de mollusques bivalves marins.

Espèce	Date et lieu de l'étude	Paramètres mesurés	Nature de l'étude	Références
<i>Donax trunculus</i>	Baie d'Agadir, Maroc (1995-1997).	AChE, GST, TBARs.	Etude <i>in situ</i> , suivi saisonnier.	Moukrim et al., 2004.
	Golfe de Tunis, Tunis (2008-2009).	AChE, Cat, GST, TBARs, LDH, Structure et dynamique des populations, Réserves énergétiques, cycle de reproduction.	Etude <i>in situ</i> , suivi saisonnier.	Tlili et al., 2010, 2011.
	Mer de Marmara, Turquie (2005-2006).	Métaux traces.	Etude <i>in situ</i> , comparaison interspécifique.	Ozden et al., 2008.
	Estuaire des rivières Tinto et Odiel, Espagne (2002).	PCBs, dioxines.	Etude <i>in situ</i> , comparaison interspécifique.	Bordajandi et al., 2006.
	Côtes sud espagnoles (2003).	Métaux traces.	Etude <i>in situ</i> , comparaison interspécifique.	Usero et al., 2004.

Chapitre II : Synthèse bibliographique

	Côtes mauritaniennes (1987).	Métaux traces.	Etude <i>in situ</i> .	Roméo & Gnassia-Barelli, 1988.
<i>Perna perna</i>	Baie d'Agadir, Maroc (1995-1997).	AChE.	Etude <i>in situ</i> , suivi saisonnier.	Najimi et al., 1997.
	Côtes marocaines (2001-2002).	Métaux traces.	Etude <i>in situ</i> , suivi saisonnier.	Banaoui et al., 2004.
<i>Perna Viridis</i>	Plage de Bambolin, Goa, Inde (2006).	Stress oxydant, perdoxydation des lipides membranaires.	Etude <i>in situ</i> , suivi saisonnier.	Verlecar et al., 2008.
	Littoral de Hong Kong Chine (2003).	PCBs, HAPs, stress oxydant, indices de condition.	Biosurveillance active.	De Luca-Abbott et al., 2005.
<i>Ruditapes decussatus</i>	Golfe de Gabès, Tunisie (2002-2008).	MTs, métaux traces, cycle de la reproduction.	Etude <i>in situ</i> , suivi saisonnier.	Hamza-Chaffai et al., 2003 ; Smaoui-Damak et al., 2003, 2004, 2006, 2007, 2009.
	Lagune de Bizerte, Tunisie (1998-1999).	GST, AChE, Cat.	Etude <i>in situ</i> , suivi saisonnier.	Dellali et al., 2004.
	Littoral tunisien	Stress oxydant, AChE MTs, Métaux traces, dommages de l'ADN, fréquence des micro-noyaux (FMN).	Etude <i>in situ</i> , suivi saisonnier	Banni et al., 2003, 2005 ,2009 ; Jebali et al., 2007.
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Lagune de Bizerte, Tunisie (1998-1999).	AChE.	Etude <i>in situ</i> , suivi saisonnier.	Dellali et al., 2001.
	Golfe de Thermaikos, Grèce (2004).	Métaux traces, MTs, AChE, SML, lipides neutres, accumulation des lipofuscines, enzymes digestives.	Etude <i>in situ</i> , approche multi-marqueurs.	Raftopoulou & Dimitriadis, 2010.

	Littoral grec (2001).	Lipides neutres, AChE, AMPc, FMN.	Etude <i>in situ</i> , approche multi-marqueurs.	Dailianis et al., 2003.
	Littoral grec (2000).	Stress on stress, SML, FMN.	Etude <i>in situ</i> , approche multi-marqueurs.	Koukouzika & Dimitriadis, 2005.
	Littoral grec (2002-2007).	Stress oxydant, indices biomarqueurs.	Biosurveillance active, approche multi-marqueurs.	Pytharopoulou et al., 2008.
<i>Mytilus edulis</i>	Golfe du Maine, Etats Unis (1991-1997).	Résidus de pesticides, HAPs, PCBs, indices de condition.	Suivi <i>in situ</i> , étude pionnière sur le monitoring chimique.	Chase et al., 2001.
	Baie de Køg, sud de Copenhague, Danemark (1999-2001).	Métaux traces, dommages à l'ADN.	Suivi <i>in situ</i> , mensuel.	Rank et al., 2005.
	Côtes sud ouest, Islande (2004).	Histochimie, SML, MTs, Cycle de reproduction.	Campagne d'échantillonnage ponctuelle (juillet, 2004).	Da Ros et al., 2007.
	Baie d'Ushuaia Canal Begal, Argentine (2007).	Métaux traces, stress oxydant, peroxydation lipidique.	Biosurveillance active, variations saisonnières.	Giarratano et al., 2011.
<i>Scrobicularia plana</i>	Estuaire de l'Oued Souss, Maroc (2001-2003).	Cat, TBARs, indice de condition.	Etude <i>in situ</i> , suivi saisonnier.	Bergayou et al., 2009.
	Estuaires de la Seine et de la Loire (2005-2006).	Réserves énergétiques, hormones stéroïdiennes, indices de condition, cycle de reproduction.	Etude <i>in situ</i> , périodes clés du cycle de reproduction.	Mouneyrac et al., 2008.
	Estuaires de la Loire et du Belon, France (juillet 2008).	MT, GST, LDH, AChE, réserves énergétiques, enzymes digestives, test d'enfouissement, indice de condition, métaux traces.	Etude <i>in situ</i> , approche multi-marqueurs, étude de l'effet de certains facteurs de confusion (salinité et taille).	Fossi-Tankoua et al., 2011.

Chapitre II : Synthèse bibliographique

<i>Ruditapes philippinarum</i>	Lagune de Venise, Italie (2009-2010).	HAPs, PCBs, stress oxydant, AChE, marqueurs immunologiques, indice de condition.	Etude <i>in situ</i> , approche multi-marqueurs.	Matozzo et al., 2011.
<i>Chamelea gallina</i>	Côtes sud espagnoles (2003).	Métaux traces.	Etude <i>in situ</i> , comparaison interspécifique.	Usero et al., 2005.
<i>Cerastoderma edule</i>	Estuaire de l'Oued Souss, Maroc (2001-2003).	Cat, TBARs, indice de condition.	Etude <i>in situ</i> , saisonnier.	Bergayou et al., 2009.
	Lagunes Moulay Bou Selham et Sidi Moussa, Maroc (1992-1995).	Métaux traces.	Etude de bioaccumulation <i>in situ</i> .	Cheggour et al., 2001.
<i>Crassostrea gigas</i>	Côtes atlantiques françaises (2002-2004).	HAPs, PCBs, métaux traces, stress oxydant, TBARs, AChE, MTs.	Biosurveillance active.	Quiniou et al., 2007.
	Cantabria, baie de Biscay, Espagne (2007).	Biométrie, allométrie, chimie des coquilles.	Etude <i>in situ</i> .	Higuera-Ruiz & Elorza, 2009.
	Côtes Atlantiques, Maroc (2004-2005).	Métaux traces.	Comparaison interspécifique.	Maanan, 2008.
<i>Mya arenaria</i>	Estuaire du Saint Laurent, Québec (1999).	Paramètres de la reproduction, réserves énergétiques.	Suivi <i>in situ</i> , mensuel.	Etchian et al., 2004.
	Littoral québécois, Canada (1997).	Domages à l'ADN, peroxydation lipidique, VTg, test de phagocytose, MTs, marqueurs cellulaires.	Echantillonnage ponctuel, étude multiparamétrique (juin, 1997).	Chèvre et al., 2003.
	Valée du Saguenay Fjord et l'estuaire Saint Laurent, Québec, Canada (2005).	Marqueurs immunologique et cytologiques, enzymes énergétiques, indices de reproduction, indices individuels.	Etude multiparamétrique.	Gagné et al., 2003, 2008.

	L'estuaire du Saint Laurent, Québec, Canada (2008).	Stress oxydant, MTs, dommages à l'ADN, Vtg, marqueurs immunologiques.	Etude <i>in situ</i> .	Gagné et al., 2009.
	Valée d'Odense, Danemark et l'estuaire du Saint Laurent, Québec, Canada (2003).	Métaux traces, TBT, peroxydation lipidique, dommages à l'ADN, stress oxydant, paramètres digestifs, MTs.	Etude <i>in situ</i> , approche multi-marqueurs	Gagné et al., 2005.
	Estuaire du Saint Laurent, Québec, Canada (2001).	Paramètres de la reproduction, hormones gonadiques, indices de condition, VTg, TBT.	Etude <i>in situ</i> , étapes clés de la reproduction	Gagné et al., 2003.
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Estuaire de Piraqué-Mirim, Brésil (2003-2004).	Histopathologie, indices de condition, enzymes musculaires, AChE.	Etude <i>in situ</i> , suivi saisonnier.	Valdez Domingos et al., 2007.
	Estuaire Potengi, Natal, Brésil (1997).	Métaux traces.	Etude de la distribution spatiale.	Silva et al., 2001.

Table 1 : Exemples de travaux de biosurveillance utilisant diverses espèces de mollusques bivalves marins.



***Chapitre III : Le modèle
biologique *Donax trunculus****

Chapitre III : Le modèle biologique *Donax trunculus*

III.1. Classification

Règne : Animal

Embranchement : Chordata

Phylum : Mollusques

Classe : Bivalves

Sous classe : Prosobranches

Ordre : Néogastéropodes

Famille : Donacidae

Genre : *Donax*

Espèce : *trunculus*

Nom commun: Flion tronqué, telline, haricot de mer

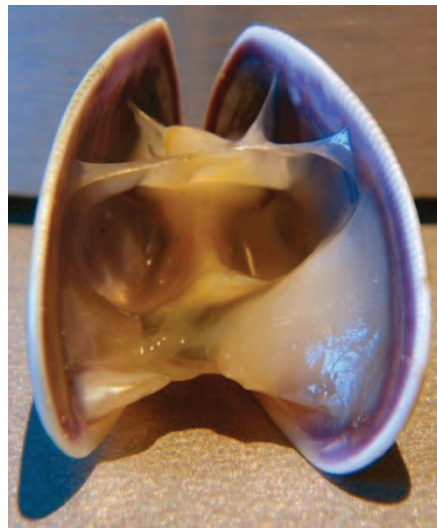


Figure 7: *Donax trunculus* (Linnaeus, 1767) (Photos INSTM).

D.trunculus (Figure 7) est un mollusque bivalve de la famille des Donacidae, sa distribution s'étend de la Mer Méditerranée, la Mer noire, aux côtes Atlantiques du Sénégal ainsi qu'à celles Atlantiques nord de la France (Ramon et al., 1995; Deval, 2009).

III.2. Caractères Morphologiques

D.trunculus est un bivalve à coquille solide peu renflée, allongée triangulaire et inéquilatérale, avec la partie postérieure plus courte que la partie antérieure. Cette coquille est fortement déclive en arrière des crochets et tronquée à l'extrémité postérieure. Elle est légèrement inéquivalve (le bord dorsal antérieur est un peu plus haut à la valve gauche qu'à la valve droite et le plan de jonction des valves faiblement flexueux ventralement), lisse au toucher de couleur jaune pâle à beige vif ou brunâtre. Elle est uniforme extérieurement ou variablement ornée de bandes concentriques et/ou de rayons plus ou moins violacés. L'intérieur de la coquille est souvent de couleur violette et maculé de blanc, brunâtre ou orangé (Fiches FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1987). Chaque valve porte dans sa face interne deux empreintes visibles de muscles adducteurs antérieur et postérieur presque de même taille, un sinus palléal profond, peu ascendant dorsalement. La valve droite présente deux dents cardinales et deux latérales. La valve gauche porte deux dents cardinales divergentes séparées par une large fossette et deux dents latérales; la dent antérieure est peu développée par rapport à la postérieure.

III. 3. Anatomie

Les deux valves (Figure 8) de *D.trunculus* qui sont formées par contraction de deux muscles adducteurs, renferment un corps mou, non segmenté, comprimé latéralement sans tête différenciée (acéphale) ni appareil masticateur; il est enveloppé d'un manteau; le repli tégumentaire étant constitué de deux lobes latéraux qui secrètent et supportent chacun une valve. Ces lobes palléaux, fusionnés dorsalement entre eux et avec la masse viscérale, délimitent ventralement une vaste cavité palléale interne en communication avec le milieu extérieur. Ils sont rattachés étroitement aux valves le long d'une ligne palléale proche de la marge ventrale de la coquille. Les bords externes du manteau sont soudés donnant ainsi vers l'arrière deux siphons séparés et relativement courts: l'un inhalant, ventral, assurant l'entrée

de l'eau dans la cavité palléale, l'autre, exhalant, dorsal faisant sortir l'eau vers l'extérieur. Entre chaque partie du manteau et du corps, s'insère une branchie (cténidie) de type eulamellibranche qui assure la respiration et participe également à la collecte de la nourriture par la création de courants d'eau à l'intérieur de la cavité palléale. La digestion est assurée par un estomac globuleux pourvu d'un caecum postérieur où s'édifie une tige cristalline à fonction diastasique d'une longueur impressionnante jouant le rôle d'un mortier. Un pied ventral, musculueux et en forme de hache (pélicypode) assure le fouissage et le déplacement.

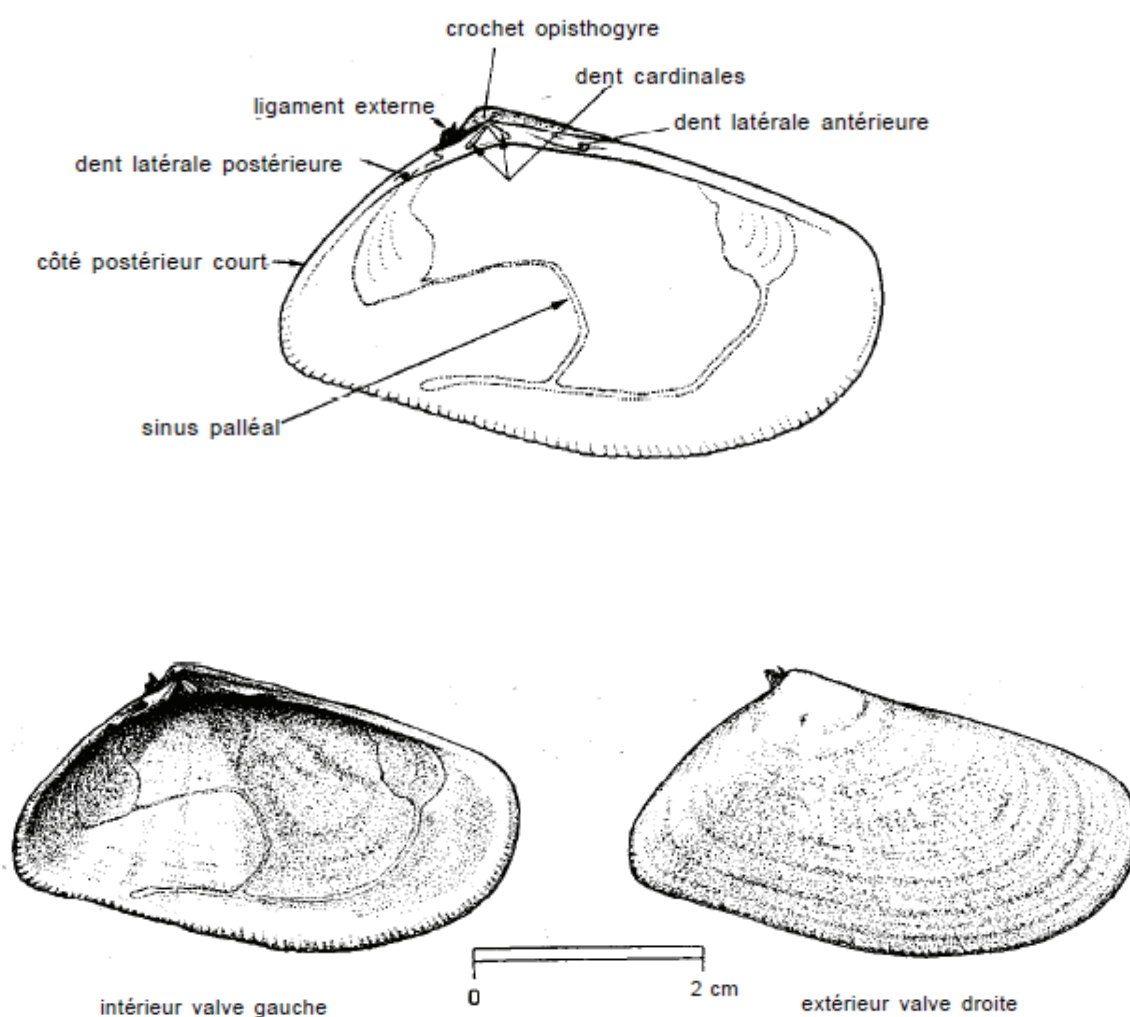


Figure 8 : Morphologie des coquilles de *D.trunculus* (FAO, 1987).

III. 4. Biologie et écologie

D.trunculus colonise les plages sableuses caractérisées par un bon tri sédimentaire et est principalement abondante sur les plages de sable fin (Guillou et al., 1991). La présence d'un sédiment grossier (sable moyen ou sable grossier) ou d'une barrière rocheuse exclue la présence de ce bivalve (Bayed, 1998). Elle est considérée comme étant un représentant exclusif de la biocénose particulière des plages sableuses à sable très fin (La Valle, 2011). De ce fait, *D.trunculus* est également considérée comme étant une espèce dépendante des variations de la taille des grains de sable particulièrement dans les premières phases de développement des juvéniles (Alexander et al., 1993; de La Huz et al., 2002). Sa distribution en fonction de la profondeur est de 0 à 2 mètres en Méditerranée et entre 0 et 6 mètres sur les côtes atlantiques. Elle est présente en grand nombre, enfouie de 5 à 15 cm dans le sédiment à la surface duquel seuls les siphons affleurent. Sa distribution est limitée aux plages à hydrodynamisme moyen à fort, généralement au niveau des zones intertidale et subtidale peu profondes des plages sableuses (De La Huz et al., 2002). Les individus juvéniles de 2 à 5 mm s'installent dans des profondeurs plus importantes qui peuvent atteindre jusqu'à 5 mm, alors qu'au cours de leur croissance ils gagnent progressivement les fonds de 1m où ils vivent à l'état adulte. Ce type de migration de croissance est l'une des caractéristiques du genre *Donax* (Guilou & Le Moal, 1980). *D. trunculus* est considérée comme un excellent et rapide enfouisseur grâce à la morphologie particulière de sa coquille qui facilite sa pénétration dans le sédiment (Ramon et al., 1995; Marcomini et al., 2002).

III. 5. Régime Alimentaire

Les Donacidae sont des filtreurs suspensivores qui filtrent l'eau de mer et se nourrissent principalement de phytoplancton et de particules en suspension de matière organique. Cela détermine la distribution de ce groupe qui habite normalement les zones où l'hydrodynamisme est plus ou moins élevé permettant la présence de particules en suspension et empêchant la sédimentation rapide de la matière organique (Manca-Zeichen et al., 2002). Les rares études qui se sont intéressées au contenu stomacal de *D.trunculus*, montrent que ce bivalve se nourrit principalement de matériel à prédominance végétale pigmentée ainsi que de diatomées associées à très peu de grains de sables (Pohlo, 1967; Mouêza, 1976).

III. 6. Reproduction

D.trunculus est une espèce gonochorique dont la glande génitale est localisée au-dessus du pied. La glande génitale n'est pas un organe anatomiquement distinct ; elle s'étend d'une façon diffuse dans la masse viscérale (Ramon et al., 1999; Manca-Zeichen et al., 2002; El Hamidi, 2003). *D.trunculus* ne présente aucun signe extérieur de dimorphisme sexuel durant la phase de repos sexuel et la distinction des sexes est donc impossible à l'œil nu (Gaspar et al., 1999). La gonade se présente en un tissu blanchâtre étalé dans la masse viscérale sur les parois de l'intestin et du sac stylet en période de maturité sexuelle uniquement. Ainsi, à maturité, les sexes sont bien reconnaissables à l'œil nu mais d'une population à une autre, la description de la gonade est variable en ce qui concerne sa coloration. Chez les populations méditerranéennes, il est possible de distinguer la glande génitale femelle, colorée en bleu nattier par pigmentation du vitellus, à aspect grenu de la glande génitale mâle, blanc crème, qui est plus finement lobée et à un aspect caractéristique en « chou-fleur » (Moueza & Freniel-Renault, 1973; Ben Khedher-Dhaoui, 2001). Pour les populations atlantiques, la glande génitale femelle est de couleur violette et la mâle de couleur jaune-orange (Gaspar et al., 1999). La maturité sexuelle est atteinte durant la première année de vie (Gaspar et al., 1999). La taille de la première maturité sexuelle est variable selon les populations étudiées, elle a été estimée à 16 mm de longueur sur les côtes algériennes (Moueza & Frenkiel, 1973); 14 mm sur les côtes portugaises (Gaspar et al., 1999); 18,39 mm sur les côtes italiennes (Manca-Zeichen et al., 2002) et 19 mm dans une étude ponctuelle conduite au niveau du golfe de Tunis (INSTM, 2005). Les émissions gamétiques commencent chez la majorité des populations étudiées dès le mois de janvier et se poursuivent jusqu'aux mois de juin, juillet et août. Les dernières libérations gamétiques ont lieu en août et permettent une vidange complète des gonades chez les individus totalement épuisés et surtout affaiblis par les hautes températures estivales (Moueza & Frenkiel., 1973). La ponte aboutit à une fécondation externe suivie d'une vie larvaire pélagique dont la durée est assez délicate à déterminer compte tenu de l'étalement de la période d'émission gamétique. La vie larvaire dure de 4 à 6 mois en Algérie avant la métamorphose larvaire aboutissant à la vie benthique définitive (Moueza & Frenkiel., 1973; FAO, 1987). Les études concernant la reproduction de *D.trunculus* mettent l'accent sur la présence de deux stratégies de reproduction en fonction de la position géographique des populations. La première concerne les populations qui présentent une gamétogenèse précoce déclenchée dès le mois de décembre et qui prend fin en juillet sur les côtes marocaines (Bayed, 1990) et en août aussi bien sûr les côtes atlantiques portugaises

(Gaspar et al., 1999) que sur les côtes tunisiennes (Ben Kheder- Dhaoui et al., 2003). Une deuxième stratégie est relative aux populations dont la gamétogenèse est tardive; elle débute en février et prend fin en septembre sur les côtes algériennes (Moueza & Frenkiel., 1973) et en juillet sur les côtes adriatiques italiennes (Manca-Zeichen et al., 2002). Dans la plupart des études menées et quelle que soit la stratégie de reproduction adoptée chez *D.trunculus*, la période de repos sexuel est limitée temporellement ou même totalement absente (Gaspar et al., 1999 ; Manca-Zeichen et al., 2002 ; Ben Khedher- Dhaoui, 2003 ; INSTM, 2005). La durée du cycle de vie de *D. trunculus* est de 2 à 3 ans en Méditerranée (Bodoy, 1982 ; Bayed & Guillou, 1985 ; Ramon et al., 1995) alors que la longévité peut atteindre 4 à 5 ans sur les côtes atlantiques (Guillou & Le Moal, 1980 ; Gaspar et al., 1999).

III. 7. Distribution, abondance sur les côtes tunisiennes et exploitation halieutique

Etant un bivalve exclusivement présent sur les plages sableuses de type fin, *D.trunculus* colonise certaines plages du golfe de Tunis de Radés à Kalaât El Andalous au niveau des faibles profondeurs (Figure 9A) (Ben Khedher- Dhaoui, 2003; INSTM, 2005). Sa biomasse (Figure 9B) a été estimée à 6 tonnes dans le golfe de Tunis (INSTM, 2005). Elle a également été signalée sur les plages du golfe de Gabès (Ben Mustapha et al., 2001; INSTM, 2005) et les côtes nord-ouest de la Tunisie (Tabarka, Cap Negro) (Enzenross & Enzeross, 2001). Dans le golfe de Gabès (Figure 10), la biomasse de *D.trunculus* a été estimée à 738 tonnes dans la partie exclusivement marine et à 452 tonnes dans la partie estran du même golfe. Mise à part une étude d'évaluation des stocks des coquillages marins menée par l'Institut National des Sciences et des Technologies de la Mer (INSTM) en 2005 qui s'est limitée à un certain nombre de régions (principalement la partie Nord et Sud de la Tunisie), à cette date, les études de distribution géographique et d'abondance de cette espèce ne sont pas actualisées. Une étude personnelle de prospection préliminaire à ce travail a permis d'identifier la présence de cette espèce dans des zones ponctuelles dans la baie de Monastir, notamment dans les plages sableuses de Téblouba et Bkalta. La collecte de *D.trunculus* est artisanale ou semi-industrielle. Elle se fait à l'aide de râeaux, de petites racleuses de fonds ou encore à la main. Malgré son abondance dans certaines régions de la Tunisie (golfe de Tunis et Gabès), ce bivalve n'est pas commercialement exploité (Chouba, 2009).

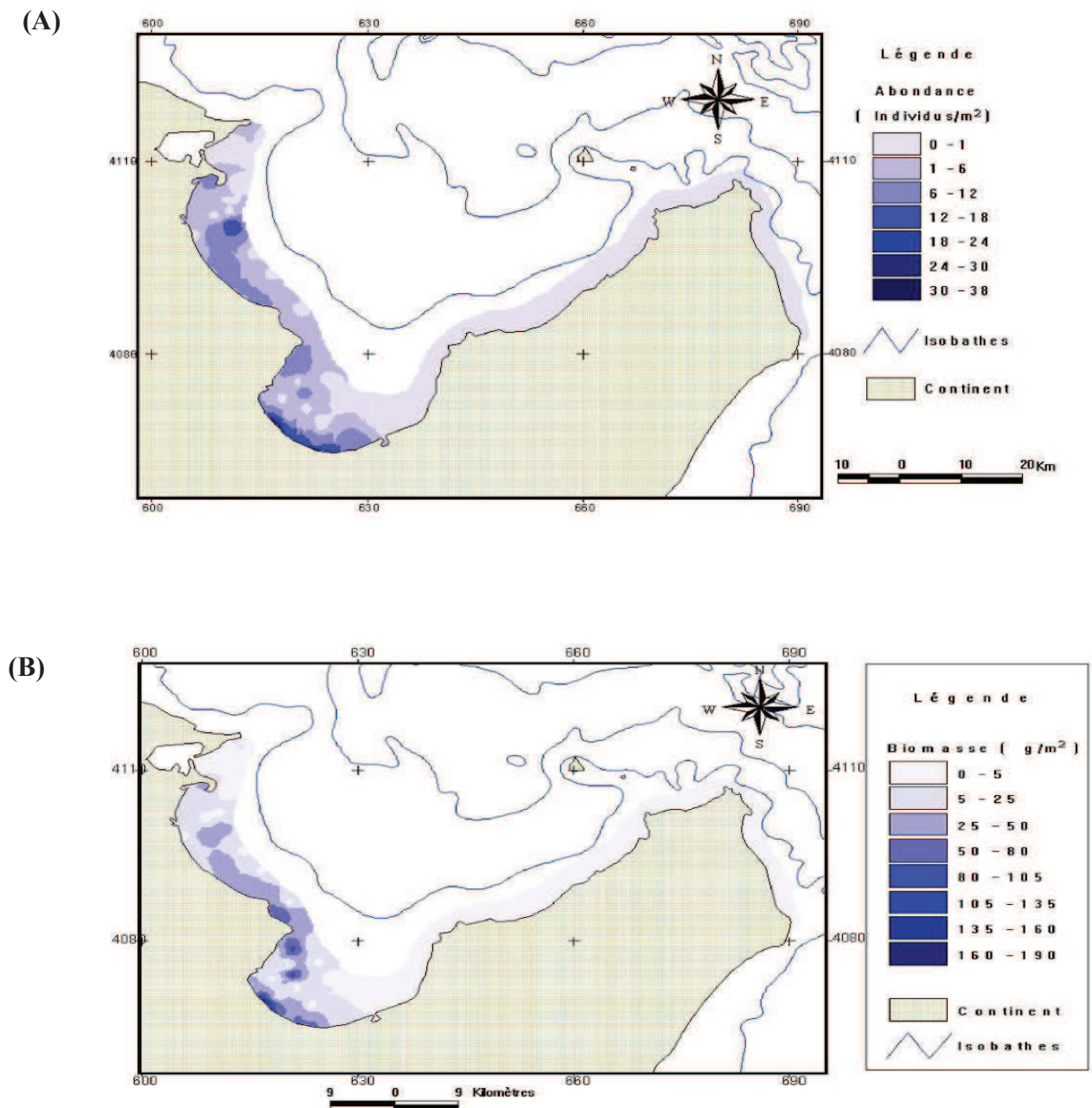


Figure 9 : Répartition spatiale de l'abondance (A) et de la biomasse (B) de *D. trunculus* dans le golfe de Tunis (INSTM, 2005).

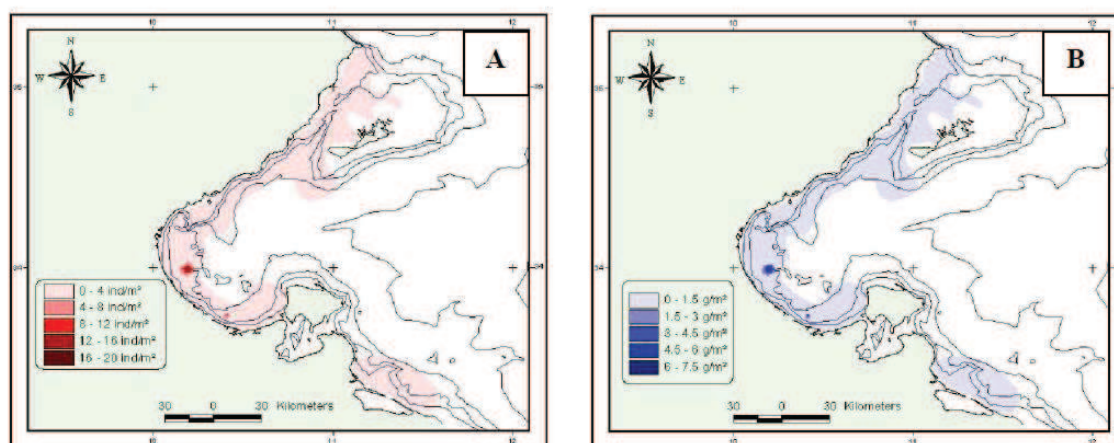


Figure 10 : Distribution géographique des indices d'abondance de *D. trunculus* dans la partie marine du golfe de Gabès : (A) : Nombre d'individus, (B) : Biomasse (INSTM, 2005).

III. 8. *Donax trunculus* en écotoxicologie

Roméo et Gnassia-Barelli (1988) ont utilisé *D.trunculus* comme indicateur d'accumulation des métaux traces, lors d'une étude de surveillance chimique le long des côtes mauritaniennes. Cette étude a permis de valider l'utilisation de *D.trunculus* comme étant un indicateur de la contamination métallique des plages sableuses mauritaniennes. Fishelson et al. (1999) ont étudié la réponse d'un ensemble de paramètres physiologiques et histochimiques (test de viabilité des cellules, accumulation des lipides neutres, état des membranes lysosomales) et chimiques (accumulation des métaux traces et des HAPs) chez *D.trunculus* collectée dans deux sites différant par leur degré de pollution : un site témoin et un site localisé au niveau d'un complexe pétrochimique. Cette étude a été la première à avoir testé l'utilisation des biomarqueurs chez *D. trunculus*. Les résultats ont montré notamment la présence de mécanismes antioxydants chez *D.trunculus*. Moukrim et al. (2004) ont étudié les réponses des activités de l'AChE et de la GST ainsi que celles des niveaux en TBARs chez *D.trunculus* originaires de différents sites des côtes marocaines. En parallèle, les réponses de l'AChE et des niveaux en TBARs ont été également étudiées suite à une exposition au Cu en laboratoire des bivalves. Les résultats ont montré une réponse différentielle des biomarqueurs (AChE, GST et TBARs) chez *D. trunculus* selon leur site d'origine et une saisonnalité des réponses

(les valeurs minimales de l'AChE et de la GST étant observées au printemps). Les auteurs ont mis en évidence également l'effet inhibiteur du Cu sur l'activité AChE et l'effet inducteur sur les niveaux des TBARs. *D.trunculus* a fait l'objet ensuite de travaux de quantification des métaux traces (Usero et al., 2005 ; Beldi et al., 2006 ; Maha et al., 2008 ; Ozden et al., 2009, Drif & Abdennour, 2010) et de certains congénères organochlorés (Bordajandi et al., 2006 ; El Deeb et al, 2007). Ces études de surveillance chimique ont permis la classification des sites étudiés selon leur niveau de contamination et les auteurs ont suggéré *D.trunculus* comme espèce sentinelle pour les études de surveillance chimique.

Boussoufa et al. (2007) se sont intéressés au suivi des fluctuations saisonnières de l'activité AChE mesurées chez *D.trunculus* collectées dans deux sites (Kalaât El Andalous et Radès) au niveau du golfe de Tunis. Les résultats ont montré que l'activité AChE était principalement inhibée en été (juillet-août) dans les deux sites étudiés.

Sifi et al. (2007) ont réalisé un suivi mensuel (janvier-décembre 2005) de deux biomarqueurs (GST et AChE) mesurés chez *D.trunculus* originaires du golfe de Annaba (Algérie). Les résultats de l'étude ont montré une réponse différentielle des biomarqueurs en fonction du degré de pollution des sites étudiés (inhibition de l'AChE et induction de la GST chez les bivalves du site El Battah par rapport au site de référence Sidi Salem). Neuberger-Cywiak et al. (2007) ont testé l'effet de deux concentrations (0,1; 1 et 10 ppm) de Cd^{2+} et de Zn^{2+} pendant 24 et 48 heures sur les paramètres de la balance énergétique et le mécanisme de la filtration. Les résultats ont mis en évidence des corrélations positives entre les marqueurs physiologiques (e.g. mécanismes de la filtration, taux d'absorption) et l'allocation énergétique à la reproduction et la croissance ou « Scope For Growth ».

Ywatez et al. (2010) ont étudié l'effet de certains effluents urbains à proximité d'un complexe industriel chimique (production du PVC et autres composés pétroliers) sur des paramètres du système de détoxification des tellines collectées en amont et en aval de ces rejets au niveau de la baie de Haifa. Les résultats ont montré une perturbation des mécanismes antioxydants et une intensification du métabolisme énergétique chez les bivalves exposés d'une manière chronique aux effluents industriels. Les auteurs indiquent également l'aptitude de *D. trunculus* à la survie dans des milieux fortement pollués et émettent l'hypothèse d'une éventuelle adaptation génétique de cette espèce si le stress chimique perdure voire s'amplifie dans la baie de Haifa.



***Chapitre IV : Matériel et
Méthodes***

Chapitre IV. Matériel et Méthodes

IV.1. Sites d'étude

IV.1.1. Le golfe de Tunis

IV.1.1.1. Généralités et géomorphologie du golfe

Le golfe de Tunis se situe au Nord Est de la Tunisie, entre 10° 10' et 11° 5' de longitude Est et 36° 38' et 37°10' de latitude Nord, au Nord-Ouest du seuil Siculo-Tunisien. Sa superficie totale est d'environ 1500 Km². Il est limité par la radiale joignant Cap-Farina (Ghar El Melh), à l'Ouest et le Cap-Bon, à l'Est. La profondeur maximale de la tranche d'eau est estimée à 250 mètres. Il se présente sous la forme d'une grande échancrure, largement ouverte vers le large (75 miles de côtes). Le golfe de Tunis se distingue par:

- des plages très nombreuses et très larges souvent alimentées par de vastes champs dunaires (Gammarth à l'Ouest et Oued Abid à l'Est),
- des fonds à caractère sablo-vaseux près des rivages, vaseux vers le large, la présence dans la zone de Sidi Raïs (partie Sud-Est de la baie de Tunis) d'un important récif barrière de posidonie *Posidonia oceanica*.

Le golfe de Tunis se caractérise également par un aspect hydrologique et sédimentologique particulier en présentant un caractère :

- Atlantique par la salinité (entre 36,5 et 37,5 psu).
- Méditerranéen par sa température (entre 13,7 et 15,7°C).
- Deltaïque par son aspect sédimentologique.

Les valeurs annuelles moyennes de la salinité et de la circulation générale des courants indiquent que les masses d'eau du golfe de Tunis sont celles du bassin occidental de la Méditerranée. Quant aux faciès lithologiques, leur variabilité contribue à générer une riche diversité biologique dans cette région. Le climat de la région du golfe de Tunis est de type semi-aride avec deux saisons contrastées. Les pluies sont à la fois rares et violentes. Les vents au large, très fréquents, soufflent généralement au Nord-Ouest et peuvent parfois être violents (28 m.s⁻¹). Les falaises de Cap Farina et Cap Carthage protègent une grande partie du secteur

des vents d'Ouest et du Nord-Ouest. Seuls les vents du Nord et de Nord-Est engendrent les houles qui s'engouffrent dans le golfe de Tunis et contribuent aux différents phénomènes hydro-sédimentaires (El Arrim, 1996). L'alimentation des plages en matériaux détritiques est assurée par l'érosion des côtes rocheuses et par les apports solides du réseau hydrographique versant dans le golfe (El Arrim, 1996 ; Added et al., 2003). Les régions situées à l'ouest et au sud du golfe de Tunis dont les profondeurs varient entre 0 et 20 mètres sont caractérisées par un substrat sableux ou sablo-vaseux. La côte orientale du golfe de Tunis présente plus de diversité de substrat : soit rocheux soit sableux et plus au moins détritique (Ben Cherrada, 1997).

IV.1.1.2. Réseau hydrographique

Le régime hydrologique du golfe de Tunis est commandé principalement par le réseau exoréique le plus important de la Tunisie : les oueds Medjerda et Méliane. Deux autres oueds non négligeables, mais de moindre importance, l'oued Soltane et l'oued Bézirk, viennent aussi se jeter dans le golfe (El Arrim, 1996). La description du réseau hydrographique du golfe de Tunis a été détaillée dans la partie II.2.4 (Cas du Golfe de Tunis) du Chapitre II (Synthèse bibliographique).

IV.1.1.3. Paramètres hydrodynamiques

IV.1.1.3.1. Circulation des courants marins

Au niveau du golfe de Tunis plusieurs types de courants ont été signalés :

- Les courants généraux : la circulation des courants dans le golfe de Tunis dépend en partie des caractères hydrologiques généraux de la mer méditerranée et se distingue par deux branches. La première contourne la côte Ouest et se dirige vers le Sud, provoquant les courants giratoires, phénomène surtout observé à l'estuaire de l'oued Mejerda. Une deuxième branche se rabat suivant une direction Nord Ouest- Sud Est à l'approche de Cap Sidi Rais et dévie ensuite vers le sud avant de se diriger enfin vers le nord en plein milieu du golfe de Tunis.

- Les courants de marée : ils sont généralement très faibles dans le golfe de Tunis atteignant un maximum de 10 cm.s^{-1} . Leurs effets sont souvent masqués par les courants littoraux.
- Les courants littoraux : ils sont engendrés principalement par les houles arrivant obliquement au trait du rivage. Dans le golfe de Tunis, ils sont responsables de l'essentiel du transport par dérive et de la formation des corps sableux.
- Les courants de dérive dus aux vents : leur vitesse est estimée de 2 à 3 % par rapport à celle du vent qui les provoque. Les variations des caractéristiques de la houle font évoluer le profil des plages et induisent la formation de deux courants de dérive littorale : L'un Nord-Sud de Ras Ettarf à la Goulette par réflexion de la houle sur la côte Ouest, et l'autre est de Kourbous à Radès puis Sud-Nord de Radès à la Goulette par réflexion de la houle sur la côte Sud.

IV.1.1.3.2. Les marées

Le golfe de Tunis est caractérisé par une marée très faible. Le marnage varie de 0,2 à 0,3 mm soit 0,24 mm en eaux vives et 0,12 mm en eaux mortes (Zaggaf-Tahri, 1999). Les vents et la pression atmosphérique peuvent s'ajouter à cette marée astronomique et engendrer une marée variable selon les saisons et la vitesse des vents de l'ordre de 50 cm.

IV.1.1.3.3. La houle

Produite par l'action des vents à la surface de l'eau, la houle est considérée comme l'agent principal de la dynamique du littoral du golfe de Tunis (Sliti, 1990). Les houles principales du golfe de Tunis sont celles de direction Nord-Nord qui se heurtent violemment contre la côte Ouest induisant une dérive littorale de direction Nord-Est. Du côté Sud (baie de Tunis), les houles n'ont pratiquement aucun effet (Zaggaf-Tahri, 1999).

IV.1.1.4. Caractéristiques physicochimiques

IV.1.1.4.1. Température

La région thermique du golfe de Tunis (Figure 11) est caractérisée par un climat tempéré intermédiaire (Zeggaf-Tahri, 1998). La température de surface au niveau de la région du golfe de Tunis est soumise aux variations saisonnières importantes. L'amplitude de cette variation diminue en fonction des profondeurs des eaux. La température moyenne des eaux de surface montre une variation saisonnière entre l'hiver (12,4 C°) et l'été (28,4 C°) (Zarrad et al., 2004).

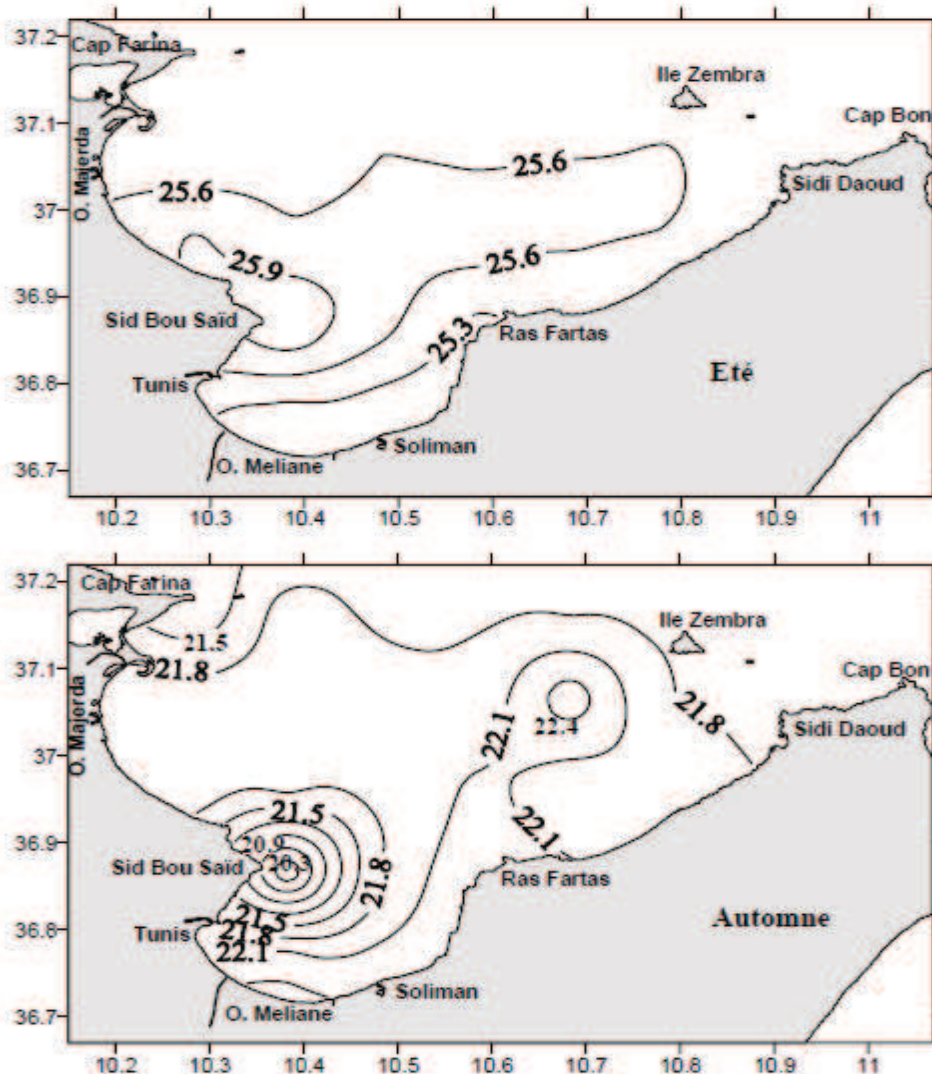


Figure 11 : Distribution horizontale de la température de surface dans le golfe de Tunis (campagne effectuée en été 2002) (Zarrad et al., 2004).

IV.1.1.4.2. Salinité

La salinité des eaux du golfe de Tunis (Figure 12) subit des variations saisonnières en surface variant de 32,6 psu pendant la saison hivernale à 37,8 psu lors de la saison estivale. Les valeurs estivales de salinité en surface montrent une faible variation spatiale (0,7 psu). Les valeurs de salinité maximale (37,8 psu) ont été localisées au sud du petit golfe de Tunis (baie de Tunis) alors que les minimales (37,1 psu) couvrent la moitié nord du golfe. Une zone intermédiaire se trouve entre ces deux zones limites précédentes, avec une salinité de 37,3 psu correspondant à la salinité moyenne pour la saison estivale. Cependant, très peu de variations de la salinité selon la bathymétrie ont été observées (Chouba, 2009). La salinité des eaux du golfe de Tunis est conditionnée principalement par les apports des eaux douces et le comportement du matériel détritique apporté par les oueds du réseau hydrographique.

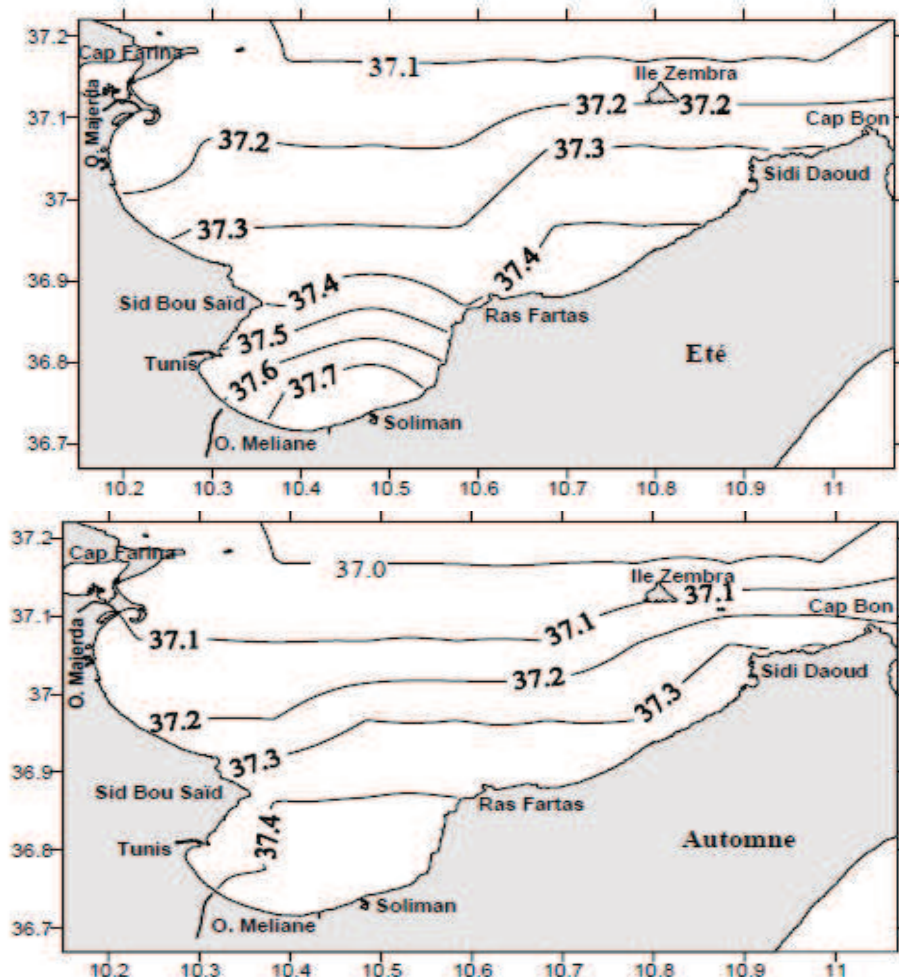


Figure 12 : Distribution horizontale de la salinité des eaux de surface dans le golfe de Tunis (Zarrad et al., 2004).

IV.1.1.4.3. Les teneurs en oxygènes dissous

Zarrad et al (2004) ont étudié les distributions des teneurs en oxygène dissous dans le golfe de Tunis (Figure 13). Les faibles concentrations en oxygène ont été estimées en été (6,5 mg.L¹). Les auteurs supposent que ce taux est le résultat d'une forte température des eaux (25,5 C°), qui réduit la solubilité de l'oxygène, (le coefficient de corrélation entre ces deux derniers paramètres étant de - 0,97). Une zone de faible concentration en oxygène (6,1 mg.L¹) a été estimée au nord de Ras Fartas et une autre autour de Cap Farina. D'une façon générale, d'après la distribution spatiale de l'oxygène dissous, de faibles concentrations d'oxygène dissous ont été constatées pratiquement dans l'ensemble du petit golfe et au voisinage de l'embouchure de l'oued Mejerda. Des concentrations équivalentes à 6,7 mg.L⁻¹ ont été localisées au Nord -Est et plus ou moins à l'Est et à l'Ouest du golfe (Zarrad et al., 2004).

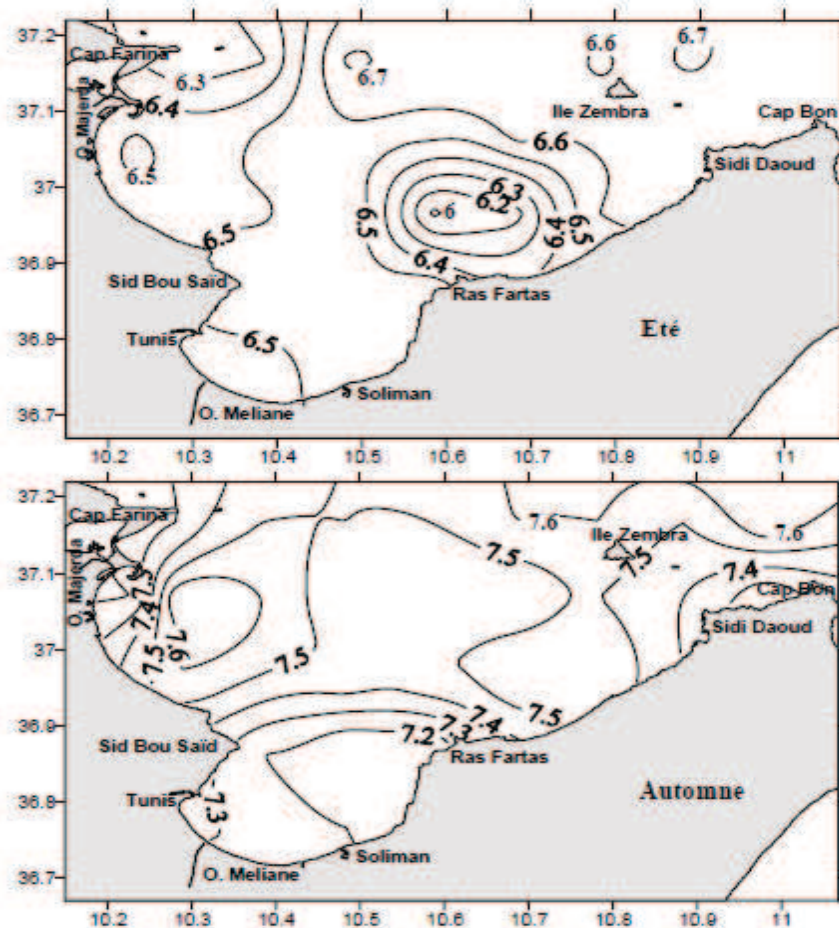


Figure 13 : Distribution horizontale des teneurs en oxygène dissous en surface de l'eau dans le golfe de Tunis (Zarrad et al., 2004).

IV.1.2. Sites sélectionnés

Compte tenu des différents objectifs de ce travail, deux sites situés dans le golfe de Tunis (Figure 14) ont été sélectionnés. Les critères de cette sélection sont :

- l'existence d'un gradient de contamination entre les sites
- l'importance de ses sites d'un point de vue socio-économique
- l'abondance de l'espèce (*D. trunculus*) étudiée
- la similarité entre les sites d'un point de vue écologique et géologique.

Suite à des enquêtes prospectives sur le terrain et des consultations bibliographiques, notre choix s'est donc porté sur la plage sableuse de Sidi Jehmi (S.J) retenu en tant que site comparatif de « référence » et le site de Radès Méliane (R.M) en tant que site multi-pollué.

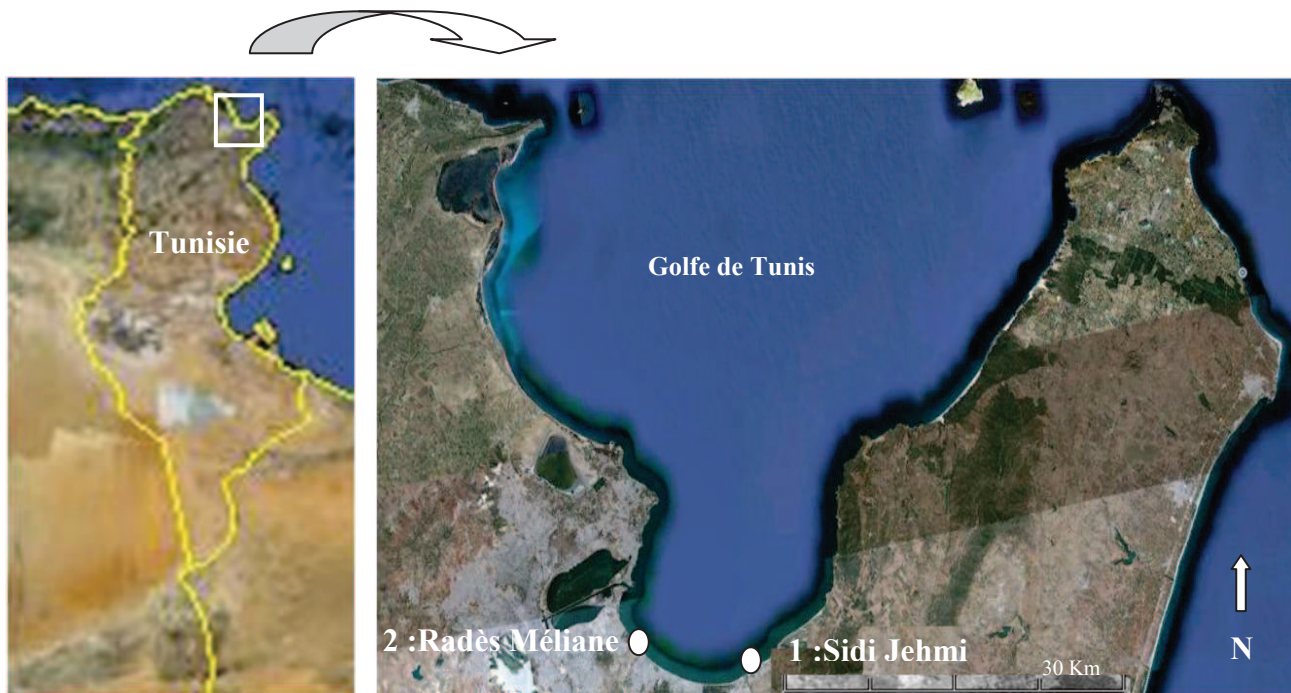


Figure 14 : Localisation des sites d'études dans le golfe de Tunis (1) : Sidi Jehmi, (2) : Radès Méliane (Images Google Earth, modifiées).

IV.1.2.1. Site de Sidi Jehmi

La plage sableuse de Sidi Jehmi (Figure 15) est située entre Borj-Cédria et Soliman dans la partie centrale du golfe de Tunis (36°43, 36 N; 10°27, 33 E). Cette zone est relativement éloignée de toute source d'activité humaine et industrielle. On ne dispose malheureusement pas de données précises sur les niveaux de contamination chimique du littoral du golfe de Tunis. La plupart des études de surveillance du littoral de ce golfe repose sur des campagnes d'échantillonnage réalisées au large dudit golfe. Les seules analyses effectuées par le service d'hygiène et de salubrité de l'environnement tunisien concernent principalement les analyses microbiologiques (charge bactérienne en coliformes totaux, coliformes et streptocoques fécaux, présence des salmonelles et des vibrions), des eaux de baignade et certains paramètres physicochimiques d'ordre général (matières en suspension, DBO₅, nitrates, nitrites...). Selon ce rapport publié chaque année par le Ministère de la Santé en Tunisie avant et pendant la saison de baignade estivale, la plage de Sidi Jehmi figure parmi les rares plages classées comme de très bonne qualité microbiologique (Ministère de la santé, 2009 ; 2010 ;2011). Par ailleurs, des études de recensements de stocks de mollusques montrent une abondance spécifique des populations de *D.trunculus* dans cette zone (INSTM, 2005).

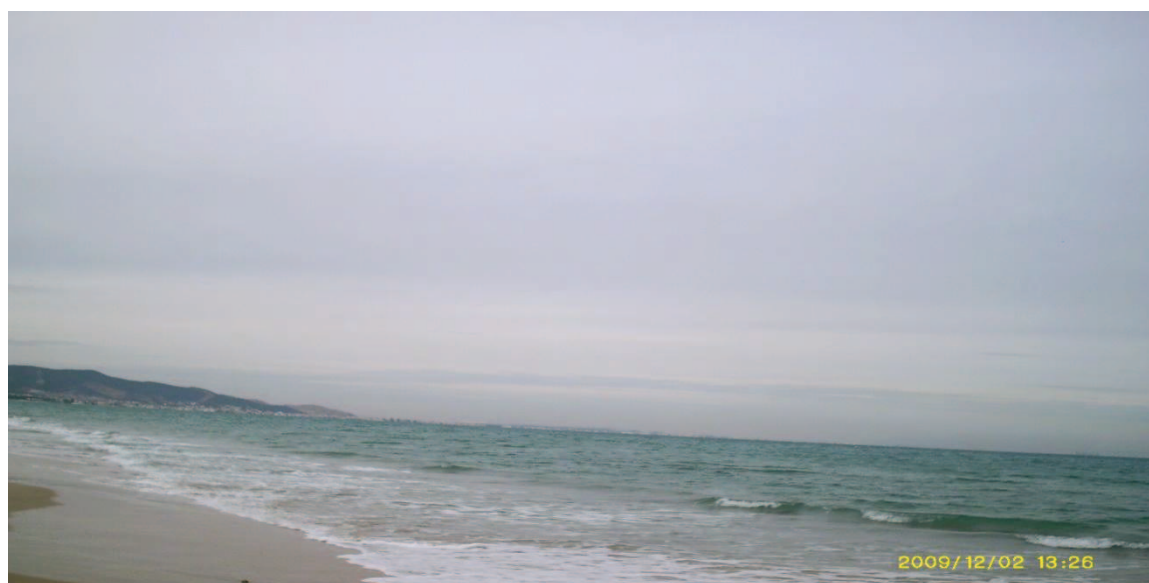


Figure 15 : La plage sableuse de Sidi Jehmi (photo S.Tlili).

IV.1.2.2. Site de Radès Méliane

Le site de Radès Méliane (Figure 16) (36°45, 49 N; 10°17, 59 E) est considéré comme étant un site multi-contaminé (Ben Charrada & Moussa, 1997; Masmoudi et al., 2007).

Ce site est situé exactement au niveau de l'estuaire de l'oued Méliane (Figure 16); l'oued le plus impacté en Tunisie. Ses eaux sont très polluées par les rejets de 50% des eaux usées à l'état brut dans l'oued dans sa partie aval (Ben Cherrada, 1997). Cet oued draine d'une façon permanente et directe les eaux épurées d'au moins quatre stations d'épuration (STEP) : Sud Méliane I et II, Mornag et Ben Arous (ONAS, 2010). Outre ces eaux traitées, l'oued draine également des eaux de certaines zones urbaines et les eaux industrielles non traitées (Ben Charrada, 1997). La proximité d'une zone industrielle importante (Ben Arous ; Bir El Kasaa et Mégrine) où la pollution est encore mal contrôlée, présente une source importante d'eaux industrielles déversées entraînant divers types de produits chimiques, des eaux de délavage de textiles et des eaux grises (cimenteries, industries chimiques, textile et agroalimentaire). Une partie de ces rejets est déversée directement dans l'oued Méliane puis dans la baie de Tunis dans le sud du golfe. La plus grande centrale électrique en Tunisie (station électrique de Radès) est située également dans cette zone. Elle pompe ses eaux de refroidissement dans le canal de navigation et les rejette directement dans la baie de Tunis près du débouché du canal de Radès. Les rejets de cette centrale sont estimés de l'ordre de 1,3 millions de $m^3 \cdot j^{-1}$ (Hamrouni, 2006; Chouba, 2009). En raison de la grande diversité des sources de pollution et de la mauvaise qualité chimique et microbiologique de ces eaux, ce site a été considéré comme un « hot spot » par le programme MEDPOL (MEDPOL, UNEP, 2001). La baignade au niveau de ce site est strictement interdite par les services d'Hygiène du Ministère de la Santé en Tunisie. Le Tableau 2 résume les principales sources potentielles de pollution au niveau de ce site multi-contaminé :

Source de pollution		Nature des rejets
➤ Zone industrielle de Ben Arous ; Bir El Kasaa et Mégrine	• Cimenteries	▪ Eaux industrielles traitées
	• Tanneries	▪ permanentes
	• Industries agro-alimentaires	▪ Eaux non traitées occasionnelles
	• Industries textiles (délavage des jeans)	▪ Eaux traitées
➤ STEPs	• Sud Méliane I et II, Mornag et Ben Arous	▪ Eaux traitées (100% et 50%)
➤ Centrale électrique de Radès		▪ Rejets thermiques (1.3 millions de m ³ /jour)
➤ Port de Radès et canal de navigation		▪ Rejets pétroliers accidentels

Tableau 2 : Principales sources de pollution et nature des rejets au niveau du site Radès Méliane (Ben Charrada, 1997; Hamrouni, 2006; Chouba, 2009; Tlili, observation personnelle).



Figure 16 : Site de Radès Méliane. (A) : Partie sableuse de la Plage de Radès Méliane, (B) : Eaux grises stagnantes en aval de la plage du site Radès Méliane, (C) : Station d'épuration Sud Méliane, (D) : Embouchure de l'oued Méliane au niveau de la plage de Radès, (E) : oued Méliane, (F) : Eaux grises se déversant dans l'embouchure (Photos S.Tlili).

IV.2. Prélèvements : Stratégie d'échantillonnage et préparation des échantillons

IV.2.1. Stratégie d'échantillonnage

Les campagnes d'échantillonnage ont été réalisées sur une année (novembre 2008 à octobre 2009) de façon bimensuelle. Donc, au total, six campagnes ont été effectuées : novembre 2008, janvier, mars, mai, août et octobre 2009. Compte tenu des différents objectifs de ce travail, plusieurs types d'échantillonnage ont été effectués à chaque campagne de prélèvement et sont illustrés dans la Figure 17. Après collecte sur le terrain, les bivalves ont été immédiatement transportés au laboratoire dans une glacière portable.

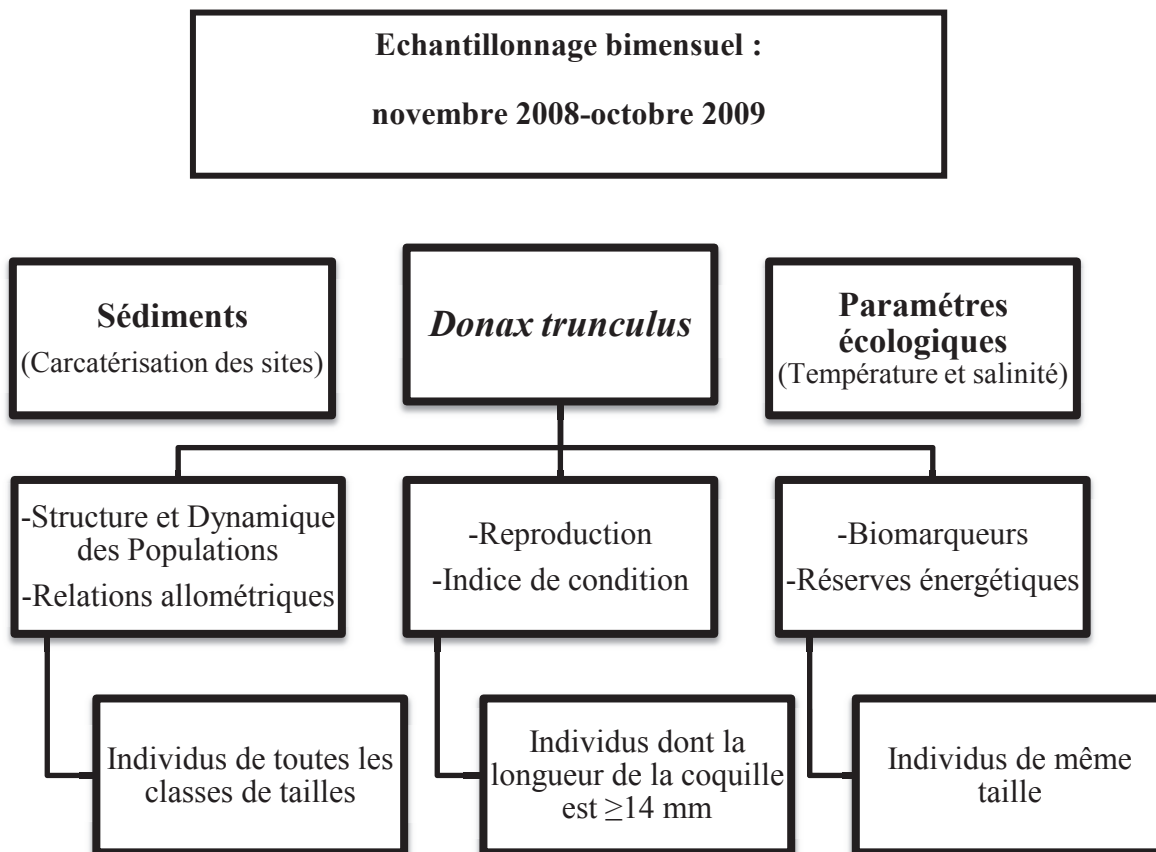


Figure 17: Diagramme illustrant la stratégie d'échantillonnage adoptée.

IV.2.2. Prélèvements

Au niveau de chaque station (exemple Figure 18), des transects de 100 mètres perpendiculaires à la côte ont été effectués. Au total 5 transects de profondeurs différentes ont été prospectés (0; 0,25; 0,5 1,0 et 1,25 mètres). Au niveau de chaque ligne, un point de récolte est réalisé tous les 10 mètres. Les échantillons sont récoltés par la méthode de raclage du fond à l'aide d'un râteau à main (Gaspar et al., 1999 ; Manca-Zeichen et al., 2002). Ce râteau est muni de dents métalliques qui raclent le fond et d'un filet de faible maillage (4mm) qui libère le sable et retient les bivalves piégés.

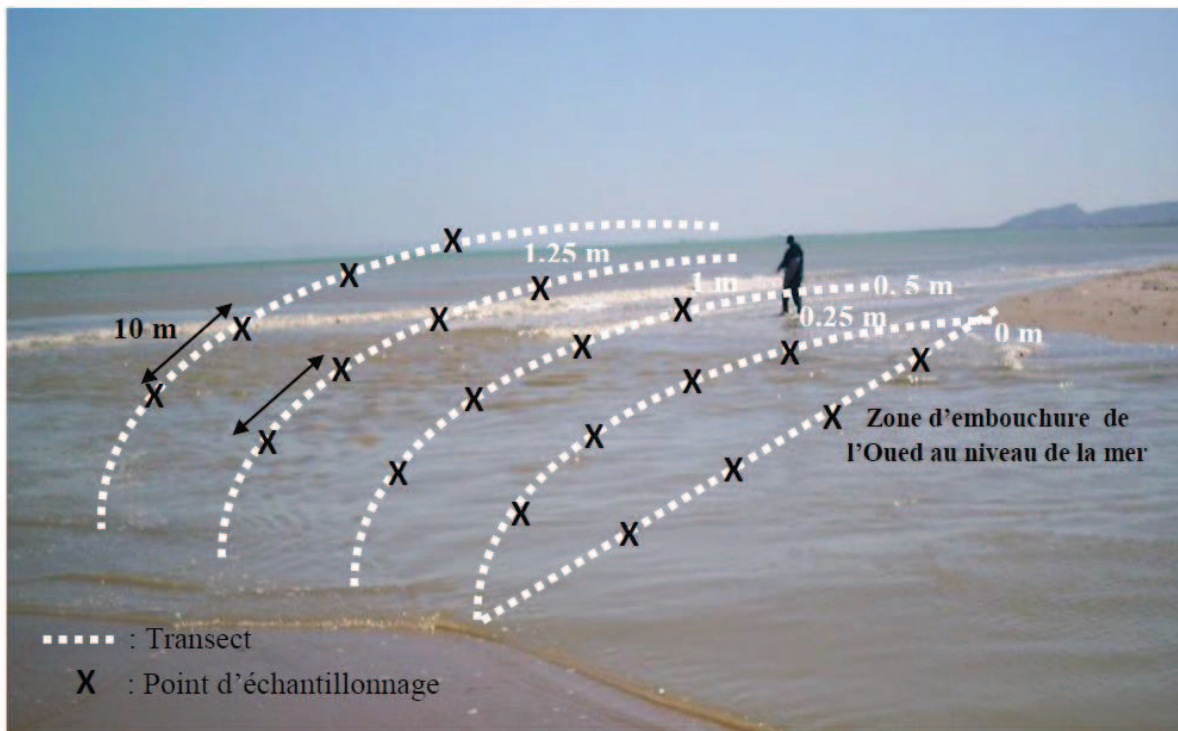


Figure 18: Plan de collecte sur le terrain (exemple d'une campagne d'échantillonnage au niveau de l'estuaire de l'oued Méliane) (Photo S.Tlili).

IV.2.3. Préparation des échantillons

IV.2.3.1. Paramètres biométriques et populationnels

Au laboratoire, tous les échantillons de *D. trunculus* ont été pesés à l'aide d'une balance de précision au dix millièmes de gramme puis mesurés à l'aide d'un pied à coulisse numérique. Les mesures biométriques réalisées ont été : longueur totale de la coquille, largeur, hauteur et le poids total frais. Une fois ces mesures effectuées, les échantillons ont été par la suite disséqués pour effectuer les mesures de différents types d'indices de condition (indice de condition frais et indice de condition sec). Les tissus frais ont été pesés puis mis à l'étuve à 60°C pendant 72 heures.

IV.2.2. 2. Mesures biochimiques

Les glandes digestives destinées aux mesures biochimiques (biomarqueurs, réserves énergétiques) ont été rapidement disséquées dans une cuvette remplie de glace (4°C) et congelés à -80°C jusqu'aux analyses ultérieures.

IV.2.2. 3. Histologie des gonades

Les gonades disséquées ont été rapidement incluses dans des tubes contenant du liquide de Bouin pendant 72 heures. Elles ont été ensuite déshydratées dans une série de bains d'alcool de concentration croissante (70%, 80%, 90% et 95%) puis dans le toluène. Les tissus ont été ensuite imprégnés et inclus dans la paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées au microtome, puis montées sur lames avant la coloration par l'hématoxyline-éosine (Humanson, 1979). Les coupes ont d'abord été déparaffinées pour réhydrater les tissus. Ainsi, elles ont subi différents bains de xylène, puis d'éthanol de degrés décroissants (100°, 95° puis 70°) et enfin d'eau distillée. Elles ont été ensuite colorées par l'hématoxyline de Harris et l'éosine, avant d'être à nouveau déshydratées par des bains d'éthanol de degré croissant et de xylène. Les lames préparées ont été par la suite observées au microscope (Olympus BX 50) pour déterminer les différentes phases de la gamétogenèse. Au total, cinq stades du cycle de la reproduction (indifférencié, en développement, en maturité, ponte et après ponte) ont été identifiés et caractérisés en se basant sur les critères morphologiques et cytologiques décrits par Mouneyrac et al. (2008) chez *Scrobicularia plana*, Delgado & Pérez-Camacho (2005) chez *Ruditapes decussatus*, et Gaspar & Monteiro (1998) chez *Donax trunculus*.

IV.3. Caractérisation des sites d'étude

IV.3.1. Paramètres écologiques

Pour chaque campagne d'échantillonnage, la salinité a été mesurée à l'aide d'un salinomètre de terrain (Type WTWLF 196). Les données météorologiques (température ambiante, pluviométrie et humidité moyenne) pour toutes les périodes d'échantillonnage ont été fournies par l'Institut National de la Météorologie (Tunisie). Ces données sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 3) :

Sites/ périodes		nov.	jan.	mars	mai	août	oct.
S.J	Température (°C)	16,8	11,8	13	20,1	28	19,9
	Salinité (psu)	37,2	34,2	35,5	36,5	36,6	37,4
	Humidité moyenne (%)	81	89	81	78	74	87
	Pluviométrie (mm)	23	135	53	9,5	12,3	56
R.M	Température (°C)	17,2	12,5	14,3	21,6	29,8	20,9
	Salinité (psu)	34,7	30,7	31,1	33,2	34,8	34,2
	Humidité moyenne (%)	65	77	69	64	64	76
	Pluviométrie (mm)	24,7	128,1	47	8,5	12,6	54,2

Tableau 3: Paramètres écologiques des sites d'étude en fonction des périodes d'échantillonnage.

IV.3.2. Caractérisation des sédiments

N.B : Tous les échantillons de sédiments destinés à la caractérisation des sites ont été perdus lors d'une panne électrique du laboratoire de Biochimie et Toxicologie de l'Environnement, ISA Chott-Mariem. Seuls les échantillons de la campagne de mai 2010 ont été récupérés. Les résultats de la caractérisation des sédiments (granulométrie et concentration des métaux traces) ne concernent donc que cette période.

IV.3.2.1. Granulométrie

Pour chaque site d'étude (S.J et R.M), les sédiments ont été prélevés à deux lignes de profondeurs différentes (0,2 et 0,7 m). L'analyse granulométrique consiste à fractionner les différents matériaux des échantillons sédimentaires en plusieurs catégories de grains de tailles décroissantes. Les échantillons sont d'abord séchés pendant 72 heures à 60°C. Par la suite, ils sont placés dans une tamiseuse automatique où ils subissent un tamisage à travers une série de tamis normalisés (série AFNOR). Les tamis sont placés par ordre décroissant selon l'ouverture des mailles : 1 mm- 0,5 mm- 0,25 mm- 0,125 mm- 0,1 mm- 0,05 mm.

Le tamisage se fait par une série de secousses pendant une dizaine de minutes. Le refus de chaque tamis est récupéré puis pesé afin de déterminer le pourcentage de chaque fraction. Les résultats de l'étude granulométrique des sédiments originaires des deux sites d'études (S.J ; R.M) prélevés en mai 2010 sont exprimés sous forme d'histogrammes de fréquences de taille de grains (Figure 19).

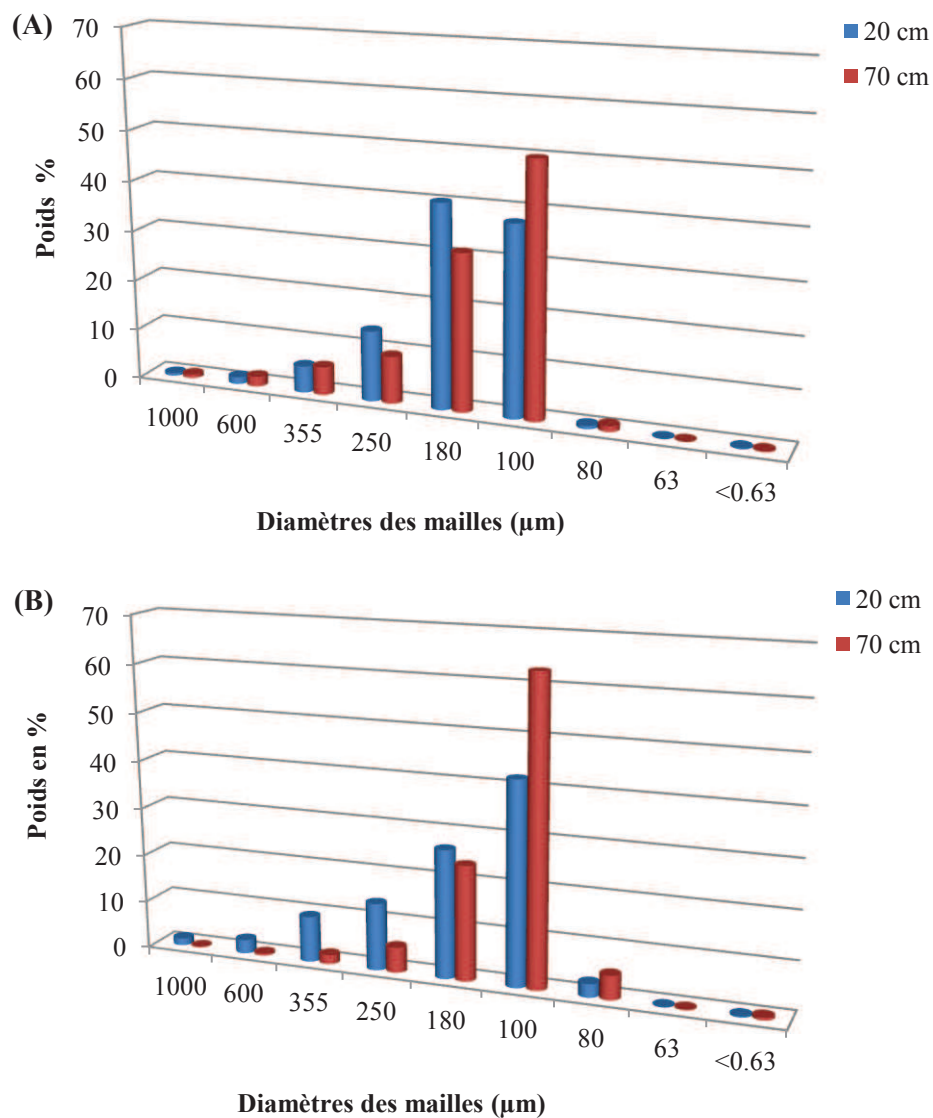


Figure 19 : Histogrammes des fréquences de diamètre des grains de sédiments prélevés en mai 2010 au niveau des sites d'études : (A) : Sidi Jehmi ; (B) : Radès Méliane.

Matériel et Méthodes

La classification des sédiments basée sur la taille des particules de ces derniers (Ibouily,1981) est illustrée dans le Tableau 4.

Classes des tailles (µm)	Dénomination
< 2	Argiles
2 - 20	Limons fins
20 - 63	Limons grossiers
63 – 250	Sables fins
250 - 200	Sables grossiers

Tableau 4 : Classification des particules sédimentaires selon la taille (Ibouily, 1981).

Pour traduire le taux d'envasement des sédiments, le tableau de classification d'Ibouily (1981) basé sur le pourcentage des particules fines a été adopté (Tableau 5).

% de la fraction fine	Nature du sédiment
Fraction fine < 10 %	Sables purs
10% fraction fine < 60 %	Sables peu envasés
20% fraction fine < 60 %	Sables moyennement envasés
40% fraction fine < 60 %	Sédiments très envasés à dominance de sables
60 % fraction fine < 60%	Sédiments très envasés à dominance de vases
Fractions fines > 80%	Vases pures

Tableau 5 : Classification d'Ibouily (1981) indiquant le taux d'envasement des sédiments.

Fraction %	S.J 20 cm	S.J 70 cm	R.M 20 cm	R.M 70 cm
fraction fine <63 µm)	0,16	0,19	0,26	0,57
Sables fins (63-250 µm)	92,69	91,71	85,75	97,50
Sables grossiers	7,21	8,30	13,90	2,58
Nature des sédiments	Sables purs	Sables purs	Sables purs	Sables purs

Tableau 6 : Résultats de la répartition des principales fractions sédimentaires et de la nature des sédiments prélevés des sites d'études selon la classification d'Ibouily (1981).

L'analyse des résultats du profil granulométrique (Figure 19 et Tableau 6) des sédiments des deux sites (S.J et R.M) montre que généralement la nature de leurs sédiments est identique (sables purs) avec une prédominance des sables fins (63-250 µm). Par ailleurs, la fraction fine (<63 µm) est plus élevée au niveau des sédiments du site R.M (0,57 %) par rapport au site S.J (0,19 %) surtout pour la ligne de profondeur 70 cm. Le pourcentage des sables grossiers est également faible au niveau de cette ligne de profondeur pour les sédiments du site R.M (2,58 %). Le pourcentage de la fraction fine augmente en fonction de la bathymétrie pour les sédiments des deux sites.

IV.3.2.2. Taux de carbonate de calcium

Le principe de l'analyse du taux de carbonate de calcium (CaCO₃) repose sur l'étude de la réaction de la destruction du carbonate de calcium par un acide. Le volume du CO₂ dégagé lors de l'attaque chlorhydrique d'un poids de sédiment connu est mesuré selon la formule suivante : $\text{CaCO}_3 + 2 \text{HCL} \rightarrow \text{CaCl}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$

Le calcimètre de Bernard est utilisé pour déterminer le taux de calcaire des sédiments étudiés.

% CaCO ₃	S.J		R.M	
	20 cm	70 cm	20 cm	70 cm
	22,5	28,6	36,7	37,4

Tableau 7 : Moyenne du taux de carbonate de calcium dans les sédiments superficiels des sites étudiés (S.J et R.M).

Les résultats de la mesure du taux de carbonate de calcium dans les sédiments superficiels des deux sites étudiés montrent des pourcentages plus élevés en CaCO₃ au niveau des sédiments du site R.M par rapport au site S.J pour les deux lignes de profondeurs (20 et 70 cm).

La solubilité du carbonate de calcium dans les sédiments marins est souvent conditionnée par la température, les teneurs en CO₂ dans l'eau et l'hydrodynamisme (Ghazali, 2005). En effet, ce dernier facteur possède un pouvoir dissolvant le carbonate de calcium. En l'absence de données sur le taux de matière organique dans les sédiments étudiés, les taux élevés de CaCO₃ peuvent être expliqués par les apports en eaux grises souvent anoxiques de l'oued Méliane (Ben Lamine, 2005).

CHAPITRE V : Des variables biochimiques à l'étude de la structure et de la dynamique des populations : Cas de deux populations de *Donax trunculus* originaires de deux sites différant par leur degré de contamination dans le golfe de Tunis.

CHAPITRE V : Des variables biochimiques à l'étude de la structure et de la dynamique des populations : Cas de deux populations de *Donax trunculus* originaires de deux sites différant par leur degré de contamination dans le golfe de Tunis.

V.1. Présentation du chapitre

Les recherches actuelles préconisées en écotoxicologie pointent l'intérêt de la mise en évidence et de la caractérisation des liens qui peuvent exister entre les différents niveaux d'organisation biologique. En particulier, les relations entre les réponses des organismes observées à l'échelle sub-individuelle (biomarqueurs) à celles détectées à des niveaux d'organisations biologiques supérieurs (e.g. population, communautés). Cette démarche a pour but de combler les lacunes qui séparent les réponses sensibles et précoces (mais peu représentatives d'un point de vue écologique) des organismes vis-à-vis d'un stress et les modifications qui pourraient en résulter au niveau populationnel notamment et présentant ainsi une pertinence écologique élevée. L'objectif de ce premier chapitre de la partie présentation des résultats est l'étude de la mise en évidence des liens éventuels entre les réponses des bivalves (*D. trunculus*) à l'échelle sub-individuelle (batterie de biomarqueurs de défense et de dommage) en tant que système d'alerte sensible et précoce et celles observées à l'échelle supra-individuelle (population) pour leur représentativité écologique.

La palette des biomarqueurs sélectionnés comprend : *i*) L'ACHé mesurée comme marqueur de neurotoxicité et d'exposition aux composés à caractère inhibiteur des enzymes impliquées dans la transmission de l'influx nerveux ; *ii*) La LDH utilisée comme enzyme impliquée dans le processus du métabolisme anaérobie; *iii*) La Cat utilisée comme marqueur de stress général impliquée dans les mécanismes de défense vis à vis du stress oxydant ; *iiii*) La quantification des TBARs a permis d'évaluer l'état de la peroxydation des lipides membranaires des bivalves ; *iiiiii*) L'activité enzymatique des GSTs, couramment utilisée dans les études écotoxicologiques comme enzyme impliquée dans la phase II du processus de la détoxification de nombreux xénobiotiques.

Dans l'objectif de l'utilisation des biomarqueurs en surveillance environnementale, il est nécessaire de bien distinguer les réponses causées par la pollution de celles résultant des facteurs de stress naturels (biotiques et/ou abiotiques).

Dans les études classiques d'écologie des populations ou encore les études d'évaluation des ressources vivantes, on a recours aux techniques d'identification des classes de taille pour représenter la structure des populations. Une fois cette dernière établie, le besoin de modéliser sa dynamique est nécessaire afin d'obtenir des paramètres « écologiquement exploitables » tels que la croissance des cohortes, le taux de mortalité naturel, l'âge de la première maturité sexuelle.... Si un certain nombre de données est fournie, la modélisation de la dynamique des populations peut générer entre autres des données sur le mode de recrutement, le nombre et le taux de croissance des cohortes recrutées et l'analyse des relations longueurs/âge. La méthode de Battacharia (1967) repose sur le principe de l'analyse progressive des modes des classes de tailles. En effet, elle permet d'identifier les cohortes en décomposant la distribution de tailles polymodales dans l'ensemble des données pour définir les moyennes et les écarts-types des tailles des groupes d'individus constituant une cohorte. Pour être définies comme des cohortes, ces dernières sont supposées avoir un indice de séparation intergroupe supérieur à 2 (Gayani et al., 2005).

Au niveau populationnel, les paramètres sélectionnés dans cette thèse sont : *i*) La structure et la dynamique des populations, *ii*) Le recrutement des cohortes, *iii*) Le taux de croissance des cohortes.

Dans ce travail, des bivalves (*D.trunculus*), originaires de deux sites contrastés par leur degré de contamination dans le golfe de Tunis : le site multi-contaminé R.M et la station S.J comme site comparatif de référence, ont été collectés bimensuellement de novembre 2008 à octobre 2009.

Publication 1: Linking changes at sub-individual and population levels in *Donax trunculus*: assessment of marine stress.

S. Tlili, I. Métais, H. Boussetta & C. Mouneyrac. Chemosphere (2010) 81, issue 6: 692-700.

Chemosphere 81 (2010) 692–700



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere



Linking changes at sub-individual and population levels in *Donax trunculus*:
Assessment of marine stress

Sofïène Tlili^{a,b,c}, Isabelle Métais^{a,b}, Hamadi Boussetta^c, Catherine Mouneyrac^{a,b,*}

^aUniversité de Nantes, MMS, EA2160, Faculté de Pharmacie, 1 rue G. Veil, BP 53508, 44035 Nantes Cedex 1, France

^bUniversité Catholique de l'Ouest, Institut de Biologie et Ecologie Appliquée, CERE, 44 rue Rabelais, 49008 Angers Cedex 1, France

^cInstitut Supérieur Agronomique de Chott-Mariem, Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie de l'Environnement, 4042 Sousse, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2010

Received in revised form 26 July 2010

Accepted 28 July 2010

Available online 21 August 2010

Keywords:

Bivalve

Donax trunculus

Biomarkers

Population

Environmental assessment

ABSTRACT

Research in ecotoxicology currently focuses to fill the gap existing between sub-organismal responses (e.g. biomarkers) to toxicants and effects occurring at higher levels of biological organisation (e.g. population). The intra-sedimentary bivalve *Donax trunculus* commonly found in West Atlantic and Mediterranean coasts is a sentinel species useful for biomonitoring studies in sandy beaches. The objective of this work was to link responses at the infra-individual level (core biomarkers as early and sensitive tools) to supra-individual level (population for its ecological relevance). *D. trunculus*, originating from a polluted site (Radès Méliane) and a comparatively reference site (Sidi Jehmi) in the Gulf of Tunis (Tunisia), were collected bimonthly from November 2008 to October 2009. An increase in catalase activities was usually observed in bivalves from the polluted site compared to the reference site whereas no differences in TBARs were depicted. The anti-oxidant enzyme (catalase) could be able to prevent the deleterious effect on the lipid membranes. Usually GST activities were decreased in the polluted site. Significantly high inhibition in AChE activities in bivalves from the polluted site suggested neurotoxicity disturbances to their *in situ* exposure to compounds such as organophosphate and carbamates pesticides, heavy metals. Size-distribution of populations of *D. trunculus* from the polluted Radès Méliane site consisted of four cohorts whereas five cohorts were depicted in the comparatively reference Sidi Jehmi site. The mean total length size and the growth rate of cohorts were significantly reduced in the impacted site compared to the reference site.

In conclusion, it may be suggested that disturbances in responses to chemical stress at the infra-individual level could be linked to the responses observed at the population level.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Historically, coastal and estuarine zones have been areas of settlement for many human populations, resulting in a number of negative effects on the natural environment. Water quality in these sites is decreased as a consequence of inputs of chemicals associated with industrial and domestic activities, pesticides and fertilizers originating from agriculture. In addition to such local contamination, coastal and estuarine waters receive contaminants via local anthropogenic activities and through riverine inputs (Eggleton and Thomas, 2004). River transport of nutrients is also responsible for the high productivity of nearby coastal areas. The Gulf of Tunis is located in North-East of Tunisia with an area of 1500 km² and 160 km of coasts. For a few years, the

littoral of Tunis Gulf has been subjected to agricultural activities (132 000 ha under fertilizer pressure), industrial, urban and tourist development and consequently submitted to the impact of many chemical and physical stressors (Raïs, 1999; Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, 2003; Zairi et al., 2004; Afli et al., 2008). Wastes resulting from these anthropogenic activities are dumped into the sea via two main channels: "Méliane" oued flowing to "Radès" beach and "Khleij" channel flowing into "Raoued" beach (Masmoudi et al., 2007). Recently, Mzoughi et al. (2010) reported that concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and tissue of different fish species collected in various stations in the Gulf of Tunis varied between 0.001 and 2.6 µg g⁻¹ and from 0.1 to 0.35 µg g⁻¹ dry weight, respectively. Concerning metals (Cd, Pb, Hg, Cu, Zn, Fe), concentrations in surface sediment of the Tunis gulf can be considered lower than levels found in other coastal marine areas of the Mediterranean Sea (Ennouri et al., 2010).

For a better assessment of environmental health and then management strategies, it is important to improve ecotoxicological

* Corresponding author at: MMS, EA2160, Faculté de Pharmacie, 1 rue G. Veil, BP 53508, 44035 Nantes Cedex 1, France. Tel.: +33 02 41 81 66 45; fax: +33 02 41 81 66 74.

E-mail address: catherine.mouneyrac@uco.fr (C. Mouneyrac).

V.2. Abstract

Research in ecotoxicology currently focuses to fill the gap existing between sub-organismal responses (e.g. biomarkers) to toxicants and effects occurring at higher levels of biological organisation (e.g. population). The intra-sedimentary bivalve *Donax trunculus* commonly found in West Atlantic and Mediterranean coasts is a sentinel species useful for biomonitoring studies in sandy beaches. The objective of this work was to link responses at the infra-individual level (core biomarkers as early and sensitive tools) to supra-individual level (population for its ecological relevance). *D. trunculus*, originating from a polluted site (Radès Méliane) and a comparatively reference site (Sidi Jehmi) in the Gulf of Tunis (Tunisia), were collected bimonthly from November 2008 to October 2009. An increase in catalase activities was usually observed in bivalves from the polluted site compared to the reference site whereas no differences in TBARs were depicted. The anti-oxydant enzyme (catalase) could be able to prevent the deleterious effect on the lipid membranes. Usually GST activities were decreased in the polluted site. Significantly high inhibition in AChE activities in bivalves from the polluted site suggested neurotoxicity disturbances to their in situ exposure to compounds such as organophosphate and carbamates pesticides, heavy metals. Size-distribution of populations of *D. trunculus* from the polluted Radès Méliane site consisted of four cohorts whereas five cohorts were depicted in the comparatively reference Sidi Jehmi site. The mean total length size and the growth rate of cohorts were significantly reduced in the impacted site compared to the reference site.

In conclusion, it may be suggested that disturbances in responses to chemical stress at the infra-individual level could be linked to the responses observed at the population level.

Key words: *Donax trunculus*, biomarkers, population, environmental assessment.

V.3. Introduction

Historically, coastal and estuarine zones have been areas of settlement for many human populations, resulting in a number of negative effects on the natural environment. Water quality in these sites is decreased as a consequence of inputs of chemicals associated with industrial and domestic activities, pesticides and fertilizers originating from agriculture. In addition to such local contamination, coastal and estuarine waters receive contaminants via local anthropogenic activities and through riverine inputs (Eggleton and Thomas, 2004). River transport of nutrients is also responsible for the high productivity of nearby coastal areas.

The Gulf of Tunis is located in North-East of Tunisia with an area of 1500 km² and 160 km of coasts. For a few years, the littoral of Tunis Gulf has been subjected to agricultural activities (132 000 ha under fertilizer pressure), industrial, urban and tourist development and consequently submitted to the impact of many chemical and physical stressors (Raïs, 1999; Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, 2003; Zaïri et al., 2004; Afli et al., 2008). Wastes resulting from these anthropogenic activities are dumped into the sea via two main channels: "Méliane" oued flowing to "Radès" beach and "Khleij" channel flowing into "Raoued" beach (Masmoudi et al., 2007). Recently, Mzoughi et al. (2010) reported that concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and tissue of different fish species collected in various stations in the Gulf of Tunis varied between 0.001 and 2.6 µg g⁻¹ and from 0.1 to 0.35 µg g⁻¹ dry weight, respectively. Concerning metals (Cd, Pb, Hg, Cu, Zn, Fe), concentrations in surface sediment of the Tunis golf can be considered lower than levels found in other coastal marine areas of the Mediterranean Sea (Ennouri et al., 2010).

For a better assessment of environmental health and then management strategies, it is important to improve ecotoxicological tools. In this sense, it is necessary to investigate the links between responses at sub-individual level (the more sensitive) to effects at supra-individual levels (i.e. population level) revealing ecotoxicological consequences of chemical stress (Forbes et al., 2006). By the mid 1980s a wide range of biomarkers that constitute an early warning system have been developed in environmental assessment and recently, the methodology of biomarkers has been revisited (Amiard and Amiard-triquet, 2008). Acetylcholinesterase (AChE) activity is widely used as a biomarker of exposure to organophosphate and carbamate pesticides (Bocquené et al., 1990), but the activity of this enzyme can also be inhibited by other contaminants such as metals, synthetic detergents,

some components of fuel oils and algal toxins (Payne et al., 1996; Guilhermino et al., 1998; Lehtonen et al., 2003; Tim-Tim et al., 2009). The glutathione- S-transferases (GSTs) are a multiple-enzyme family involved in phase II detoxification processes and are used as biomarkers of several groups of pollutants including organochlorine pesticides, PCBs and petrochemical products in invertebrates (Fitzpatrick et al., 1997; Hoarau et al., 2001; Lima et al., 2007). An anti-oxidant enzyme, catalase, is widely used as a marker involved in the primary defence against oxidative damage (Bergayou et al., 2009). The thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) which reflect the state of lipid peroxidation of the membrane are used as markers of oxidative-stress (Knight et al., 1988). Lactate dehydrogenase (LDH) activity, as the terminal enzyme of anaerobic glycolysis, plays an important function in anaerobic metabolism (Diamantino et al., 2001). Biomonitoring programmes are generally based on sentinel species representative of the water column, such as bivalves widely used for the assessment of environmental levels of contaminants (Mussel Watch programmes) as well as for examining biological effects of contaminants (WGBEC, 2006). Among marine organisms, mussels and oysters appeared to be most appropriate candidates for use as sentinel species: suspension feeders, ubiquitous, sedentary, bioaccumulators, and easily handled. But these bivalves are strictly present in rocky substrate and they cannot be used for pollution survey in sandy beach ecosystems. The suspension-feeder bivalve *Donax trunculus* living in the sediment is largely distributed in West-African, European and Mediterranean coasts and has been previously used as a sentinel species in environmental assessment (Roméo and Gnassia-Barelli, 1988; Fishelson et al., 1999; Moukrim et al., 2004; Neuberger-Cywiak et al., 2007). The two main objectives of the present study were: (i) to study the in situ responses of core biochemical biomarkers (AChE, catalase, GST, TBARs, LDH) in *D. trunculus* originating from a polluted site (Radès Méliane) and a comparatively reference (Sidi Jehmi) site in the Gulf of Tunis, (ii) to investigate possible links between these biomarker responses to population (structure and dynamics) studies in bivalves from both studied sites (Sidi Jehmi, Radès Méliane).

V.4. Materials and methods

V.4.1. Studied sites

Two sites in the Gulf of Tunis differing by their level of contamination were selected for this study. The sandy beach of Sidi Jehmi (36°43', 36N; 10°27', 33E) was chosen as a likely “reference” site because of its very low level of urbanization and industry. In contrast, the

Radès Méliane (36°45, 49N; 10°17, 59E) station is situated in a polluted area. Indeed, the coastal zone close to this area is the catchment basin of the most significant source of continental water constituted by the effluents of the Mejerda wadi and the Méliane Wadi. The Mejerda wadi is the most important wadi of Tunisia with a catchment of about 2500 Km² and a length of 430 km. The medium liquid flow is 915 mm³ and the medium sediment flow is 10 g L⁻¹, making a total of 17 million tons as an annual solid contribution in the gulf of Tunis. The Méliane wadi drains a watershed of 228 Km² and has a length of 160 km. The medium liquid flow is about 50 mm³ y⁻¹ with a solid load of around 20 400 tons per year. Méliane wadi's waters are highly polluted by discharges of 50% of non treated wastewater especially in its downstream part (Ben Charrada and Moussa, 1997; Added et al., 2003). Some studies mentioned the presence of residual polychlorinated biphenyls (PCBs) in superficial sediment of Méliane Wadi and in marine stations located offshore (Masmoudi et al., 2005). Water salinity was measured in the field for each sampling occasion in both studied sites whereas measurements of air temperature were provided by the Tunisian National Institute of Meteorology.

V.4.2. Field sampling

Specimens of *D. trunculus* were bimonthly collected by hand in both sites from November 2008 to October 2009. After collection, bivalves were transported to the laboratory in cool boxes filled with sand and covered with approximately 2 cm of seawater from the collection site. For each collection period, two types of sampling have been carried out according to the different objectives of the study. To study temporal and intersite variations of biomarkers, bivalves from both sites were collected in the same range of length (Sidi Jehmi: 20.8 ± 2.46 mm; Radès Méliane: 19.54 ± 1.85 mm). After removal of the shells, the total digestive gland was quickly dissected, frozen on dry ice and kept at -80 °C until biochemical analysis.

D. trunculus devoted to population structure and dynamics studies were collected from both sites (Sidi Jehmi, Radès Méliane) along four transects perpendicular to the coast. Ten stations on each transect were sampled at depth of 0.2 m, 0.5 m, 0.7 m, and 1 m, respectively. Hauls were conducted on a standard length of 100 m. A total of 6159 individuals were measured along the anteroposterior axis of the shell to the nearest 0.01 mm using a digital calliper.

V.4.3. Biomarker quantification

All procedures were carried out at 0–4 °C. As an influence of weight on biomarkers in different aquatic species has been previously depicted, we have all over the sampling period and for each site, selected animals in the same tissue-weight range (Ait Alla et al., 2006). For each sampling period and each site, pools (n = 5) of four digestive gland were homogenized in a TRIS buffer (Tris 0.1 M, NaCl 0.2 M, pH 7.2), 1 mM DTT (dithiothreitol), 0.1% protease inhibitor cocktail (containing 4-(2-aminoethyl) benzenesulphonyl fluoride, pepstatin A, E-64, bestatin, leupeptin and aprotinin, purchased from Sigma Aldrich), in a 1/4 ratio (w/v) with an ultra-turrax. An aliquot (150 µL) of the homogenate was centrifuged at 3300g for 5 min and used for LDH quantification according to Diamantino et al. (2001). The resting part of the homogenate was then centrifuged for 30 min at 9000g. Aliquots of the supernatant (called S9 fraction) were frozen at -80 °C until use. Catalase activity and TBARs levels were measured according to the methods of Aebi (1983) and Sunderman et al. (1985), respectively. AChE activity was determined using the method of Ellman et al. (1961) adapted to a microplate reader by Galgani and Bocquené (1991). GST activity was determined by the method of Habig et al. (1974) adapted to microplate by Frasco and Guilhermino (2002). Total protein concentration in the homogenate was determined by Bio-Rad Protein Assay based on the method of Bradford (1976).

V.4.4. Population structure and dynamics

Length-frequency distributions were calculated per 1 mm size classes over the study period for the population as a whole. The modal length of the cohorts were identified applying the Bhattacharya method (1967) using the FISAT II software package (Gayanilo and Pauly, 2005). The specific growth rate (GR) for each cohort identified was calculated by the following equation (1): $GR = (SL_x - SL_1) / (t_2 - t_1) = \Delta SL / \Delta t$ where SL_1 is the mean shell length (mm) of the considered cohort at the beginning of sampling (November 2008) and SL_x is the mean shell length (mm) of the considered cohort at the end of sampling (October 2009) or disappearing time.

V.4.4. Statistical analysis

The results of biomarkers quantified in *D. trunculus* from both sites and collected bimonthly from November 2008 to October 2009 are presented as means \pm SD. Statistical analysis were performed using SPSS[®] v12.0 and XLSTAT[®] v7.5. The normality of the distribution was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. To assess multiple comparisons, a parametric one-way analysis of variance (ANOVA) was performed on data, with a Tukey's test. To compare two groups, the student's t-test was used for a normal distribution; otherwise, the Mann and Whitney *U*-test was applied. In all cases, the level of significance was set to 0.05.

V.5. Results

V.5.1. Ecological parameters

The temporal variations of ecological (salinity, temperature) parameters from both sites (Sidi Jehmi, Radès Méliane) are illustrated in Table 8. Similar seasonal patterns of salinity were recorded in the contaminated Radès Méliane site and the comparatively reference Sidi Jehmi site with minimum winter values and maximum summer and autumn values. Salinity values were slightly higher in the Sidi Jehmi site vs. the Radès Méliane site. Concerning air temperature, similar seasonal patterns were also recorded in both sites.

Period	Temperature (°C)		Salinity (PSU)	
	S.J	R.M	S.J	R.M
November 2008	16.8	17.2	37.2	34.76
January 2009	11.8	12.5	34.2	30.73
March 2009	13	14.3	35.5	31.1
May 2009	20.1	21.6	36.5	33.2
August 2009	28	29.8	37.6	34.8
October 2009	19.9	20.9	37.4	34.2

Table 8. Temporal fluctuations of ecological parameters (salinity, temperature) (S.J: Sidi Jehmi; R.M : Radès Méliane).

V.5.2. Biomarkers

V.5.2.1. Temporal variations

Temporal variations of biomarkers (AChE, GST, catalase, TBARs, LDH) quantified in bivalves (*D. trunculus*) from both sites (Sidi Jehmi and Radès Méliane) are shown in Fig. 20. The highest mean values of AChE (Fig. 20A) activities in bivalves collected from the reference site (Sidi Jehmi) were depicted in March and May 2009 compared with other periods where only slight fluctuations were observed. For bivalves from the polluted site (Radès Méliane), a significant maximum mean value in AChE activity was observed in March 2009 ($20.03 \pm 1.83 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) and minimum values in May 2009 ($4.97 \pm 1.64 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$). Concerning GST (Fig. 20B) and catalase (Fig. 20C) activities, significant decreases were depicted in bivalves from both sites (Sidi Jehmi and Radès Méliane), from November 2008 to May 2009. Then, from May 2009 to October 2009, increases in GST and catalase activities were observed. With regard to TBARs (Fig. 20D), slightly fluctuations in bivalves from the reference site (Sidi Jehmi) were shown from November 2008 ($9.71 \pm 2.43 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) to May 2009 ($7.74 \pm 1.30 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$). Then, significant maximum values were observed in August ($18.03 \pm 2.18 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) and October 2009 ($21.71 \pm 3.83 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) compared with the other sampling periods. For bivalves from the polluted site (Radès Méliane), significant minimum values were depicted in January 2009 ($4.15 \pm 0.45 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) and maximum in August ($18.03 \pm 2.17 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) and October 2009 ($21.71 \pm 3.83 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$). For LDH (Fig. 20E) activities, a similar temporal pattern was observed according to animals from both sites. LDH activities increased steadily from November 2008 to March 2009 to reach a maximum peak in May 2009 followed by a significant decrease in August 2009. No significant correlations (data not shown) were depicted between salinity or temperature and biomarker values in bivalves from both sites.

V.5.2.2. Intersite variations

Mean (\pm SD) annual (from November 2008 to October 2009) values of biomarkers quantified in *D. trunculus* originating from the multi-contaminated Radès Méliane site and the comparatively reference Sidi Jehmi site are illustrated in Fig. 21. Significance of differences (*p* values) in biomarker values as a function of sampling date between sampling sites (Sidi

Jehmi vs. Radès Méliane) are illustrated in Table 9. AChE (Fig. 21A) activities were significantly ($p < 0.005$) lower in bivalves from the contaminated Radès Méliane site vs. the reference Sidi Jehmi site for the whole sampling periods. Mean (\pm SD) annual values of GST (Fig. 21B) and catalase (Fig. 21C) were significantly lower in bivalves from the contaminated site compared to the reference site. As a function of sampling date, significant differences were depicted in November 2008, January and March 2009 for GST; May, August and October 2009 for catalase (Table 9). TBARS (Fig. 21D) levels and LDH (Fig. 21E) activities showed no significant differences between mollusks from both sites excepted in August and October 2009; May and October 2009 where significantly higher TBARs (Fig. 21D, Table 9) levels and LDH (Fig. 21E, Table 9) activities, respectively, were depicted in animals from the polluted site vs. the comparatively reference site.

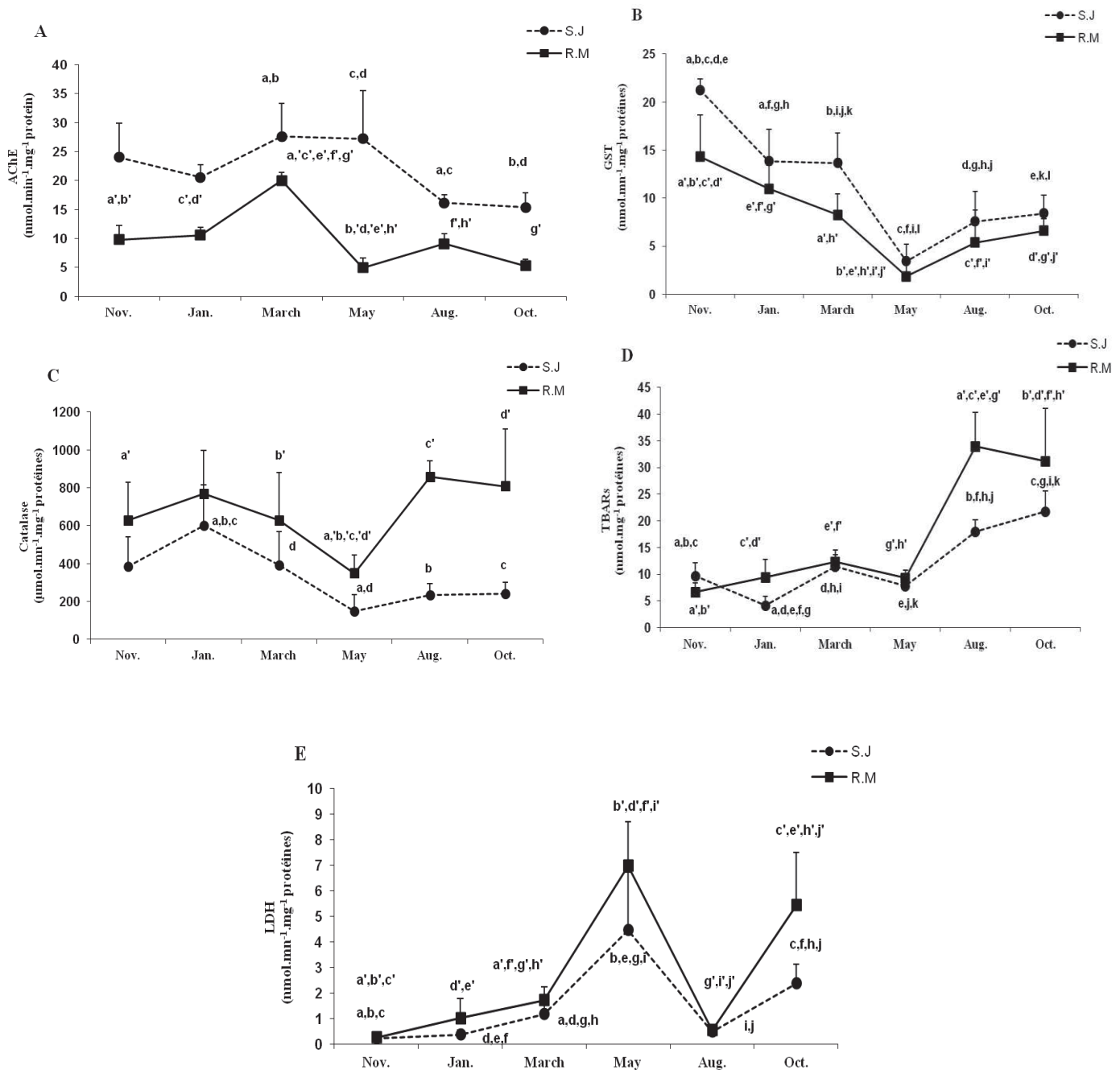


Fig.20: Temporal variations (means±S.D) of biomarkers (AChE: A; GST: B; Catalase: C; TBARS: D; LDH: E) in *D. trunculus* collected from two sites in the Gulf of Tunis. Same letters indicate a significant statistical difference between sampling periods.

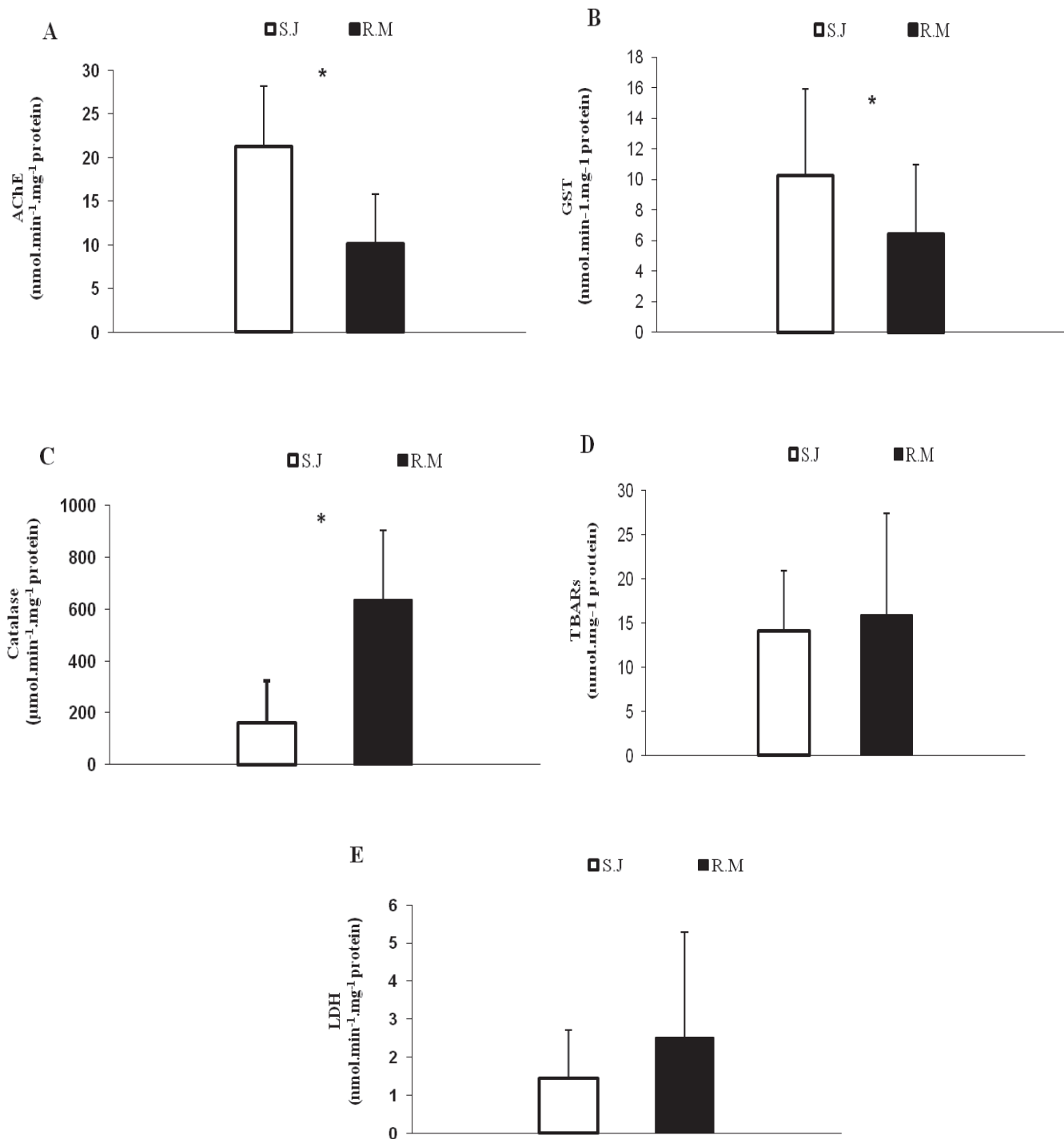


Fig.21: Annual mean values of AChE (A), GST (B), Catalase (C), TBARs (D), LDH (E) activities in *D.trunculus* collected from the two studied sites. White bars: Sidi Jehmi, black bars: Radés Méliane. * Indicates an intersite statistical difference.

	Nov. 2008	Jan. 2009	March 2009	May 2009	Aug. 2009	Oct. 2009
AChE						
<i>p</i> value	0.049	0.049	0.016	0.009	0.014	0.025
S.J vs R.M	SJ > RM	SJ > RM	SJ > RM	SJ > RM	SJ > RM	SJ > RM
Catalase						
<i>p</i> value	0.275	0.439	0.465	0.016	0.014	0.049
S.J vs R.M	SJ = RM	SJ = RM	SJ = RM	SJ < RM	SJ < RM	SJ < RM
GST						
<i>p</i> value	0.049	0.564	0.014	0.117	0.327	0.297
S.J vs R.M	SJ > RM	SJ = RM	SJ > RM	SJ = RM	SJ = RM	SJ = RM
LDH						
<i>p</i> value	0.827	0.248	0.175	0.034	0.806	0.025
S.J vs R.M	SJ = RM	SJ = RM	SJ = RM	SJ < RM	SJ = RM	SJ < RM
TBARs						
<i>p</i> value	0.127	0.121	0.289	0.165	0.014	0.034
S.J vs R.M	SJ = RM	SJ = RM	SJ = RM	SJ = RM	SJ < RM	SJ < RM

Table 9. Significance of differences in biomarker values between sampling stations (S.J: Sidi Jehmi; R.M: Radès Méliane) as a function of sampling dates (*p* values).

V.5.2.3. Population level

The length-frequency distributions of *D. trunculus* from the bimonthly samples collected between November 2008 and October 2009 in the Sidi Jehmi and Radès Méliane sites are illustrated in Figs. 22 and 23, respectively. Concerning the reference site (Sidi Jehmi), it was possible to distinguish five cohorts (A1, A2, A3, A4, A5) of *D. trunculus* and two recruitments periods per year, between May and August, and between August and October, respectively. With regard to the contaminated (Radès Méliane) site, it was possible to distinguish four cohorts (B1, B2, B3, B4) of *D. trunculus* and one recruitment period per year between May and August. The pattern of the shell growth of cohorts of *D. trunculus* depicted between November 2008 and October 2009 in the Sidi Jehmi and the Radès Méliane sites is illustrated in Fig. 24A and B, respectively. For bivalves from the reference site (Fig. 24A), in November 2008, three cohorts were present simultaneously: A1 (mean length: 19.51 mm), A2 (mean length: 12.77) and A3 (mean length: 8.69 mm). A1 reached the maximum length of 28.5 mm and disappeared in May 2009; A2 reached the maximum length of 26.83 mm and disappeared in August 2009 and A3 reached a length of 22.26 mm in October 2009. The first newly recruited cohort (A4) appeared in August 2009 (mean length: 8.11 mm) and the second one (A5) in October 2009 (mean length: 8.71 mm). Concerning *D. trunculus* from the Radès Méliane contaminated site (Fig. 24B), in November 2008 three cohorts were present simultaneously: B1 (mean length 16.01 mm), B2 (mean length 10.99 mm) and B3 (mean length 8.55 mm). B1 reached the maximum length of 19.51 mm and disappeared in May 2009. In October 2009, B2 and B3 reached the maximum lengths of 18.92 mm and 17.14 mm respectively. The newly recruited cohort (B4) appeared in August 2009 (mean length 7.72 mm). The growth rates (from November 2008 to October 2009) of the first three cohorts of *D. trunculus* were higher for the Sidi Jehmi reference population (A1: 1.5 mm month⁻¹, A2: 1.56 mm month⁻¹, A3: 1.23 mm month⁻¹) in comparison with the Radès Méliane contaminated population (B1: 0.59 mm month⁻¹, B2: 0.72 mm month⁻¹, B3: 0.78 mm month⁻¹). In contrast, A4 (1.28 mm month⁻¹) and B4 (1.58 mm month⁻¹) showed no differences in their growth rates.

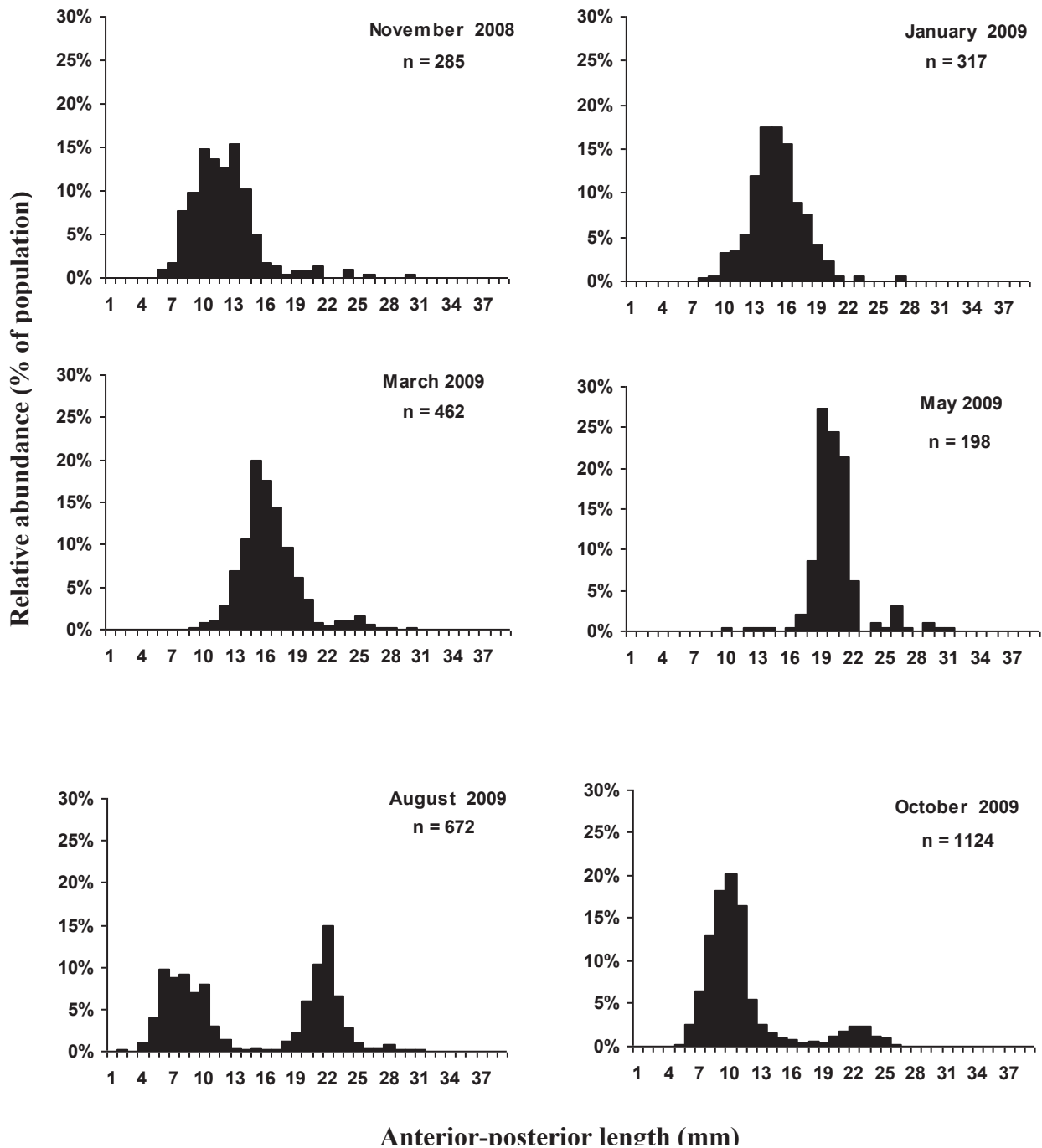


Fig.22: Bimonthly length frequency distributions from specimens collected between November 2008 and October 2009 from Sidi Jehmi.

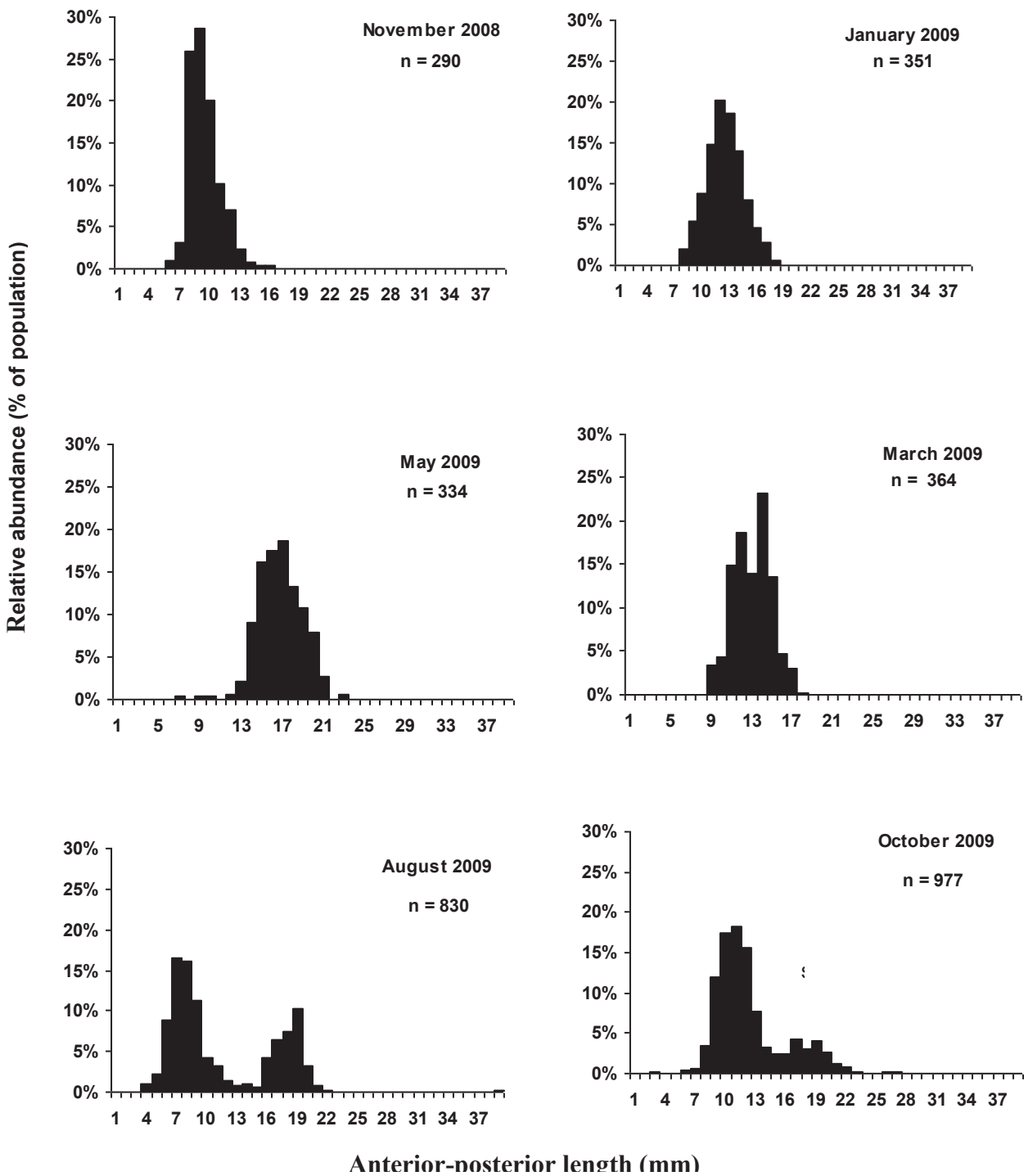


Fig.23: Bimonthly length frequency distributions from specimens collected between November 2008 and October 2009 from Radès Méliane.

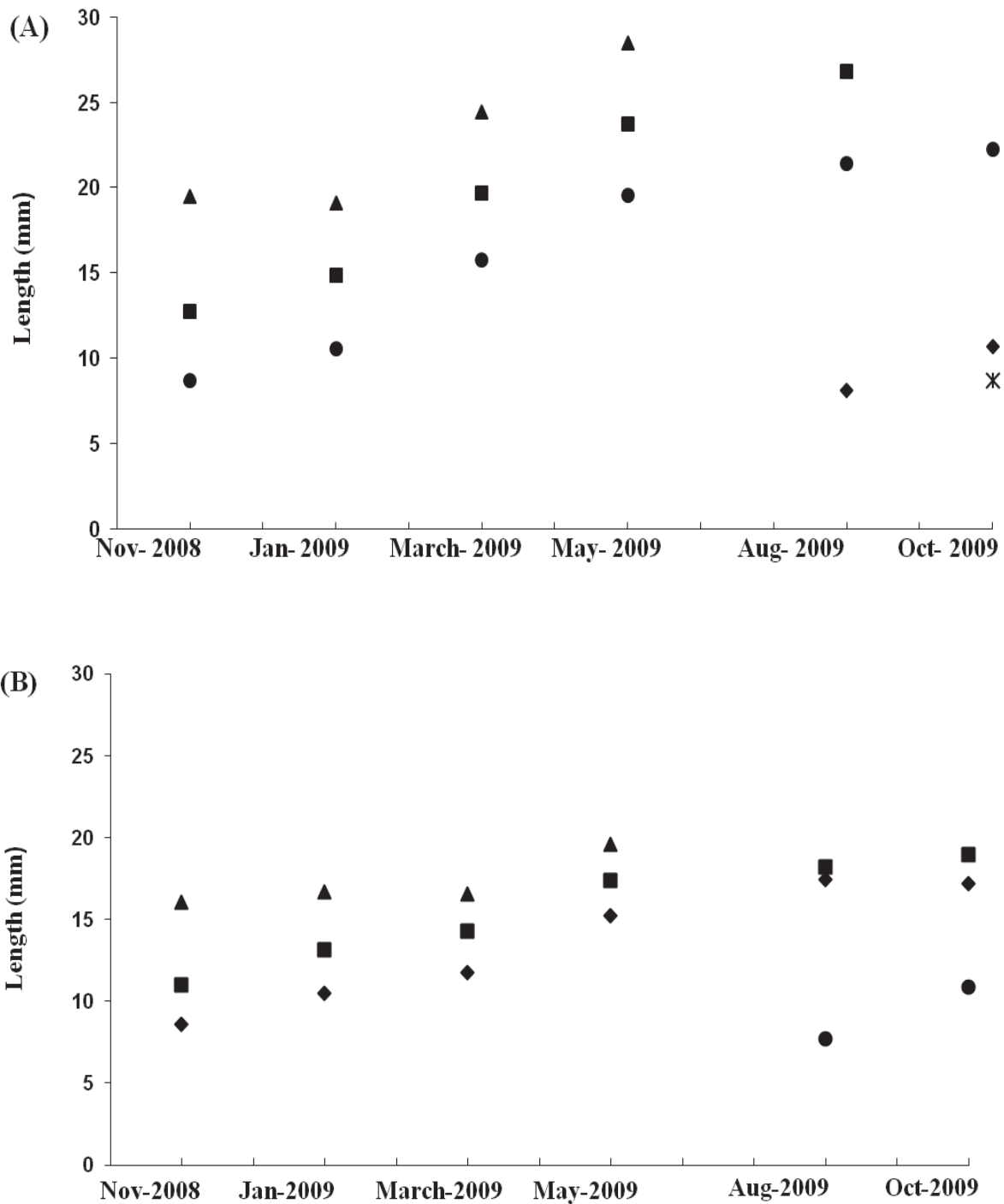


Figure 24: Pattern of shell growth of five cohorts between November 2008 and October 2009 determined from bimonthly progression of mean size of each cohort. A: Sidi Jehmi site (● Cohort A1, ■ Cohort A2, ▲ Cohort A3, ◆ Cohort A4, × Cohort A5). B: Radès Méliane (▲ Cohort B1, ■ Cohort B2, ◆ Cohort B3, ● Cohort B4).

Growth rate (mm/ month)

Site 1: Sidi Jehmi		Site 2 : Radès Méliane	
Cohort	Growth rate	Cohort	Growth rate
A1	1.5	B1	0.59
A2	1.56	B2	0.72
A3	1.23	B3	0.78
A4	1.28	B4	1.58
A5	-		

Table 10. Growth rate (mm/month) of cohorts from the two studied sites (A5 is a new cohort appeared at the end of the study, calculation of growth rate was impossible).

V.6. Discussion

In environmental monitoring programmes, quantification of chemicals perceived to be relatively easy to analyze such as heavy metals, some congeners of PCBs, some individual PAHs, is usually performed. However, complex mixtures of contaminants present in coastal and estuarine zones contain substances for which chemical analyses are not yet available or are extremely expensive. The multibiomarker approach appears to be effective in estimating the toxicity of complex mixtures (Amiard and Amiard-Triquet, 2008). Because most of these biochemical biomarkers are a source of considerable dissatisfaction due to their lack of ecological relevance (Forbes et al., 2006), it is important to investigate cascading effects: from sub-organismal responses (e.g. biomarkers: AChE, catalase, TBARs, LDH, GST) to toxicants and effects occurring at higher levels of biological organisation (e.g. population: structure and dynamics) as recommended by Amiard-Triquet and Rainbow (2009).

In order to use biochemical, cellular, physiological or behavioural variation as pollution biomarkers, it is necessary that the change due to contamination exceeds the natural variability (Cairns, 1992). The relationships between contaminant levels in organisms,

biochemical responses and availability of nutrients, growth dilution with season and other factors such as the reproductive cycle of bivalves have been already reported (Almeida et al., 2007). In the present work, usually quite similar seasonal variations in all the studied biomarkers were observed in bivalves (*D. trunculus*) from both collection sites (Radès Méliane, Sidi Jehmi). Highest GST and catalase activities were observed in *D. trunculus* from both studied sites in winter and early spring compared to the lowest activities of GST and catalase in May 2009. These results suggested that during the raining period, bivalves were exposed to an oxidative-stress and to xenobiotics. In May and October, corresponding to the spawning period of bivalves (Manca-Zeichen et al., 2002), the peak in LDH activities indicated that probably animals experienced anaerobic metabolism. Indeed, LDH has been proposed as a biomarker of hypoxia in aquatic invertebrates species such as mussels (Wu and Lam, 1997), crustaceans (Diamantino et al., 2001). The highest TBARs levels observed in August and October 2009, compared to the other sampling periods, suggested a deleterious effect on the lipid membranes of bivalves. The marked inhibition in AChE activities in bivalves from both sites, during the warm period could be explained by the negative effect of temperature as already reported in other species of marine bivalve (Bocquené et al., 1997; Dellali et al., 2001). Bocquené et al. (1997) indicated that AChE activity was not directly related to the sex, the age or the reproduction period in most marine adult organisms and that among environmental parameters, attention must be paid to the temperature. Moreover, the effect of temperature on AChE activity in *D. trunculus* from the polluted site (Radès Méliane) appeared to act synergistically with the effect of anthropogenic inputs by comparison with the reference Sidi Jehmi site (see below). Concerning intersite differences, the significant inhibition of AChE activities in bivalves (*D. trunculus*) from the contaminated site (Radès Méliane) compared to the reference site (Sidi Jehmi) could be explained by wastewater discharges and the agricultural influence in the catchment basin of Oued Meliane (Ben Charrada and Moussa, 1997). Indeed, due to the large number of studies dealing with pesticides, the inhibition of AChE used as a biomarker of exposure to organophosphorus and carbamate pesticides is well-documented for aquatic biota (Amiard-Triquet, 2009). Moreover, contaminants other than pesticides could be responsible for the depressed AChE activity levels (Payne et al., 1996; Guilhermino et al., 1998; Lehtonen et al., 2003; Tim-Tim et al., 2009). The high mean annual catalase activity observed in bivalves (*D. trunculus*) in the contaminated site (Radès Méliane) by comparison with the reference site (Sidi Jehmi) implies that organisms have been exposed to an oxidative-stress certainly due to the presence of organics and organometallics. As stated by Cossu et al. (1997), catalase is often one of the

earliest anti-oxidant enzymes, to be induced. However, the non-specificity of catalase does not allow identifying precisely the origin of enzymatic responses. High TBARs levels depicted in August and October 2009 in the contaminated Radès Méliane site vs. the reference Sidi Jehmi site, indicate that probably the antioxidant enzyme (catalase) was not sufficient to prevent the deleterious effect on the lipid membranes as reported in other bivalve species (Bergayou et al., 2009). Numerous studies reported raised GST activities in diverse aquatic species in response to environmental or laboratory exposure to xenobiotics (Hoarau et al., 2001; Camargo and Martinez, 2006). In the present work, annual mean values showed significant lower GST activities in bivalves from the multi-contaminated Radès Méliane site in comparison with the reference Sidi Jehmi site. Similar results have been previously observed in other species of bivalves (Richardson et al., 2008), in gastropods (Roméo et al., 2006), in fish (Van der Oost et al., 2003). In the field, the presence of complex chemical mixture may explain the variability in GST activity. In the present work, GST activity was measured with CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene), a relatively non-specific GST reference substrate (Gallagher et al., 2000). Therefore, GST activity reflects all GST isoenzyme activities. In mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed in laboratory to benzo[a]pyrene, the decrease of total GST activity in the gills compared to controls may indicate an inhibition of an isoform by this xenobiotic accumulated in the mussel whole tissues (Hoarau et al., 2006). Another common explanation to results of the present work may be also proposed. When the level of chemical stress is too high, GST activity decreases, becoming similar to or even lower than levels in controls. This produces a bell-shaped curve to describe GST content in an exposed organism against exposure concentration of a potential GST-inducing xenobiotic (Dagnino et al., 2007). Activation of defenses to cope with chemical stress is metabolically costly leading to a shift in allocation of energy with implications for growth and reproduction and potential effects at the population level (Calow, 1991). In the present study, several consistent differences between the two populations were observed. Size distribution of population dynamics revealed that the population originating from the reference Sidi Jehmi site consisted of five cohorts whereas only four cohorts were depicted in the population from the contaminated Radès Méliane site. During the annual survey (from November 2008 to October 2009), a bimodal pattern of recruitment (between May and August, and between August and October) was revealed in the studied population from the Sidi Jehmi reference site whereas an unimodal recruitment (between May and August) was the pattern observed in the population from the Radès Méliane contaminated site. Data from literature indicate that a bimodal recruitment is the common pattern observed in the Mediterranean (Ramón et al.,

1995). Differences according to sites in growth patterns of cohorts were depicted. Usually, impairments of growth rate of cohorts depicted in bivalve populations from the Radès Méliane impacted site were observed in comparison with the populations from the Sidi Jehmi reference site. Growth patterns have been shown to vary considerably among different areas (Ramón et al., 1995) suggesting a remarkable growth plasticity for the species *D. trunculus* in different environmental conditions.

V.7. Conclusions

In conclusion, our results demonstrate the usefulness of *D. trunculus* as a sentinel species for biomonitoring based on biochemical biomarkers and population studies allowing to reveal intersite differences. At the infra-organism level, disturbances in biochemical biomarkers observed in bivalves from the contaminated (Radès Méliane) site in comparison with the reference (Sidi Jehmi) site could in part explain impairments observed at the population level (recruitment, growth pattern). Because *D. trunculus* is an important component of the shallow-bottom macrofauna of sandy beaches, the cascading effects observed from infra-individual (biomarkers) and population levels may extended further to community level.

Acknowledgments

This study was supported by a PhD fellowship accorded to Sofiène Tlili from the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF). The authors thank Françoise Gourdon for her technical assistance.

V.8. Conclusion partielle du chapitre

Les résultats obtenus dans ce travail ont permis d'établir un lien entre les réponses des bivalves (*D. trunculus*) observées au niveau sub-individuel (biomarqueurs) et celles au niveau populationnel.

Le suivi des variations temporelles de la réponse de la batterie de biomarqueurs étudiée a montré une nette influence saisonnière. En effet, les valeurs maximales de l'activité AChE chez les bivalves collectés du site de référence (S.J), ont été observées en mars ($27,6 \pm 5,7$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹.protéines) et en mai 2009 ($27,2 \pm 8,3$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹.protéines) alors qu'une diminution significative de l'activité AChE a été notée en août ($16,1 \pm 1,3$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹.protéines) et en octobre 2009 ($15,3 \pm 2,5$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹.protéines). En ce qui concerne les bivalves du site multi-contaminé (R.M), la valeur maximale de l'activité AChE a également été observée en mars 2009 ($20,03 \pm 1,83$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹.protéines) et la valeur minimale en mai 2009 ($4,97 \pm 1,64$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹.protéines).

L'inhibition de l'activité AChE observée au cours de la période des températures élevées (août) chez les bivalves originaires des deux sites peut être expliquée par l'effet négatif de la température sur l'activité AChE (Bocquené et al., 1997). Ce constat a déjà été observé chez d'autres espèces de bivalves marins tels que *R. decussatus* et *M. galloprovincialis* (Dellali et al., 2001). Chez *D. trunculus* originaire du site multi-contaminé (R.M), la température semble agir en synergie avec les effets anthropiques (drainage des composés neurotoxiques par l'oued Méliane).

Concernant les activités GSTs et Cat, des diminutions ont été observées de novembre 2008 à mai 2009 chez les bivalves originaires des deux sites (S.J et R.M). Le mois de mai représente un vrai point d'inflexion pour le cycle des activités GSTs et Cat, avec des augmentations croissantes de ces activités jusqu'à octobre 2009.

De légères fluctuations du taux des TBARs chez les bivalves originaires du site S.J ont été observées de novembre 2008 ($9,71 \pm 2,43$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹.protéines) à mai 2009 ($7,74 \pm 1,30$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹.protéines). Ensuite, une augmentation du taux des TBARs a été enregistrée en août ($18,03 \pm 2,18$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹.protéines) et en octobre 2009 ($21,71 \pm 3,83$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹.protéines). Pour les bivalves du site multi-contaminé (R.M), la valeur minimale des TBARs a été observée en janvier 2009 ($4,15 \pm 0,45$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹.protéines) et la valeur maximale en août ($18,03 \pm 2,17$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹.protéines) et en octobre 2009 ($21,71 \pm 3,83$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹.protéines).

Le suivi temporel de l'activité LDH chez les bivalves originaires des deux sites (S.J et R.M) montre une augmentation croissante de novembre 2008 à mars 2009 pour atteindre un maximum en mai (S.J: $4,4 \pm 2,2 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}.\text{protéines}$; R.M: $6,9 \pm 1,7 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}.\text{protéines}$). Ce pic de l'activité LDH est suivi par une chute en août (S.J : $0,4 \pm 0,1 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}.\text{protéines}$; R.M : $0,52 \pm 0,2 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}.\text{protéines}$).

Ainsi, quel que soit le degré de contamination des sites considérés, le mois de mai, qui correspond au début de la période de ponte pour les populations de *D.trunculus* dans le golfe de Tunis, semble avoir une influence nette dans la régulation des mécanismes biochimiques de la réponse des biomarqueurs. Les diminutions significatives des activités de la GST, Cat, AChE, des taux des TBARs et en contrepartie l'élévation nette de l'activité de LDH, en témoignent. Cette diminution de l'activité des quatre biomarqueurs (AChE, Cat, GSTs et TBARs) peut être expliquée par le fait que pendant la période de ponte, les bivalves subissent un stress se traduisant principalement par un faible pouvoir métabolique des xénobiotiques et une allocation énergétique dédiée à la libération des gamètes. Par contre, l'augmentation de l'activité LDH peut être expliquée par les modifications métaboliques (métabolisme anaérobie) coïncidant avec la période de ponte des bivalves dans les deux sites d'étude.

Dans l'objectif d'une comparaison inter-site des réponses biomarqueurs, l'analyse de leurs moyennes annuelles montrent : *i*) Aucune différence inter-site des activités LDH et des niveaux des TBARs, *ii*) Une inhibition des activités AChE et GSTs d'un facteur 0,5 et 0,6 respectivement, chez les bivalves du site R.M par rapport à ceux du site S.J, *iii*) Une induction de l'activité Cat d'un facteur 2,15 chez les bivalves du site R.M par rapport à ceux du site S.J.

Cette inhibition significative de l'activité AChE chez les bivalves originaires du site pollué (R.M), suggère leur exposition à un cocktail de polluants à caractère neurotoxique (pesticides carbamates et organophosphorés et certains métaux traces). En effet, les régions limitrophes au golfe de Tunis sont caractérisées par une forte pression anthropique, industrielle et agricole (Ben Cherrada, 1997 ; Masmoudi et al., 2007 ; Afli et al., 2008). Selon les statistiques du Ministère d'Agriculture en Tunisie, 132 000 hectares de terrains agricoles limitrophes au golfe de Tunis sont le siège d'activités agricoles intensives avec utilisation importante de fertilisants et de pesticides (Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, 2003). Les oueds Méliane et Medjerda drainent également des quantités importantes de résidus de tout type, qui finissent par se déverser dans le golfe de Tunis (Ben Hamza, 1994 ; Ben Cherrada, 1997 ; Hamrouni, 2006 ; Masmoudi et al., 2007). Très peu de données existent sur la nature et les quantités de polluants dans le golfe de Tunis, mais en se basant sur leurs origine (STEPS,

industries agroalimentaires, agriculture intensive, industrie chimique lourde...), on peut supposer la présence de contaminants chimiques de différents types (HAPs, pesticides, PCBs, etc.) présents dans les effluents drainés par les dits oueds dans le golfe de Tunis. D'autant plus, que certains auteurs (Galloway et al., 2002; Rickwood & Galloway, 2004., Viarengo et al., 2007) soulignent le fait que, spécifiquement chez les bivalves marins, les inhibitions nettes de l'activité AChE ne sont observables que lors d'une exposition à des concentrations élevées de substances à caractère neurotoxique.

L'induction de l'activité Cat chez les bivalves du site pollué (R.M) révèle leur exposition à un stress oxydant. Cependant, puisqu'aucune différence inter-site des niveaux de TBARs n'a été observée, l'effet protecteur de la Cat peut expliquer l'absence de dégradation des lipides des membranes cellulaires.

Contrairement à l'induction des activités GST généralement observée chez les organismes exposés à des contaminants chimiques (Hoarau et al., 2001; Camargo & Martinez, 2006), nos travaux ont montré l'inverse. L'activité des GSTs était généralement diminuée chez les mollusques du site multi-contaminé (R.M) en comparaison avec ceux du site de référence (S.J). Des résultats similaires ont déjà été observés chez d'autres espèces de bivalves tels que *Perna viridis* exposés à différentes concentrations de pesticides organochlorés et de HAPs (Richardson et al., 2008), de gastéropodes tel que *Hexaplex trunculus* (Roméo et al., 2006) ou encore des poissons dulcicoles tel que *Cyprinus carpio* (Van Der Oost et al., 2003). Ceci peut être expliqué par la nature même de la réponse « en cloche » des enzymes de phase II en fonction des doses et des degrés d'exposition (Dagnino et al., 2007). En effet, la courbe de la modulation de la réponse de ces enzymes est caractérisée par une phase d'induction suivie d'une phase statique et ensuite d'une diminution de l'activité traduisant une saturation des sites actifs enzymatiques, expliquant ce phénomène de non-réponse substrat-enzymes. D'autre part, les GSTs étant une superfamille d'iso-enzymes, l'inhibition de certains iso-formes par certains xénobiotiques peut « masquer » la réponse inductive des autres iso-formes (Hoareau et al., 2006).

L'étude de la structure et de la dynamique des populations de *D. trunculus* originaires du site multi-contaminé (R.M) montre l'existence de quatre cohortes et un seul recrutement unimodal qui aurait lieu en été alors que cinq cohortes ont été identifiées chez les populations originaires du site de référence (S.J) avec un recrutement bimodal (au début et à la fin de l'été). Chez les populations méditerranéennes, le mode de recrutement généralement observé est le recrutement bimodal (Mouëza, 1972; Mouëza & Frenkiel-Renault, 1973; Mouëza &

Chessel, 1976 ; Ramón et al., 1995).

Le taux de croissance et la taille moyenne des cohortes identifiées ont été significativement réduits chez les bivalves du site multi-contaminé par rapport à ceux du site de référence. Les modifications observées entre les bivalves du site de référence (S.J) et ceux du site multi-contaminé (R.M) à l'échelle populationnelle (différences structurales du nombre des cohortes, du mode de recrutement, du taux de croissance) pourraient être expliquées en partie par les réponses des marqueurs biochimiques étudiés. L'activation des mécanismes de défense pour faire face à un stress chimique est métaboliquement coûteuse conduisant à une modification de l'allocation énergétique avec des implications directes au niveau individuel (croissance, reproduction) et des effets potentiels au niveau populationnel (Calow, 1991).

En conclusion, nos résultats ont montré l'utilité de *D. trunculus* comme espèce sentinelle pour la biosurveillance des plages sableuses en Méditerranée. Aussi, d'un point de vue opérationnel, les changements observés précocement (biomarqueurs) et considérés comme des outils relativement peu coûteux, pourraient servir de système d'alarme afin de prévoir des altérations à plus long terme pouvant contribuer à l'extinction locale de populations de ce bivalve (*D. trunculus*) dans le site multi-contaminé (R.M) du golfe de Tunis.

CHAPITRE VI : Application d'indices intégratifs en biosurveillance : Etude de cas de quatre sites de degrés de contamination différents dans le golfe de Tunis : Publication 2

CHAPITRE VI : Application d'indices intégratifs en biosurveillance : Etude de cas de quatre sites de degrés de contamination différents dans le golfe de Tunis

VI.1. Présentation du chapitre

Depuis plusieurs années, le littoral du golfe de Tunis a été soumis à de fortes pressions anthropiques, industrielles, agricoles et touristiques. En conséquence, il a été exposé à l'impact de nombreux contaminants chimiques susceptibles de contribuer à la dégradation écologique de cet écosystème. Les réponses à l'échelle sub-individuelle (biomarqueurs) chez les mollusques bivalves peuvent être utilisées comme de véritables systèmes d'alarme sensibles dans les études d'évaluation des risques écotoxicologiques.

Pour valoriser l'utilisation des biomarqueurs en gestion environnementale, il s'avère utile de disposer d'indices intégratifs qui permettent de faciliter l'interprétation des réponses biologiques et de présenter des outils simples et efficaces pour les gestionnaires de l'environnement (e.g. classement des sites selon l'état de stress).

L'objectif de ce deuxième chapitre de la partie présentation et discussion des résultats est d'intégrer dans deux indices (l'IBR et le HSI) les résultats issus d'un suivi spatio-temporel des réponses individuelles d'une batterie de biomarqueurs (AChE, MTs, Cat, TBARs, LDH et GST) chez des bivalves (*D. trunculus*) originaires de différents sites contrastés par leur degré de pollution dans le golfe de Tunis. Pour ce faire, quatre sites ont été sélectionnés (Figure 25): S.J, R.M, Kalaât El Andalous (K.A) et Radès Plage (R.P). Les sites S.J et R.M ont déjà été présentés dans le chapitre IV (Chapitre Matériel et Méthodes). Les caractéristiques des sites K.A et R.P sont présentés dans le paragraphe ci-dessous.

Le site K.A (37 ° 04 N, 10 ° 11, 22 E) est situé dans la zone de l'embouchure de l'oued Medjerda dans le golfe de Tunis. L'Oued Medjerda représente la plus importante source d'eau continentale en Tunisie. L'Oued Medjerda a un bassin versant de l'ordre de 23 500 km² et une longueur de 430 km. Le débit liquide moyen est de 29 m³.s⁻¹ alors que le débit solide est en moyenne de 10 g.L⁻¹ représentant un apport solide annuel au golfe de Tunis de 17 millions de tonnes (Pimienta, 1959). L'Analyse de l'eau de l'oued Medjerda montre généralement de faibles concentrations en métaux traces (Added et al., 2003), mais des

concentrations élevées de métaux dans les sédiments et l'eau ont été détectées dans les stations situées en aval de certains sites miniers (Ben Hamza, 1994). Le transect de cet oued draine également d'importants déchets urbains, plusieurs types de pesticides, d'engrais azotés et diverses substances chimiques fréquemment utilisées dans les activités agricoles locales (Ben Hamza, 1994; Ben Charrada & Moussa, 1997; Added et al., 2003).

Le Site R.P (36 ° 47, 16 N, 10 ° 17, 79 E) est localisé en face du complexe industriel de la baie de Tunis. Ce complexe abrite plusieurs types d'industries chimiques lourdes (métallurgie, cimenterie, fertilisants agricoles...) ainsi que des industries agro-alimentaires. Le port commercial de Radès, siège d'une grande activité portuaire est limitrophe à cette zone d'étude. Ce port assure 28% du trafic global, 88% du tonnage des marchandises conteneurisées, 76% du tonnage des marchandises chargées dans des unités roulantes, 91% du trafic de conteneurs en EVP (équivalent vingt pieds), 79% du trafic des unités roulantes et 24% du trafic de navires enregistré dans l'ensemble des ports de commerce Tunisiens (Office de la Marine Marchande et des ports de Tunisie, 2011). Ce site reçoit directement les eaux thermales de la centrale électrique de Radès (la plus importante centrale électrique en Tunisie) dont les rejets thermiques sont estimés à environ 1,3 millions de $m^3 \cdot jour^{-1}$ (Chouba, 2009).

L'intérêt de l'IBR repose sur le fait qu'il s'agit d'un indice biomarqueur intégratif permettant d'une part la classification des sites selon leur état de stress (en calculant la moyenne des IBR/ nombre de biomarqueurs) et d'autre part la visualisation de la contribution de chaque biomarqueur dans la batterie utilisée. Le HSI est quant à lui doté d'une interface graphique qui permet d'intégrer les résultats des réponses des biomarqueurs et de les comparer à une référence fixée (le site de référence relatif dans notre cas : S.J). Le HSI permet la classification des sites d'études selon ces cinq niveaux de stress environnemental : (A) : site non stressé, (B) : stress faible, (C) : stress moyen, (D) : stress élevé, (E) : état pathologique.

Les résultats obtenus dans ce travail quant à l'utilisation de ces deux indices (IBR et HSI) seront comparés et les avantages et les inconvénients de chacun d'eux discutés.



Figure 25: Sites d'étude (A) : Plage de Sidi Jehmi, (B) : Estuaire de l'oued Medjerda au niveau de la plage de Kalaât El Andalous, (C) : Plage de Radès Plage, (D) : Eaux grises de l'oued Méliane, (E) : Estuaire de l'oued Méliane, (F) : Centrale thermique au niveau de Radès Plage, (A-E : Photos S.Tlili ; F : www.images de Tunisie.com).

- **Publication 2: Biomarker indices for the assessment of the health status of the marine bivalve *Donax trunculus* along the Gulf of Tunis (Tunisia).**

Tlili, S., Boussetta, H., Mouneyrac, C. Soumise à Science of the Total Environment.

VI.2. Abstract

For a few years, the littoral of Tunis Gulf has been subjected to agricultural activities, industrial, urban and tourist development and consequently submitted to the impact of many chemical and physical stressors. Sub individual responses (e.g. biomarkers) in bivalves can be used as an early warning system for ecotoxicological risk assessment. However, the influence of many confounding factors such as ecological (e.g. temperature, salinity) or physiological (e.g. reproductive and nutritive status) parameters on biomarker levels must be taken carefully into account. The aim of the present study was to integrate into indices (Integrated Biomarker Response: IBR and Health Status Index: HSI) individual responses of six biochemical biomarkers (acetylcholinesterase, catalase, glutathione-S-transferases, thiobarbituric acid reactive substances levels, lactate dehydrogenase and metallothionein-like proteins) in *Donax trunculus* collected from four sites differing by their level of contamination in the Gulf of Tunis. Responses of IBR and HSI were compared and their strengths and weaknesses discussed. Results showed that HSI could be an easy tool for risk management but IBR results were more informative with regard to the seasonal contribution of each biomarker considered in the battery used in the present work. Previous investigations concerning other level of biological organization (individual and population) are in accordance with the present data (Tlili et al., 2010; 2011).

Key words: Integrated Biomarker Response, Health Status Index, biomarkers, *Donax trunculus*, environmental risk assessment.

VI.3. Introduction

Coastal zones are ecosystems important not only for biological productivity but also for the economic activity of a large number of regions. These systems are, however, subjected to anthropogenic stressors since they receive large amounts of effluents transported by rivers from remote and nearby conurbations and industrial and agricultural concerns. Complex mixtures of contaminants are present in these zones. A common practice in aquatic monitoring is based on the measure of chemical concentrations perceived to be relatively easy to analyze (e.g. heavy metals, some congeners of polychlorinated biphenyls: PCBs, some individual polycyclic aromatic hydrocarbons: PAHs), but for emerging pollutants (e.g. pharmaceuticals, alkylphenols), chemical analysis are extremely expensive or even not yet available. According to Depledge (1994), a biomarker is “a biochemical, cellular, physiological or behavioural variation that can be measured in tissue or body fluid samples or at the level of whole organisms that provides evidence of exposure to and/or effects of, one or more chemical pollutants (and/or radiations)”. The methodology of biomarkers has been extensively developed since the last 20 years, in response to the need for early-sensitive tools able to reveal sublethal effects in organisms, and responding precociously, well before measurable effects on individual performance and population/community changes occur (Amiard and Amiard-Triquet 2008; Amiard-Triquet and Rainbow 2009). The glutathione-S-transferases (GSTs), a multiple-enzyme family involved in phase II detoxification processes are used as biomarkers of organochlorine pesticides and PCBs in invertebrates (Roméo et al., 2003). Catalase involved in the primary defence against oxidative damage is widely used as a biomarker in bivalves (Roméo et al., 2003). Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) are oxidative stress markers reflecting the state of lipid peroxidation of the membrane (Knight et al., 1988). Lactate dehydrogenase (LDH) activity plays an important function in anaerobic metabolism since it is the terminal enzyme of anaerobic glycolysis (Diamantino et al., 2001). Because acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme essential to the correct transmission of nerve impulses, an inhibition of its enzymatic activity has been used to detect and measure the biological effects of organophosphorus and carbamates in the marine environment (Galgani and Bocquené, 1989). AChE activity may be also inhibited by heavy metals and algal toxins (Lehtonen et al., 2003). Metallothioneins (MTs), involved in the homeostasis and the detoxification mechanisms of heavy metals are well documented as biomarkers of metallic pollution (Amiard et al., 2006). MTs and AChE defined as “core biomarkers” have been validated for their use in environmental biomonitoring programmes (e.g. Mediterranean

Action Plan, MEDPOL; Convention for the protection of the marine environment of the North-East Atlantic, OSPAR convention). Because in the environment, mixtures of contaminants are present, it is necessary to use a battery of biomarkers (multi-biomarker approach) in order to reveal potential stress due to different classes of contaminants. In order to simplify their interpretation in biomonitoring programs, the integration of individual biomarker responses into indices has been proposed such as the multibiomarker pollution index (Narbonne et al., 1999), the Integrated Biomarker Response (IBR) suggested by Belaieff and Burgeot (2002), the expert system (Health Status Index: HSI) proposed by Dagnino et al. (2007), the aquatic ecosystem health index (Yeom and Adams, 2007), the Biomarker Response Index (Hagger et al., 2008).

For a few years, the littoral of Tunis Gulf has been subjected to intensive agricultural activities (132 000 ha under fertilizer pressure), industrial, urban and tourist development. Consequently the coastal zone of the gulf of Tunis has been submitted to the impact of many chemical and physical stressors (Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, 2003; Aflil et al., 2008). Wastes resulting from these anthropogenic activities are dumped into the sea via two main channels: "Méliane" oued flowing to "Radès" beach and "Khleij" channel flowing into "Raoued" beach (Masmoudi et al., 2007). Concentrations of PAHs in sediments and tissues of different fish species collected in various stations in the Gulf of Tunis varied between 0.001 and 2.6 µg/g and from 0.1 to 0.35 µg/g dry weight, respectively (Mzoughi et al., 2010). Concerning metals (Cd, Pb, Hg, Cu, Zn, Fe), concentrations in surface sediment of the Tunis gulf can be considered lower than levels found in other coastal marine areas of the Mediterranean Sea (Ennouri et al., 2010).

Donax trunculus which is a suspension-feeder bivalve living in the sediment and largely distributed in West-African, European and Mediterranean coasts has been previously used as a sentinel species in marine environmental assessment (Roméo and Gnassia-Barelli, 1988; Fishelson et al., 1999; Moukrim et al., 2004; Tlili et al., 2010, 2011).

In this work, six biochemical biomarkers (MTs, AChE, CAT, GST, TBARs and LDH) reflecting biological effects of various contaminants (e.g. heavy metals, organochlorine, pesticides...) have been applied in *D. trunculus* originating from four sites contrasted by their level of contamination in the Gulf of Tunis. A comparison of the potential use of the IBR and the HSI has been performed in order to strengthen their suitability in the marine

environmental assessment and ranking the health status along the marine coast of the Tunis Gulf.

VI.4. Materials and Methods

VI.4.1. Studied sites

Four sites in the Gulf of Tunis differing by their level of contamination were selected for this study (Fig. 26). The sandy beach of Sidi Jehmi (S.J) (36°43, 36N; 10°27, 33E) was chosen as a likely “reference” site because of its very low level of urbanization and industry. The Kalaât El Andalous (K.A) station (37°04, 41 N; 10°11, 22 E) is located in the coastal area near to the mouth of the Mejerda wadi; the most important source of continental water in Tunisia being constituted by the Mejerda wadi. This wadi has a catchment of about 2500 km² and a length of 430 km. The medium liquid flow is 915 mm³ and the medium sediment flow is 10 g/L, making a total of 17 million tons as an annual solid contribution in the Gulf of Tunis. Water analysis of the Mejerda wadi showed low concentrations of heavy metals (Added et al., 2003) but some elevated concentrations of heavy metals in sediments and water were detected particularly in stations located downstream of some mining sites (Ben Hamza, 1994). The transect of this wadi drains also important urban wastes and in particular several kinds of pesticides and fertilizer substances currently used in local agriculture activities (Ben Hamza, 1994; Ben Charrada, and Moussa, 1997; Added et al., 2003). The Radès Plage (R.P) site (36°47, 16 N; 10°17, 79 E) is localized in front of the industrial complex of Tunis bay (chemical and metallurgic industries, harbors and food and paper factories). This site receives thermal waters from the electric power station of Radès which thermal rejects are estimated around 1.3 million m³/day (Chouba, 2009). The Radès Méliane (R.M) station is located in a polluted area (36°45, 49N; 10°17, 59E) situated precisely in the coastal zone of the mouth of Méliane wadi. The Méliane wadi has a length of 160 km and drains a watershed of 228 km². The medium liquid flow is about 50 mm³/year with a solid load of around 20 400 tons per year. The waters of the Méliane wadi are highly polluted by discharges of 50% of non treated wastewater particularly in its downstream part (Added et al., 2003). Effluents from the Méliane Wadi and from the wastewater treatment plant of “Méliane Sud” are directly and

permanently discharged into the bay of Tunis as well as some uncontrolled industrial wastes from the industrial zone of Tunis and Radès.

Water salinity was measured in the field for each sampling period in the four studied sites whereas measurements of air temperature were provided by the Tunisian National Institute of Meteorology.

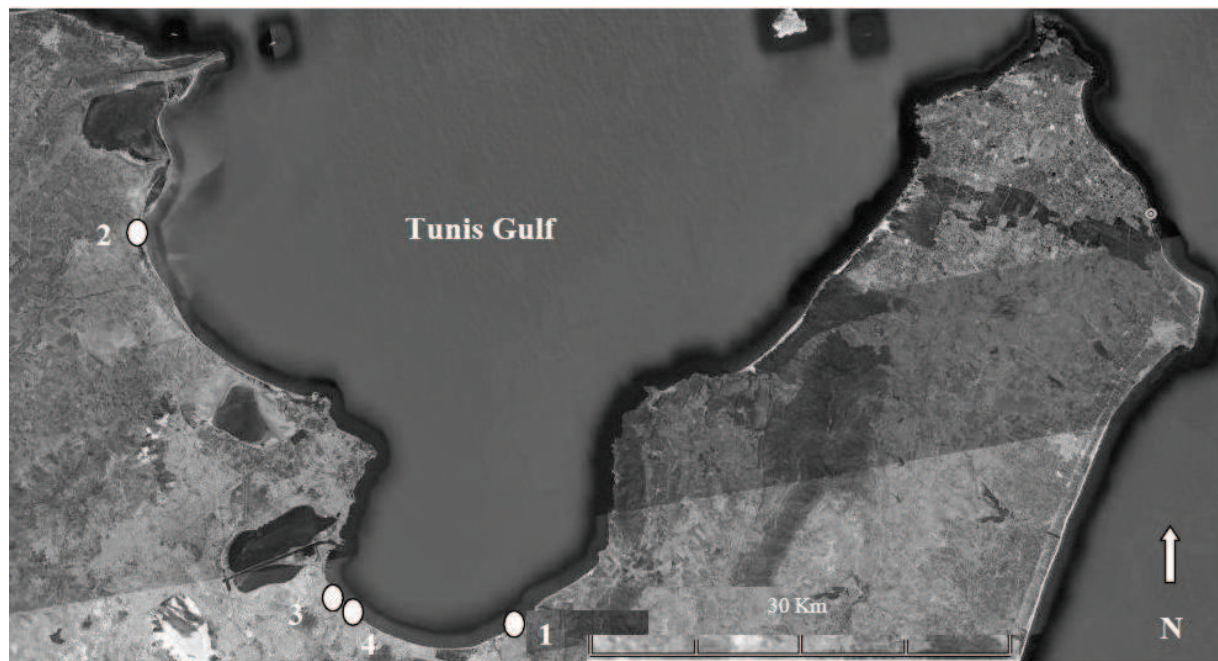


Fig. 26: Map of the studied sites in the Gulf of Tunis, Tunisia. 1: Sidi Jehmi (S.J), 2: Kalaât El Andalous (K.A), 3: Radès Plage (R.P), 4: Radès Méliane (R.M).

VI.4.2. Field sampling

Specimens of *D. trunculus* were bimonthly collected by hand in the four studied sites (S.J, K.A, R.P and R.M) from November 2008 to October 2009. After collection, bivalves were transported to the laboratory in cool boxes filled with sand and covered with approximately 2 cm of seawater from the collection site. Specimens of *D. trunculus* from the four studied sites were collected in the same range of length (S.J: 20.8 ± 2.46 mm; K.A: 20.97 ± 1.93 mm; R.P: 18.59 ± 2.28 mm; R.M: 19.54 ± 1.85 mm).

VI.4.3. Biomarker quantification

All procedures of biomarkers quantification were carried out at 0–4 °C. As an influence of weight on biomarkers in different aquatic species has been previously depicted, animals in the same tissue-weight range have been selected for the whole the sampling periods and for each site (e.g. Mouneyrac et al., 2000). For each sampling period and site, pools (n=5) of four digestive gland were homogenized in a TRIS buffer (Tris 0.1 M, NaCl 0.2 M, pH 7.2), 1 mM DTT (dithiothreitol), 0.1% protease inhibitor cocktail (containing 4-(2-aminoethyl) benzenesulphonyl fluoride, pepstatin A, E-64, bestatin, leupeptin and aprotinin, purchased from Sigma Aldrich), in a 1/4 ratio (w/v) with an ultra-turrax. An aliquot (150 µL) of the homogenate was centrifuged at 3300×g for 5 min and used for LDH quantification by the method of Vassault (1983) adapted to microplate as described in Diamantino et al. (2001). The resting part of the homogenate was then centrifuged for 30 min at 9000×g. Aliquots of the supernatant (called S9 fraction) were frozen at -80 °C until use. AChE activity was quantified spectrophotometrically at 420 nm using the method of Ellman et al. (1961) adapted to a microplate reader by Galgani and Bocquené (1991). CAT activity was measured spectrophotometrically as the decrease in absorbance at 240 nm due to dismutation of hydrogen peroxide (H₂O₂) according to Sunderman et al. (1985). TBARs levels were measured according to the method of Aebi (1983) which uses the quantification of the formation of TBARs by reference to MDA absorbance at 530 nm. GST activity was determined using the spectrophotometric method at 340 nm according to the method of Habig et al. (1974) adapted to microplate by Frasco and Guilhermino (2002). Concerning MTs, pools of digestive glands (n=5) were homogenised at 4 °C in 20 mM TRIS, 10⁻⁵ mM β-mercaptoethanol, 0.1 mM Phenylmethanesulfonyl Fluoride (PMSF), 150 mM NaCl adjusted to pH = 8.6 (4 mL/g soft tissue). The soluble (S1) and insoluble (P1) fractions were separated by centrifugation at 30 000×g for 30 min at 4 °C. An aliquot of the soluble fraction (S1) was heated at 75 °C for 15 min. Then MTLPs (i.e. heat-stable thiolic compounds) were isolated by centrifugation (15 000×g for 10 min at 4 °C) and determined by Differential Pulse Polarography (DPP) analysis (Mouneyrac et al., 2002). The standard addition method was used for calibration with rabbit liver MT (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in the absence of bivalve MT standard. Total protein concentration in the homogenate was determined by Bio-Rad Protein Assay based on the method of Bradford (1976).

VI.4.4. Integrated Biomarker Response

The Integrated Biomarker Response (IBR) which is a mathematical method (Beliaeff and Burgeot, 2002) was calculated for bivalves collected over one year during six sampling periods (November 2008, January, March, May, August and October 2009) from four sites (S.J, K.A, R.P and R.M) in the Gulf of Tunis. The IBR was calculated by summing up triangular Star Plot areas calculated for each two neighbouring biomarkers in a given data set. The procedure described below was used: For each biomarker: (1) Calculation of mean and Standard Deviation (SD) for each station. (2) Standardisation of data for each station: $x'_i = (x_i - \text{mean } x) / s$, where x'_i is the standardized value of the biomarker, x_i is the mean value of a biomarker from each station, mean x is the mean of the biomarker calculated for all the stations, and s is the standard deviation calculated for the station-specific values of each biomarker. Result: variance = 1, mean = 0. (3) Using standardized data, Z was computed as $+x'_i$ in the case of an activation and $-x'_i$ in the case of an inhibition, then the minimum value for all stations for each biomarker was obtained and added to Z . Finally the score B was computed as $B = Z + |\text{min}|$ where $B \geq 0$ and $|\text{min}|$ is the absolute value. For all the biomarkers treated this way: calculation of star plot areas by multiplication of the obtained value of each biomarker (B_i) with the value of the next biomarker, arranged as a set, dividing each calculation by 2 and summing-up of all values. The corresponding IBR value is $\{[(B1 \times B2)/2] + [(B2 \times B3)/2] + \dots + [(Bn1 \times Bn)/2] + [(Bn \times B1)/2]\}$.

The final IBR values are presented by dividing the IBR values by the number of biomarkers used (n) and are expressed as IBR/n as described in Broeg and Lehtonen (2006). Because the calculation method of IBR is based on relative differences between the biomarker responses in each given data set it is necessary to re-calculate all the index values each time when making new comparisons, e.g. adding new sites or comparing seasonal values (Broeg and Lehtonen, 2006). As suggested by Leiniö and Lehtonen (2005) and Lehtonen et al. (2006) to ameliorate the significance of the IBR, several IBRs were calculated from the same data changing the order of the biomarkers studied and using the mean \pm SD of all the index values calculated as the final index value.

VI.4.5. Health Status Index

The Health Status Index (HSI) was calculated by an expert system proposed by Dagnino et al. (2007). This expert system is an algorithm which uses biomarker values from all biological organization levels. At least three biomarkers of stress with increasing or decreasing trend and at least two biomarkers at tissue/organism level should be utilized. The HSI was based on a set of rules in the “if...then” form that accounts for the alteration level reached by the guide parameters and the calculated coefficients. In the present study, six conventional biomarkers (MTs, AChE, CAT, GST, TBARs and LDH) were applied. The mean biomarker values were introduced into the expert system and the statistical analysis of data was succeeded automatically by Mann–Whitney *U test* ($p < 0.05$), presenting the statistical significant differences among the sampling stations and the reference one. According to the HSI, five levels of health status from A to E can be distinguished by the expert system, which are characterized as follows: A: unstressed conditions, B: low stress, C: medium stress, D: high stress and E: pathological stress. The HSI could be applied even if no biomarker at the organism level is used; however, in this case the health status E was ruled out and the maximum level of stress that the expert system is able to recognize is D (Dagnino et al., 2007), as it occurred in previous reports (Dondero et al., 2006; Raftopoulou and Dimitriadis, 2010). The first version of this software was called DiSAV - Expert System. The current version used in the present study was kindly provided by Dagnino and called MusES (The Mussel Expert System).

VI.4.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using XLSTAT® v7.5.2. The normality of the distribution was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. To assess multiple comparisons, a parametric one-way analysis of variance (ANOVA) was performed on data, with a Tukey's test. To compare two groups, the student's t-test was used for a normal distribution; otherwise, the Mann and Whitney *U*-test was applied. In all cases, the level of significance was set to 0.05.

VI.5. Results

VI.5.1. Temporal fluctuations of ecological parameters

The temporal variations of ecological parameters (temperature, water salinity) from the four studied sites (S.J, K.A, R.P and R.M) are shown in Table 11. Air temperature measurements showed similar temporal pattern between sites with minimum values in January and maximum in August whereas for water salinity, lower values were recorded in the K.A and R.M sites compared to S.J and R.P.

Table 11: Temporal fluctuations of ecological parameters (salinity, temperature) in the four studied sites (S.J: Sidi Jehmi; K.A: Kalaât El Andalous, R.P: Radès Plage; R.M: Radès Méliane).

Sites / periods		Nov.	Jan.	March	May	Aug.	Oct.
S.J	Temperature (°C)	16.8	11.8	13	20.1	28	19.9
	Salinity (psu)	37.2	34.2	35.5	36.5	36.6	37.4
K.A	Temperature (°C)	17.1	12.7	14.4	21.3	28.3	19.7
	Salinity (psu)	33	30.6	31.9	32.2	33.6	33.2
R.P	Temperature (°C)	17.2	12.5	14.3	21.6	29.8	20.9
	Salinity (psu)	37.1	36	36.3	36.5	37.1	37.5
R.M	Temperature (°C)	17.2	12.5	14.3	21.6	29.8	20.9
	Salinity (psu)	34.7	30.7	31.1	33.2	34.8	34.2

VI.5.2. Integrated Biomarker Response

The mean annual values of IBR/n calculated from the four studied sites (S.J, K.A, R.P and R.M) are shown in Figure 27. The IBR/n values gradually increased in bivalves collected from S.J, then K.A, R.P and finally R.M. The S.J sampling station (comparative reference site) was reported as the less impacted site, since the IBR/n value was significantly ($p < 0.05$) the lowest (1.59 ± 0.09) whereas R.M was depicted as the most impacted site, since the IBR/n value (6.6 ± 0.23) was significantly ($p < 0.05$) the highest compared to K.A (4.72 ± 0.09) and R.P

(5.172±0.29). No significant differences of IBR/n values were observed between K.A and R.P. Temporal variations of the contribution of each biomarker in the calculation of IBR mean values are exemplified by star plots in Figure 28. The IBR values were revealed as radius coordinates and the grey area presented the integration of biomarker values for each sampling station and period. Usually, the contribution of MTs is low whereas AChE appeared as the biomarker showing the highest contribution in the calculation of IBR values compared to the other biomarkers studied (TBARs, Cat, LDH and GST) for the whole studied sites and sampling periods. The contribution of LDH was negligible compared to the other studied biomarkers in the calculation of IBR in November 2008, January 2009 and March 2009. In November 2008, GST and AChE contributions were raised in the four studied sites. In January 2009, the highest contributions of biomarkers in IBR value (9.33) in K.A were fairly represented by AChE (2.95), GST (2.34) and Cat (2.93). In March 2009, the most influenced biomarker were GST (0.25) and TBARs (0.21) in S.J, AChE (0.62), (GST (0.52) and TBARs (0.65) in K.A and AChE (2.87) and Cat (2.00) in R.P and AChE (0.77) in R.M in the calculation of IBR values (S.J: 0.82; K.A: 2.57; R.P: 8.61; R.M: 2.31). In S.J, it must be duly noted no AChE contribution in the calculation of IBR. In May 2009, the highest contributions of TBARs (0.12) and LDH (0.1) were observed in S.J., LDH (2.49), AChE (2.31) and MT (2.23) in K.A, AChE (1.49) and LDH (0.78) in R.M and AChE (1.71) and GST (0.90) in R.P. in the calculation of IBR (S.J: 0.28, K.A: 1.93, R.P: 1.69, R.M: 0.78). In August and October 2009, the contribution of AChE was the highest in the calculation of IBR values in the whole studied sites. In R.P, additional contributions of LDH and GST in IBR value were depicted compared to the other sites. Finally, in October 2009, AChE showed a significant contribution in S.J (0.89), K.A (1.42) and R.M (3.4), R.P (1.41) and also GST in R.P (1.65) and TBARs (0.65) in S.J in the calculation of IBR (S.J: 2.61; K.A: 3.81; R.M: 10.4, R.P: 4.29).

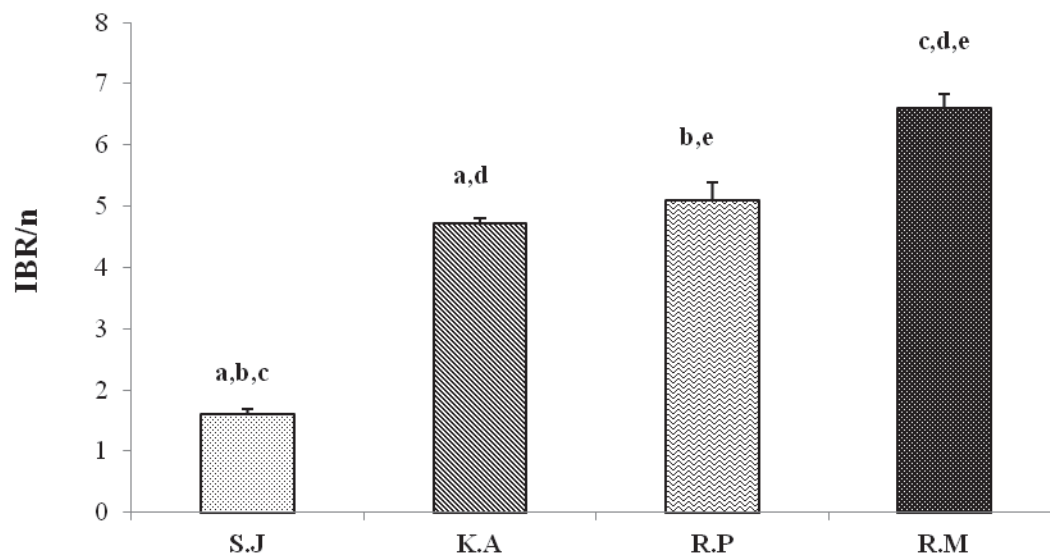


Figure 27: Annual IBR/n values calculated in *Donax trunculus* collected from four sites in the Gulf of Tunis. Mean and standard deviation calculated for IBR values obtained using all possible arrangements for biomarkers within each set. Same letters indicate a significant statistical difference between studied sites.

Chapitre VI : Application d'indices intégratifs en biosurveillance

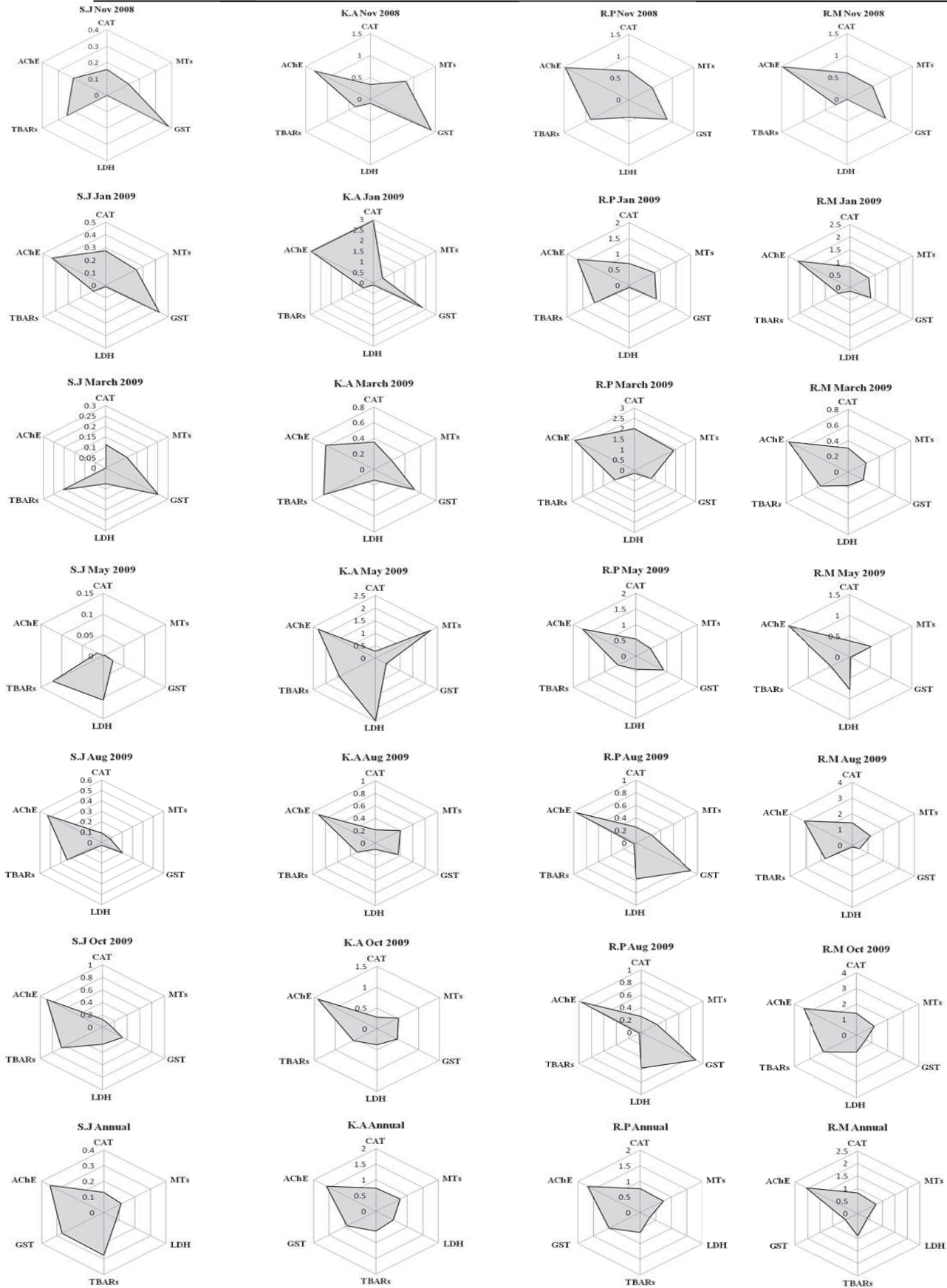


Figure 28: Star plots graphics representing the temporal variation of the integration of the set of biomarkers used in *Donax trunculus* collected from four sites in the Gulf of Tunis.

VI.5.3. Health Status Index

Results of the classification of the health status (HSI) of bivalves (*D. trunculus*) collected over one year, during six sampling periods (November 2008, January 2009, March 2009, May 2009, August 2009 and October 2009) from the four studied sites (S.J, K.A, R.P and R.M) in the Gulf of Tunis is shown in Table.12. Concerning the potential reference site (S.J), stress levels were considered as A (Healthy) for the whole sampling periods and for the other sampling sites (K.A, R.P and R.M), stress levels were classified as C (medium stresses) excepted in one occasion for R.P (October 2009) and in November 2008 and May 2009 for R.M. Annual mean of stress levels showed that the three studied sites (K.A, R.P and R.M) were classified as medium stress (C) compared to the likely “healthy” (A) reference site (S.J).

Table 12 : Stress levels of *Donax trunculus* collected from four sites in the Gulf of Tunis (S.J, K.A, R.P, R.M) from November 2008 to October 2009 according to the HSI (A : Healthy, C : medium stress).

Stress level / site	S.J	K.A	R.P	R.M
Nov. 2008	A	C	C	A
Jan. 2009	A	C	C	C
March 2009	A	C	C	C
May 2009	A	C	C	A
Aug. 2009	A	C	C	C
Oct. 2009	A	C	A	C
Annual Mean	A	C	C	C

VI.6. Discussion

In the present study, a battery of biomarkers was applied in the digestive gland of *D. trunculus* because this target organ represents a central detoxification site of the organism.

Till now, despite a large literature on biomarkers and their use in biomonitoring programmes, their incorporation in regulatory legislation for environmental risk assessment is still limited. Several reasons can explain this, among which is the influence of confounding factors (e.g. size, sex of organisms, season, temperature, salinity) that may interfere with responses of biomarkers strictly attributable to differences in chemical stress (Hagger et al., 2006; Fossi-Tankoua et al., 2011). In ecotoxicological studies, parallel sampling in reference sites sharing most ecological factors with the impacted sites of interest must be sought in zones remote from cities and from industrial concerns, in order to help in the interpretation of monitoring data (Martínez-Gómez et al., 2010). With the aim to use indices integrating individual biomarker responses, the battery of biomarkers monitored should be selected to reflect general stress and/or imply the type of pollution or damage, as recommended by Broeg and Lehtonen (2006). Thus, in the present study, six biomarkers (MTs, AChE, CAT, GST, TBARs and LDH) have been quantified bimonthly over a one year period (from November 2008 to October 2009) in *D. trunculus* originating from 4 sites differing by their level of contamination in the Tunis Gulf but presenting comparable ecological factors as shown in Table 16. IBR proposed for the first time by Beliaeff and Burgeot (2002) has been introduced as a method for exploratory analysis of data in a multibiomarker approach. According to previous field studies, IBR constitutes a possible tool for visualization of biological effects of pollutants in marine ecosystems (Beliaeff and Burgeot, 2002; Broeg and Lehtonen, 2006; Damiens et al., 2007; Pytharopoulou et al., 2008; Raftopoulou and Dimitriadis, 2010). In other hand, IBR was used with success in monitoring studies using bivalves' populations from estuaries (Serafim et al., 2011), lagoons (Cravo et al., 2011), marine areas (Damiens et al., 2007) but also in fresh water ecosystems (Guerlet et al., 2007). In the present study, for each sampling period and each site, several IBRs were calculated from the same data changing the order of the biomarkers and using the mean \pm SD of all the index values as the final index value. Results showed that the order of the biomarkers in the calculation process did not played any notable role suggesting that the number (6) of biomarkers used in this work was sufficiently large. Moreover, the weight of one factor is notably reduced when using between 6 and 8 biomarkers in the set by comparison with cases using 3-4 biomarkers (Broeg and Lehtonen, 2006). Annual mean of IBR/n values showed that S.J and R.M were the less and the most impacted sites, respectively, compared to the two others (K.A and R.P).

Initially, inhibition of AChE has been shown to reflect the exposure of organisms to some pesticides such as carbamates and organophosphorous compounds (Galgani and Bocquené,

1989). In the present study, among the set of biomarkers used, AChE appeared as the biomarker showing the most influenced weight in the calculation of IBR values. This result is not surprising since the littoral of the Gulf of Tunis has been subjected, for a few years, to intensive agricultural activities with 132 000 ha under fertilizer pressure (Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, 2003). The particularly marked inhibition in AChE activities measured in bivalves during the warm period (August) could be explained by the negative effect of temperature as already reported in other species of marine bivalves (Bocquené et al., 1997; Dellali et al., 2001). Despite temperature, AChE response is not directly related to other natural parameters such as physiological status (*e.g.* reproduction period) or age and sex (Bocquené et al., 1997). Concerning MT, its contribution in the IBR value was usually low compared to the other biomarkers studied in this work and can be explained by the fact that metal concentrations in sediment of the Tunis Gulf can be considered lower than levels found in other Mediterranean coastal areas (Ennouri et al., 2010). LDH activity showed a significant increase of its contribution in May compared to the other sampling periods. Previous investigations concerning the gametogenic cycle of *D.truculus* from the Gulf of Tunis demonstrated that May corresponded to the maximum peak of the percentage of spawning animals suggesting that bivalves experienced anaerobic metabolism (Tlili et al., 2011). Seasonal variations of the contribution of each biomarker in the set used in this work could be linked with changes in the metabolic status of bivalves depending on confounding factors such as temperature, gonad maturity and food availability (Vidal et al., 2002; Leiniö and Lehtonen, 2005) in addition to variations in chemical contaminants.

The expert system represents a simple tool for risk assessment of the toxic impact of contaminants by providing a clear indication of the degree of stress syndrome induced by pollutants. The HSI applied for the first time by Dagnino et al. (2007) in wild mussels collected from field sites in Norway has then been satisfactorily employed in field and laboratory experiments in mussels (Raftopoulou and Dimitriadis, 2010, Garmendia et al., 2011; Cravo et al., 2011). The HSI compare biomarkers results from differing groups to a fixed “control” group and allows a classification scale in five increased stress levels (A, B, C, D and E). In the Mediterranean context in particular, it is strictly no longer possible to find sites completely free of pollution; the choice of the less impacted site is by default considered as the likely “reference” site. In the present study, the control group was the S.J site as the lowest annual mean IBR value was observed compared to the other studied sites (K.A, R.P,

and R.M). Results allowed us to discriminate only two stress levels; “healthy” for the reference site (S.J) and “medium-stress” for the three others (K.A, R.P and R.M). However, since no biomarker at the organism level was used in this survey, the maximum level of stress the expert system is able to recognize is D.

If we try to compare the two studied indices (HSI and IBR), HSI could provide a simple and comprehensive representation of the pollution degree of the four studied sites. However, its use requires to determine a comparatively “reference” site. It is an easy and rapid method and users of HSI are not supposed to handle the basic algorithm method because the graphic interface of the expert system is clear and methodic. Thus, it could be a useful tool principally for decision makers, in the aim to suggest several strategies for a better management of marine coastal environments as also some specific natural habitats like bays, lagoons and estuaries. Concerning IBR, it appears as a robust tool to study the contribution of each biomarker considered in the whole set of biomarkers tested. However, its use in routine monitoring studies is more complicated because it requires delicate steps of calculations especially when the number of parameters (sites, sampling periods, biomarkers) is elevated.

VI.7. Conclusion

In conclusion, integrative biomarker indices may be used to provide a comprehensive assessment of the health status of bivalves, which is a suitable approach for monitoring pollution effects in marine ecosystems (Brooks et al., 2011; Serafim et al., 2011). However, it's important to note that these indices are in fact oversimplifications of very complex exposure situations prevailing in the field, including combined effects of pollutants and abiotic factors, and also of the multiple physiological responses in the target organisms (Broeg and Lehtonen, 2006). Thus, to avoid misinterpretations of data *in-field* monitoring studies, the application of indices based only on the biomarkers response has to be used with caution and should be interpreted along with the chemical data, ecological factors and other parameters reflecting physiological status such as reproduction (Cravo et al., 2011).

This study is the first applying two biomarkers indices (HSI, IBR) in *D. trunculus* in a biomonitoring context in the Gulf of Tunis. Previous investigations concerning other level of biological organization (individual and population) are in accordance with these present data

(Tlili et al., 2010; 2011). Results from this work could be a preliminary step for a complete chemical assessment of contaminants in the Gulf of Tunis.

Acknowledgements

This study was supported by a PhD fellowship accorded to Sofiène Tlili from the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF). The authors would to thank the Université Catholique de l'Ouest (France) and the University of Sousse (Tunisia) for providing logistical help.

VI.8. Conclusion partielle du chapitre

Les résultats obtenus concernant la comparaison de l'utilisation des deux indices testés (l'IBR et l'HSI) dans ce travail mettent en exergue les forces et les faiblesses de l'utilisation de chacun de d'eux.

L'IBR a permis de classer les 4 sites étudiés selon leur état de stress en se basant sur la sommation des « poids » de chaque biomarqueur utilisé. Pour éliminer tout élément de confusion quant à l'ordre/arrangement des biomarqueurs utilisés dans la modalité de calcul de l'IBR, toutes les possibilités ont été testées (36 combinaisons) comme préconisé par Broeg & Lehtonen (2006). La moyenne de ces combinaisons a servi par la suite au classement des sites. L'IBR a permis de classer les sites selon le degré de stress suivant : S.J>K.A>R.P>R.M.

La représentation en radar a permis de visualiser la contribution de chaque biomarqueur utilisé dans la batterie et conforté les résultats acquis lors de l'analyse du suivi saisonnier de la réponse de chaque biomarqueur (Chapitre V). Cette représentation a montré que d'une façon générale, l'AChE est le biomarqueur ayant le plus d'influence dans la batterie utilisée. Ce résultat n'est pas surprenant puisque dans l'étude du suivi temporel des activités de l'AChE chez les bivalves originaires des sites de référence (S.J) ou du site multi-contaminé (R.M), des niveaux en AChE significativement inférieurs avaient été montrés chez les organismes du site multi-contaminé (R.M) comparativement à ceux du site de S.J quelles que soient les périodes d'échantillonnage (Tlili et al., 2010).

La MT s'avère le biomarqueur ayant le moins d'influence dans la batterie utilisée. Ce résultat n'est pas surprenant puisque les travaux d'Ennouri et al (2010) ont montré que la teneur en métaux impliqués dans l'activation des MTs, dans les sédiments du golfe de Tunis est « faible » en comparaison avec d'autres sites hautement impactés en Méditerranée par exemple. La contribution de l'activité LDH dans le calcul de l'IBR est marquée par une remarquable augmentation pour le mois de mai correspondant à la période de la ponte de *D.trunculus*. Concernant les activités GSTs et Cat et le taux des TBARs, aucune contribution particulière n'a été notée.

Le HSI permet théoriquement de classer les sites selon cinq niveaux : A : site non stressé, B : stress faible, C : stress moyen, D : stress élevé, E : état pathologique. Le classement des sites selon leur état de stress n'a permis de distinguer dans ces travaux que deux niveaux

(Niveaux A et C) quelles que soient les périodes concernées. En effet, le site de référence (S.J) a été classé non stressé (A) pour toutes les périodes de l'étude. Le site K.A a été classé moyennement stressé (C) pour toutes les périodes de l'étude. Le site R.P a été classé moyennement stressé (C) pour toutes les périodes de novembre 2008 à août 2009 et classé comme site non stressé (A) en octobre 2009. Quant au site R.M, il a été classé moyennement stressé (C) pour quatre périodes (janvier, mars, août et octobre 2009) et comme étant un site non stressé (A) à deux reprises (novembre 2008 et mai 2009).

Ce type de classement peut être expliqué par le principe même du HSI qui compare tous les résultats à la référence « définie a priori ». En effet, en novembre 2008, aucune différence significative inter-site (S.J vs R.M) n'a été observée pour la Cat, les TBARs et la LDH et en mai 2009, pour la GST et les TBARs. Pour le site R.P, aucune différence inter-site (S.J vs R.P) n'a été observée pour la GST, la LDH et les TBARs. Ainsi R.P en octobre 2009 et R.M en novembre 2008 et mai 2009 ont été classés selon le même état de stress (A) que S.J.

Bien qu'elle nécessite plusieurs étapes de calculs préliminaires, l'utilisation de l'IBR, s'avère particulièrement pertinente lors des suivis temporels. En effet, cet indice permet non seulement la classification des sites selon leur état de stress (estimé par la somme des IBR/ nombre des biomarqueurs utilisés) mais aussi l'évaluation de la contribution de chaque biomarqueur dans la batterie utilisée grâce à la représentation en radar (star plots graphics). Par contre, le HSI estimé à l'aide du MusES Expert System est plus facile à manipuler que l'IBR puisque l'utilisateur n'a à effectuer ni calculs préliminaires ni changements de formules algorithmiques. L'un des avantages de cet indice (HSI) est sa flexibilité. En effet, il est possible d'insérer au fur et à mesure de nouveaux biomarqueurs à la liste proposée initialement par ses développeurs à condition d'indiquer leur propriété et le type de réponse généralement attendue (induction, inhibition ou réponse en cloche). Le classement des sites selon leur état de stress n'est pertinent uniquement lorsque le choix du groupe de référence est incontestable compte tenu du fait que tous les résultats sont comparés à cette référence.

CHAPITRE VII : Combinaison des paramètres de la reproduction (réserves énergétiques, cycle gamétogénique) et des relations allométriques comme nouvel outil de diagnostic environnemental.

CHAPITRE VII : Combinaison des paramètres de la reproduction (réserves énergétiques, cycle gamétogénique) et des relations allométriques comme nouvel outil de diagnostic environnemental.

VII.1. Présentation du chapitre

Le cycle de reproduction des mollusques bivalves est régulé par l'action de plusieurs facteurs environnementaux naturels (e.g. température, disponibilité alimentaire) et d'un ensemble de facteurs endogènes (e.g. balance des hormones stéroïdiennes, métabolisme) (Purchon, 1977; Mathieu, 1994; Mouneyrac et al., 2008). Cependant l'exposition aux polluants chimiques peut également interférer en induisant des modifications des paramètres de la reproduction (e.g. avancement ou retard de la ponte) comme cela a été montré chez *Mya arenaria* (Gauthier-Clerc et al., 2002; Siah et al., 2003) et *Dreissena polymorpha* (Binelli et al., 2001). À notre connaissance, le cycle gamétogénique du mollusque bivalve suspensivore *D. trunculus* n'a pas encore été utilisé comme outil de diagnostic environnemental dans les études de biosurveillance.

L'objectif de cette étude est d'examiner les éventuelles perturbations des paramètres de la reproduction (sex-ratio, cycle gamétogénique, cycle des réserves énergétiques) et des indices biologiques (indice de condition, relations allométriques : longueur-poids total, longueur-poids sec, longueur-poids frais, longueur-poids des coquilles) chez *D. trunculus* originaire de deux sites différant par leur degré de contamination. Pour ce faire, des spécimens ont été collectés bimensuellement de novembre 2008 à octobre 2009 dans le site multi-contaminé R.M et dans le site de référence S.J. L'examen histologique des gonades (Figure 29) a permis d'identifier cinq stades de développement gamétogénique : indifférencié, en développement, en maturité, ponte et après ponte.

Les caractéristiques morphologiques et cytologiques de distinction entre les stades sont :

- *Stade « 0 » : repos gamétique*: Les acini sont de taille très réduite. On observe un tissu gonadique constitué majoritairement d'un tissu conjonctif. Il est impossible d'identifier le sexe des bivalves à ce stade.
- *Stade « I » : gamétogenèse* : A ce stade les gonies se multiplient d'où l'augmentation du volume des acini aux dépens du tissu conjonctif. Le sexe des bivalves peut alors

être identifié. Chez les femelles, on peut observer des ovogonies sur la paroi et quelques ovocytes en vitellogenèse. On observe une apparition de follicules dispersés dans le tissu conjonctif et présentant des ovocytes en maturation et collés à la paroi. Le diamètre ovocytaire moyen à ce stade est d'environ 79 μ m. Chez le mâle, on arrive à identifier les spermatogonies dont le nombre augmente contre la paroi des acini.

- *Stade « II » : maturation* : Chez les femelles, on observe sur la paroi des acini, des ovocytes pédonculés en cours de détachement et des ovocytes matures qui acquièrent une forme polygonale du fait de leur entassement à la lumière des tubules gonadiques. Le diamètre ovocytaire à ce stade est de l'ordre de 120 μ m. Le tissu conjonctif est rétréci en faveur des follicules en développement qui présentent en leur lumière des ovocytes matures. Chez les mâles, les acini, étouffés, ont une apparence homogène.
- *Stade « III » : émission gamétique* : A ce stade, les acini sont partiellement ou totalement vidés de leur contenu. Parfois, il y a présence d'ovocytes ou de spermatozoïdes résiduels non émis à la fin du cycle. Chez les femelles, les ovocytes résiduels mesurés ont un diamètre de 122 μ m. Les acini ont un aspect déchiré et seront résorbés par l'organisme. Le tissu gonadique sera envahi à nouveau par le tissu conjonctif.

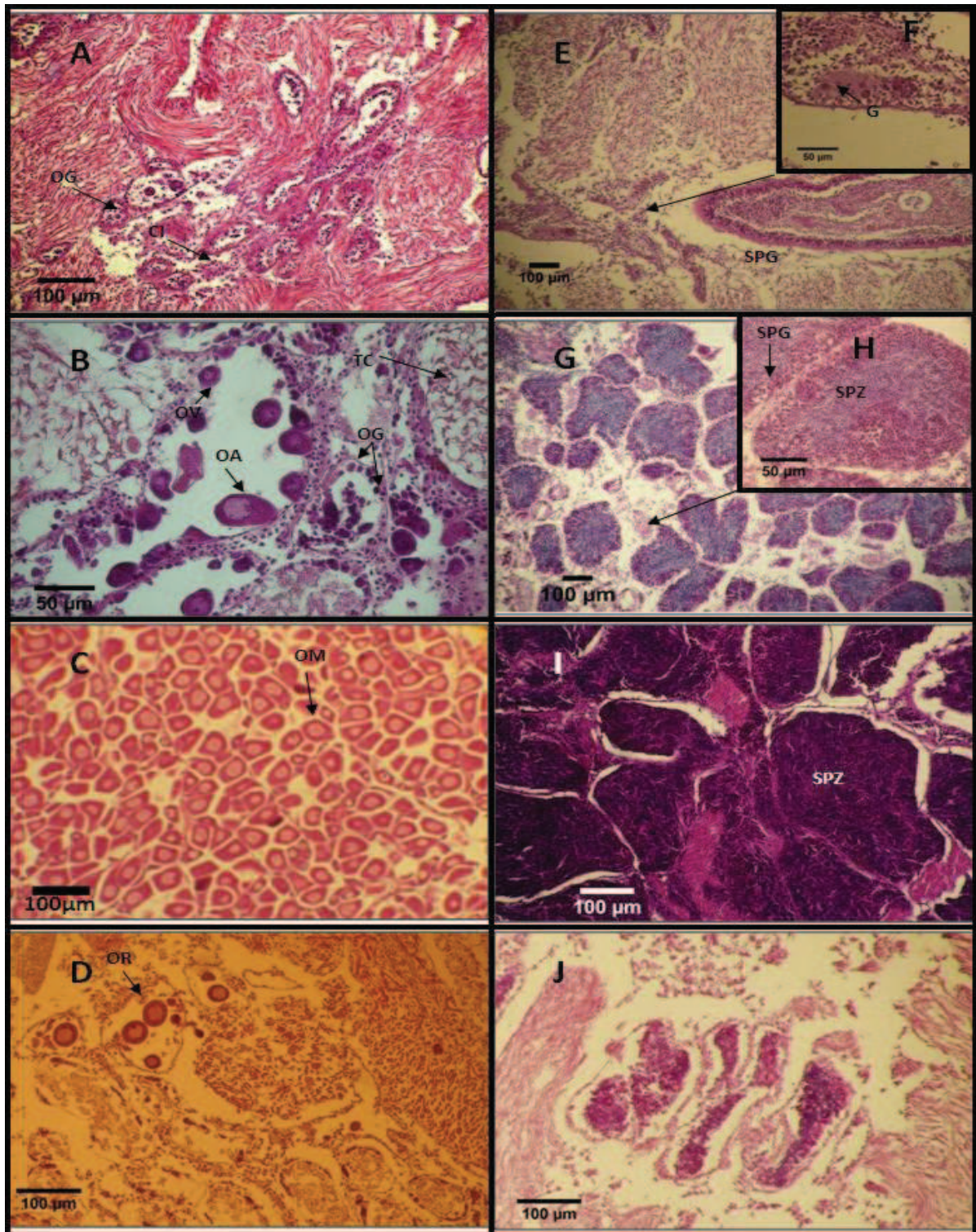


Figure 29: Coupe de la gonade féminine et masculine de *Donax trunculus*, à différents stades de la gamétogenèse, et colorée à l'hématoxyline-éosine : (A) : Individu femelle, début de gamétogenèse. Apparition d'acini de taille réduite à l'intérieur desquels on distingue des ovogonies. CI : cellules indifférenciées ; OG : ovogonies. (B) : Stade de

gamétogenèse de gonade femelle. OA : ovocyte adhérent ; OG : ovogonies ; OV : ovocyte vitellogénique ; TC : tissu conjonctif (C): Stade de maturation de gonade femelle. Les ovocytes acquièrent une forme polygonale. Le tissu conjonctif est rétréci en faveur des follicules en développement. (D) : Stade d'émission gamétique de gonade femelle. OR : ovocyte résiduel. (E) et (F): individu immature. Des acini de taille réduite renfermant des gonies. G : gonies. A ce stade, le sexe de l'animal est indéfinissable. (G) et (H) : Stade de gamétogenèse de gonade mâle. SPG : spermatogonies ; SPZ : spermatozoïdes. (I) : Stade de maturation de gonade mâle: gonade mâle mature avec des follicules étouffés et quasi absence de tissu conjonctif. (G) : Stade d'émission gamétique de gonade mâle. Images prises à l'aide du logiciel de capture d'images « ImageJ 1.45 » (A, B, C, D, E, I et J : échelle de 100µm ; Fet H : échelle de 50 µm).

L'étude des relations entre la gamétogenèse et le métabolisme énergétique s'avère d'un grand intérêt puisque l'investissement des réserves énergétiques dans le processus de la reproduction réduit l'allocation énergétique envers les fonctions somatiques. En effet, le cycle de vie d'une espèce est considéré comme un modèle d'équilibre entre l'investissement énergétique dans la reproduction et les autres fonctions biologiques (e.g. nutrition, locomotion, croissance...) (Barnes et al., 1988).

Le suivi du cycle des réserves énergétiques (glycogène et lipides) permet d'une part l'étude de leurs fluctuations naturelles en relation avec le cycle reproductif et d'autre part la mise en évidence d'éventuelles modifications de l'allocation énergétique vis-à-vis notamment des mécanismes de la tolérance au stress chimique.

Le sex ratio est un paramètre qui permet l'étude de la répartition de la proportion des sexes dans une population. Sous l'effet du stress chimique et en particulier l'exposition à des substances à caractère P.E, ce marqueur de haute pertinence écologique peut être modifié (Durou et al., 2008 ; Mouneyrac & Amiard-Triquet, *in press*). Généralement, dans les côtes méditerranéennes et atlantiques, le sex ratio de *D.trunculus* est équilibré (proportion mâle : femelle= 1 :1) (Badino & Marchionni, 1972; Mouëza & Frenkiel-Renault, 1973).

En ce qui concerne l'allométrie, cette dernière correspond, par définition, à l'étude des effets de la taille et de la structure morphologique sur le développement des organismes vivants (Reiss, 1989). L'étude des relations allométriques (relations longueur-poids) permet en général de définir les critères morphologiques et biométriques d'une espèce. Les relations allométriques peuvent servir à l'étude des modalités de croissance, de la spéciation génétique ou encore de l'exploitation agricole et halieutique. Les relations allométriques peuvent également donner des informations précieuses sur l'adaptation physiologique et

morphologique des organismes exposés d'une manière chronique à un stress environnemental. Il s'avère donc intéressant de vérifier si les modifications perçues à échelle sub-individuelle et populationnelle peuvent affecter le critère biométrique d'une espèce. Dans le but de sélectionner les paramètres allométriques les plus pertinents, une série de différentes relations biométriques a été étudiée. Ces relations sont: *i*) longueur totale/largeur; *ii*) longueur totale/hauteur; *iii*) largeur/hauteur; *iiii*) poids sec/poids frais. Pour les indices biologiques, les paramètres sont : *i*) les indices de condition frais (AFNOR, 1985); *ii*) l'indice de condition sec (Crosby & Gale, 1990); *iii*) le pourcentage en eau tissulaire (Ansell, 1980).

La discussion des résultats obtenus dans ce chapitre portera sur l'influence du site d'origine des bivalves (*D. trunculus*) sur l'allocation différentielle des réserves énergétiques (glycogène, lipides) dans les processus de la reproduction (cycle gamétogénique, sex ratio, indice de maturité sexuelle) et de la croissance des bivalves (relations allométriques).

Publication 3: Is the reproduction of *Donax trunculus* affected by their sites of origin contrasted by their level of contamination?

S.Tlili, I. Métais, H. Boussetta & C. Mouneyrac. Chemosphere (2011) 84, Issue 10: 1362-1370.



Is the reproduction of *Donax trunculus* affected by their sites of origin contrasted by their level of contamination?

Sofiène Tlili^{a,b,d}, Isabelle Métais^{a,b}, Nadia Ayache^c, Hamadi Boussetta^d, Catherine Mouneyrac^{a,b,*}

^a Université de Nantes, MMS, EA2160, Faculté de Pharmacie, 1 rue G. Veil, BP 53508, 44035 Nantes Cedex 1, France

^b Université Catholique de l'Ouest, Institut de Biologie et Ecologie Appliquée, CERE, 44 rue Rabelais, 49008 Angers Cedex 1, France

^c Université de Carthage, Institut National Agronomique de Tunis, UR, Ecosystèmes & Ressources Aquatiques, 1082 Tunis, Tunisia

^d Université de Sousse, Institut Supérieur Agronomique de Chott-Mariem, Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie de l'Environnement, 4042 Sousse, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2011

Received in revised form 5 May 2011

Accepted 7 May 2011

Available online 31 May 2011

Keywords:

Donax trunculus
Gametogenic cycle
Energy reserves
Sex-ratio
Allometry

ABSTRACT

The reproductive cycle of bivalves is regulated by several natural environmental factors but exposure to chemical pollutants can also interfere and may result in advanced or delayed spawning season. To our knowledge, the gametogenic cycle of the suspension-feeder bivalve *Donax trunculus* has not yet been used as biomonitoring tool in ecotoxicological surveys. The aim of this study was to examine over a year physiological reproductive endpoints (sex-ratio, gametogenic and energy reserve cycles) and biological indices (condition index, allometry) in *D. trunculus* originating from two sites differing by their level of contamination. Specimens were collected bimonthly from November 2008 to October 2009 from a polluted site (Radès Méliane) and a comparatively reference site (Sidi Jehmi) in the Gulf of Tunis (Tunisia). Five stages were depicted by histological examination of gonads: undifferentiated, developing, mature, spawn and spent. Differences in the gametogenic cycle according to the site of origin of bivalves were observed. The spawning period began in March and was maximum in May in bivalves from both sites, but the percentage of spawning animals was higher in the polluted site vs the reference site. The spawning period was shorter in animals from the polluted site comparatively to the reference site. Energy reserves (glycogen, lipids) were higher in March and May comparatively to the other studied periods in bivalves from both sites. Lower energy reserves levels were usually observed in animals from the polluted site compared to the reference site. Seasonal variations of the condition index were associated to the reproductive and nutritive status of bivalves. Differences in allometry were depicted between bivalves from both studied sites. If we try to link allometry, energy reserves and reproduction, it can be hypothesized that for bivalves from the reference site, energy reserves are allocated to gametogenesis and length growth. For bivalves from the polluted site, energy reserves could be devoted to tolerance to chemical stress and to reproductive processes. Therefore, *D. trunculus* appears as a suitable sentinel species for the assessment of the ecotoxicological risk of contaminants such as endocrine disruptors.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Coastal and estuarine zones are at risk due to increasing stress from anthropogenic activities such as urbanization, intensive agriculture, and mass tourism. Thereby, complex mixtures of contaminants present in these zones are often the main factors responsible for water quality degradation. In this context, there is a growing interest in the influence of endocrine disruptor compounds (EDCs) on biota physiology (for reviews, see Langston et al., 2005; Mathiesen and Johnson, 2007; Ketata et al., 2008). A lot of natural and

or anthropogenic compounds can exert endocrine disruptions (Lintemann et al., 2003). Field observations of abnormalities in the reproductive function of organisms and populations declines in polluted sites have been reported. The imposex called first by Smith (1971) to design the superimposition of male genitalia in female gastropods (*Nucella lapidus*) exposed to tributyltin (Gibbs and Bryan, 1986) remains the best characterized example of endocrine disruption in wildlife. Indeed imposex in affected females leads to sterility and thus to the ecologically significant decrease in population (Gubbins et al., 2010).

In Mediterranean coastal regions, several hotspots of pollution (Barcelona, Marseille, Naples, etc.) have been identified (Baumard et al., 1998; Eljarrat et al., 2001). These hotspots mainly correspond to industrial and/or urban locations highly populated (Gómez-Gutiérrez et al., 2007). The Gulf of Tunis is located in North-East of

* Corresponding author. Address: MMS, EA2160, Faculté de Pharmacie, 1 rue G. Veil, BP53508, 44035 Nantes Cedex 1, France. Tel.: +33 02 41 81 66 45; fax: +33 02 41 81 66 74.

E-mail address: catherine.mouneyrac@uco.fr (C. Mouneyrac).

VII.2. Abstract

The reproductive cycle of bivalves is regulated by several natural environmental factors but exposure to chemical pollutants can also interfere and may result in advanced or delayed spawning season. To our knowledge, the gametogenic cycle of the suspension-feeder bivalve *Donax trunculus* has not yet been used as biomonitoring tool in ecotoxicological surveys. The aim of this study was to examine over a year physiological reproductive endpoints (sex-ratio, gametogenic and energy reserve cycles) and biological indices (condition index, allometry) in *D. trunculus* originating from two sites differing by their level of contamination. Specimens were collected bimonthly from November 2008 to October 2009 from a polluted site (Radès Méliane) and a comparatively reference site (Sidi Jehmi) in the Gulf of Tunis (Tunisia). Five stages were depicted by histological examination of gonads: undifferentiated, developing, mature, spawn and spent. Differences in the gametogenic cycle according to the site of origin of bivalves were observed. The spawning period began in March and was maximum in May in bivalves from both sites, but the percentage of spawning animals was higher in the polluted site vs the reference site. The spawning period was shorter in animals from the polluted site comparatively to the reference site. Energy reserves (glycogen, lipids) were higher in March and May comparatively to the other studied periods in bivalves from both sites. Lower energy reserves levels were usually observed in animals from the polluted site compared to the reference site. Seasonal variations of the condition index were associated to the reproductive and nutritive status of bivalves. Differences in allometry were depicted between bivalves from both studied sites. If we try to link allometry, energy reserves and reproduction, it can be hypothesized that for bivalves from the reference site, energy reserves are allocated to gametogenesis and length growth. For bivalves from the polluted site, energy reserves could be devoted to tolerance to chemical stress and to reproductive processes. Therefore, *D. trunculus* appears as a suitable sentinel species for the assessment of the ecotoxicological risk of contaminants such as endocrine disruptors.

Key-words: *Donax trunculus*, gametogenic cycle, energy reserves, sex-ratio, allometry.

VII.3. Introduction

Coastal and estuarine zones are extremely fragile due to increasing stress from anthropogenic activities such as urbanization, intensive agriculture, and mass tourism. Thereby, complex mixtures of contaminants present in these zones are often the main factors responsible for water quality degradation. In this context, there is a growing interest in the influence of endocrine disruptor compounds (EDCs) on biota physiology (for reviews, see Langston et al., 2005; Mathiessen and Johnson, 2007; Ketata et al., 2008). A lot of natural and/or anthropogenic compounds can exert endocrine disruptions (Lintelmann et al., 2003). Field observations of abnormalities in the reproductive function of organisms and populations declines in polluted sites have been reported. The imposex called first by Smith (1971) to design the superimposition of male genitalia in female gastropods (*Nucella lapidus*) exposed to tributyltin (Gibbs and Bryan, 1986) remains the best characterized example of endocrine disruption in wildlife. Indeed imposex in affected females leads to sterility and thus to the ecologically significant decrease in population (Gubbins et al., 2010).

In Mediterranean coastal regions, several hotspots of pollution (Barcelona, Marseille, Naples, etc.) have been identified (Baumard et al., 1998; Eljarrat et al., 2001). These hotspots mainly correspond to industrial and/or urban locations highly populated (Gomez-Gutierrez et al., 2007). The Gulf of Tunis is located in North-East of Tunisia with an area of 1500 km² and 160 km of coasts. For a few years, the littoral of Tunis Gulf has been subjected to agricultural activities (132 000 ha under fertilizer pressure), industrial, urban and tourist development and consequently submitted to the impact of many chemical and physical stressors (Raïs, 1999; Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, 2003; Zaïri et al., 2004; Afli et al., 2008). Contamination by polychlorinated biphenyl residues (PCBs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Tunis bay has been recently reported (Masmoudi et al., 2007; Mzoughi et al., 2010).

Since mollusk bivalves are good bioindicators of environmental quality, we used the suspension-feeder bivalve *Donax trunculus* living in the sediment and largely distributed in West-African, European and Mediterranean coasts. This bivalve has been previously used as a sentinel species in environmental assessment (Roméo and Gnassia-Barelli, 1988; Fishelson et al., 1999; Moukrim et al., 2004; Neuberger-Cywiak et al., 2007, Tlili et al., 2010).

The reproductive cycle of bivalves is regulated by several natural environmental factors (e.g; temperature, food availability) but exposure to chemical pollutants can also interfere. Energy reserves such as glycogen and lipids are of considerable importance in reproduction and

seasonal energy storage and utilization in marine bivalves molluscs are closely linked to environmental conditions and the annual gametogenic cycle. Exposure to chemical pollutants may also impacts energy balance of animals such as bivalves as a result of increased maintenance cost (activation of defense and/or repair mechanisms) which might lead to further reduction in energy available for reproduction (De Cohen and Janssen, 2003; Smolders et al., 2004; Voets et al., 2006 and literature cited therein). Using energy as a common ecological currency, chemically mediated effects at a cellular level will reduce the energy availability for growth and maintenance for homeostasis, and thus ultimately result in undesirable impairment of the reproductive and developmental processes (Kooijman and Bedaux, 1996). Thus, responses related to energy allocation or reproduction have to be considered, both affecting survivorship of individuals and sustainability of populations (Depledge and Fossi, 1994). Biological indices such as condition index (CI) are also of great interest because of complementary information they can give regarding the health status of organisms (Duquesne et al., 2004; Marchand et al., 2004; Mouneyrac et al., 2008). Moreover, in allometric length-weight relationship, the variation in equilibrium constants represents the growth in weight than that of length and provides information on the physiological deviation in condition of bivalve (Ramesha and Thippeswamy, 2009).

To our knowledge, until yet, the reproduction (gametogenic cycle, energy reserves) and the biological indices (CI, allometry) of *D. trunculus* have not been used as biomonitoring tools in ecotoxicological surveys.

The aim of this study was to compare over a year biological indices (CI, allometry) and physiological reproductive endpoints (sex-ratio, gametogenic and energy reserve cycles) in *D. trunculus* originating from two sites differing by their level of contamination in the Gulf of Tunis: the polluted Radès Méliane (R.M) site and the comparatively reference Sidi Jehmi (S.J) site. The potential effects of environmental stressors on the course of these cycles were discussed.

VII.4. Material and methods

VII.4.1. Studied sites

Two sites in the Gulf of Tunis contrasted by their level of contamination were selected for this study. The sandy beach of S.J (36°43, 36N; 10°27, 33E) was chosen as a likely “reference” site because of its very low level of urbanization and industry whereas the R.M (36°45, 49N;

10°17, 59E) station is located in a polluted area. Indeed, the coastal zone close to this area is the catchment basin of the most significant source of continental water constituted by the effluents of the Mejerda wadi and the Méliane Wadi. The Mejerda wadi is the most important wadi of Tunisia with a catchment of about 2500 km² and a length of 430 km. The medium liquid flow is 915 mm³ and the medium sediment flow is 10 g L⁻¹, making a total of 17 million tons as an annual solid contribution in the Gulf of Tunis. The Méliane wadi has a length of 160 km and drains a watershed of 228 km². The medium liquid flow is about 50 mm³ y⁻¹ with a solid load of around 20 400 tons per year. Méliane wadi's waters are highly polluted by discharges of 50% of non treated wastewater particularly in its downstream part (Ben Charrada and Moussa, 1997; Added et al., 2003). Effluents from Méliane Wadi and from the wastewater treatment plant of "Méliane Sud", were directly and permanently discharged into the bay of Tunis as well as some uncontrolled industrial wastes from the industrial zone of Tunis and Radès (Electric power station, chemical and metallurgic industries, harbors, food and paper factories).

VII.4.2. Field Sampling

Specimens of *D. trunculus* were bimonthly collected by hand in both sites (S.J and R.M) from November 2008 to October 2009. After collection, bivalves were transported to the laboratory in cool boxes filled with sand and covered with approximately 2 cm of seawater from the collection site. For each collection period, two types of sampling have been carried out according to the different objectives of the study. To study temporal and intersite variations of energy reserves (glycogen and lipids), bivalves from both sites were collected in the same range of length (S.J: 20.8 ± 2.46 mm; R.M: 19.54 ± 1.85 mm). *D. trunculus* devoted to the determination of biological parameters (CI, allometry) and to the study of reproduction (gametogenic cycle, sex ratio) were collected from both sites (S.J; R.M) in a large range of length starting from 15 mm (length size at which the sex was microscopically identifiable) as described by Manca-Zeichen et al (2002). Because the gonad of *D. trunculus* is diffuse and occupies the whole visceral mass, it was impossible to separate the gonad from the digestive gland (Ramon et al., 1999). Thus, we consider the whole gonad-digestive gland as the same unity for reproduction study and energy reserves quantification. In the laboratory, the length and the total weight of bivalves were recorded before dissection. After removal of the shells, the whole gonad-digestive gland was quickly dissected, fixed in bouin solution for histological analysis or frozen on dry ice and kept at - 80 °C until biochemical analysis.

VII.4.3. Energy reserves quantification

As an influence of weight on energy reserves in different aquatic species has been previously depicted, we have all over the sampling period and for both sites (S.J and R.M); selected bivalves in the same tissue-weight range (Ait Alla et al., 2006). For each sampling period and each site, pools (n =5) of four gonad-digestive gland were homogenized by hand in liquid nitrogen with a porcelain mortar and pestle. The obtained powder was then homogenized with a motorised grinder with 1.5 mL citrate buffer at pH 5.0 for glycogen and lipid analysis. Total lipids were determined by a sulpho-phosphovanillin reaction according to the method of Frings et al. (1972). Glycogen concentrations were estimated in two aliquots of the homogenate, one of which was submitted to enzymatic digestion by amyloglucosidase according to Carr and Neff (1984). Olive oil and glycogen from oyster (Sigma, Type III) were used as standards for each method, respectively.

VII.4.4. Gametogenic cycle and sex ratio

Reproduction was investigated by histological examination of gonads in *D. trunculus* bimonthly collected from November 2008 to October 2009. For each sampling date 30 bivalves were collected from both sites (S.J and R.M). Gonads were fixed in Bouin solution and following dehydration through increasing alcohol concentrations (70%, 80%, 90% and 95%), tissues were embedded in paraffin. Serial sections were sectioned at 5 μ m, and stained in Harris' haematoxylin and counterstained in eosin (Humanson, 1979). The prepared microscope slides were examined under a light microscope to determine the stage of gametogenesis. Five reproductive stages (indifferent, development, mature, spawning, spent) have been characterized using morphological criteria adapted from Mouneyrac et al. (2008) in *Scrobicularia plana*, Delgado and Pérez-Camacho (2005) in *Ruditapes decussatus*, and Gaspar and Monteiro (1998) in *Donax trunculus*. Each stage was categorized by a maturity factor (0, spent; 1, undifferentiated; 2, developing; 3, mature; 4, spawning) then, a sexual maturity index (SMI) was calculated according to the equation established by Siah et al. (2003): $SMI = \sum (\% \text{ of each sexual state} \times \text{maturity factor})$.

VII.4.5. Allometry and Biological index

Bivalves from both sites (S.J; R.M) were individually measured for shell length (maximum antero-posterior distance), accurately to 0.01 mm using a digital calliper. Total weight was recorded and then tissues were removed and weighed individually after blotting. The weight

of each shell was determined. The tissue was dried at a constant temperature of 60°C for 48 hours and weighed accurately to 0.001 g. Allometry was examined for length-weight (length-total weight, length-wet tissue weight, length-dry tissue weight and length-shell weight) relationships. Dry condition index was estimated according to Beninger (1984) using the following formulae: $CI = ([\text{Dry weight} - \text{Shell weight}] * 100)$.

VII.4.6. Statistical analysis

The results of energy reserves quantified in the whole gonad-digestive gland of *D. trunculus* from both sites and collected bimonthly from November 2008 to October 2009 are presented as means \pm SD. Statistical analysis were performed using SPSS[®] v12.0 and XLSTAT[®] v7.5. The normality of the distribution was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. To assess multiple comparisons, a parametric one-way analysis of variance (ANOVA) was performed on data, with a Tukey’s test. To compare two groups, the student’s t-test was used for a normal distribution; otherwise, the Mann and Whitney U-test was applied. Length and weight (total weight, wet weight, dry weight and shell weight) variables were transformed using logarithm transformation (Log). In order to assess the influence of bivalves sampling sites on relationships between length shell and weight, analyses of covariance (ANCOVA) were carried out.

VII.5. Results

VII.5.1. Gametogenic cycle

VII.5.1.1. Temporal variation

Fig. 30 illustrates the distribution between each of the categories of gonad development stages and the seasonal SMI cycle of *D. trunculus* from the reference S.J. site (Fig. 30A) and the polluted R.M. site (Fig. 30B). Concerning bivalves from the reference site (S.J.), in November 2008, 50% of specimens were in undifferentiated stage and 50% in developing stage. In January 2009, 86 % of specimens were in developing stage and 14% in undifferentiated stage. Mature specimens were observed in March (86%) and May (28.6%).

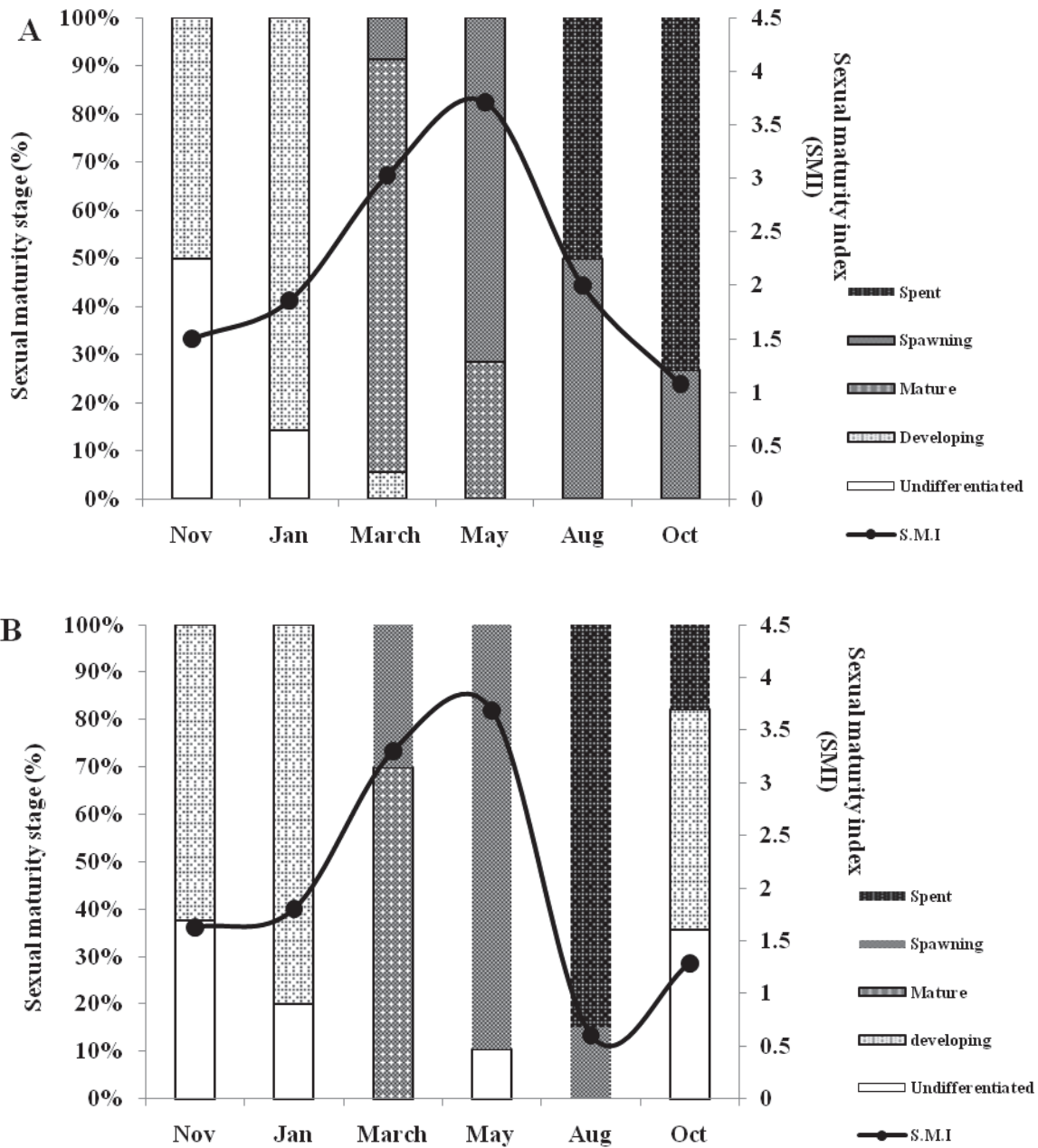


Fig. 30: Sexual maturation with partitioning expressed in percent between each observed development stages of gonads and sexual maturity index (SMI) from *D. trunculus* collected in Sidi Jehmi (A) and Radès Méliane (B) from November 2008 to October 2009. $SMI = \sum (\% \text{ of each sexual state} \times \text{maturity factor})$. Each stage was categorized by a maturity factor (0, spent; 1, undifferentiated; 2, developing; 3, mature; 4, spawning).

Spawning began in March with 9% of specimens in spawning stage and a maximum in May (71%), then a decrease in spawning was observed in August (50%) and ended in October 2009 (27%). Bivalves in spent stage were depicted in August (50%) and October (73%). The SMI value (Fig. 30A) increased gradually from November 2008 (1.5) to reach a maximum in May (3.71), then decreased to reach minimum value in October 2009 (1.07). With regard to bivalves from the polluted site (R.M.), in November 2008, 37.5% and 62.5% of specimens were, respectively, in undifferentiated and developing stages. In January 2009, 80% of specimens were in developing stage and 20% in undifferentiated stage. Mature specimens (70%) were depicted only in March. Spawning was observed from March with 30% of bivalves in spawning stage until August with 15% in this stage. May corresponded to the maximum spawning period with 90% of bivalves in spawning stage and only 10% still in undifferentiated stage. Spent animals were observed only in August (85%) and October 2009 (18%). The gametogenic cycle is initiated in October with 36% of bivalves in undifferentiated stage and 46% in developing stage. An increase of SMI (Fig. 30B) value was observed from November 2008 (1.6) to reach a maximum in May (3.68), then decreased to reach minimum value in August 2009 (0.6) followed by an increase in October 2009 (1.28).

VII.5.1.2. Inter site variations

In March 2009, the percentage of mature bivalves was higher in the reference S.J site (86%, Fig. 30A) *vs* the polluted R.M site (70%, Fig. 30B). In this latter (R.M), 30% of organisms were spawning in March whereas only 8.5% were observed in this stage in the reference site (S.J). May corresponded to the period where the highest percentage of spawning bivalves were depicted whatever their site of origin, but this percentage was higher in the polluted site (90%) comparatively to the reference site (71%). In August, bivalves from the polluted site (R.M) were mainly in spent stage (85% *vs* 15% in spawning) whereas in the reference site (S.J), the percentage of animals was equilibrated between spawning (50%) and spent (50%). In October, no spawning individuals were identified in the polluted site but 46% were in developing whereas in the reference site 27% of bivalves were still spawning but no specimens were depicted in developing stage.

VII.5.2. Sex ratio

Percentages of males and females at each period from both sites are illustrated in Table 13. The sex-ratio was equilibrated in bivalves from both sites excepted in March 2009 in the polluted site (R.M) where the percentage of females (66.7%) was significantly higher than males (33.3%).

Table 13. Percentages of male and female *Donax trunculus* collected bimonthly from November 2008 to October 2009 from two sites in the Gulf of Tunis: Sidi Jehmi and Radès Méliane.

	Sidi Jehmi (S.J)			Radès Méliane (R.M)		
	Males %	Females %	Total (n)	Males %	Females %	Total (n)
November 2008	41.7	58.4	12	50.0	50.0	16
January 2009	50.0	50.0	14	46.7	53.3	15
March 2009	45.7	54.3	35	33.3	66.7	30
May 2009	47.6	52.4	42	47.4	52.6	28
August 2009	55.0	45.0	40	55.0	45.0	20
October 2009	53.9	46.1	26	42.9	57.1	28
Annual Mean	49.0	51.0	169	45.9	54.1	137

VII.5.3. Energy reserves cycle

VII.5.3.1. Temporal variation

Temporal variations of energy reserves (glycogen and lipids) quantified in the whole gonad-digestive gland of bivalves (*D. trunculus*) from both sites (S.J and R.M) are shown in Fig. 31. Concerning bivalves from the reference (S.J) site, glycogen concentrations (Fig. 31A) increased gradually from November 2008, corresponding to the minimum mean value ($2.6 \pm 0.3 \text{ mg.g}^{-1} \text{ w.w}$), to reach a significant maximum peak in March 2009 ($30.0 \pm 7.8 \text{ mg.g}^{-1} \text{ w.w}$). Then, a decrease in glycogen concentrations was observed. For bivalves from the polluted site (R.M), the same pattern was usually observed with a minimum mean value in January 2009 ($3.0 \pm 1.2 \text{ mg.g}^{-1} \text{ w.w}$) and a significant maximum mean value in March 2009 ($14.6 \pm 4.9 \text{ mg.g}^{-1} \text{ w.w}$). Lipid concentrations (Fig. 31B) increased steadily from November 2008 to January 2009 to reach a significant maximum peak in March 2009 in both sites (S.J: $14.1 \pm 0.9 \text{ mg.g}^{-1} \text{ w.w}$, R.M: $10.3 \pm 1.8 \text{ mg.g}^{-1} \text{ w.w}$). Then, a significant decrease in lipid concentrations was observed in August 2009 in both sites (S.J: $6.6 \pm 0.6 \text{ mg.g}^{-1} \text{ w.w}$, R.M: $6.2 \pm 1.1 \text{ mg.g}^{-1} \text{ w.w}$) followed by a significant increase in October 2009 (S.J: $9.0 \pm 1.8 \text{ mg.g}^{-1} \text{ w.w}$, R.M: $8.4 \pm 0.6 \text{ mg.g}^{-1} \text{ w.w}$).

VII.5.3.2. Inter site variations

Glycogen (Fig. 31A) and lipid (Fig. 31B) concentrations were significantly lower in bivalves from the polluted R.M site compared to the reference S.J site in January ($p < 0.0049$), March ($p < 0.049$), May ($p < 0.034$) 2009 for glycogen and in March ($p < 0.049$) and May ($p < 0.049$) for lipids. In contrast, in November 2008 glycogen ($p < 0.0049$) and lipid ($p < 0.049$) concentrations were significantly higher in animals from the polluted (R.M) site vs the reference (S.J) site.

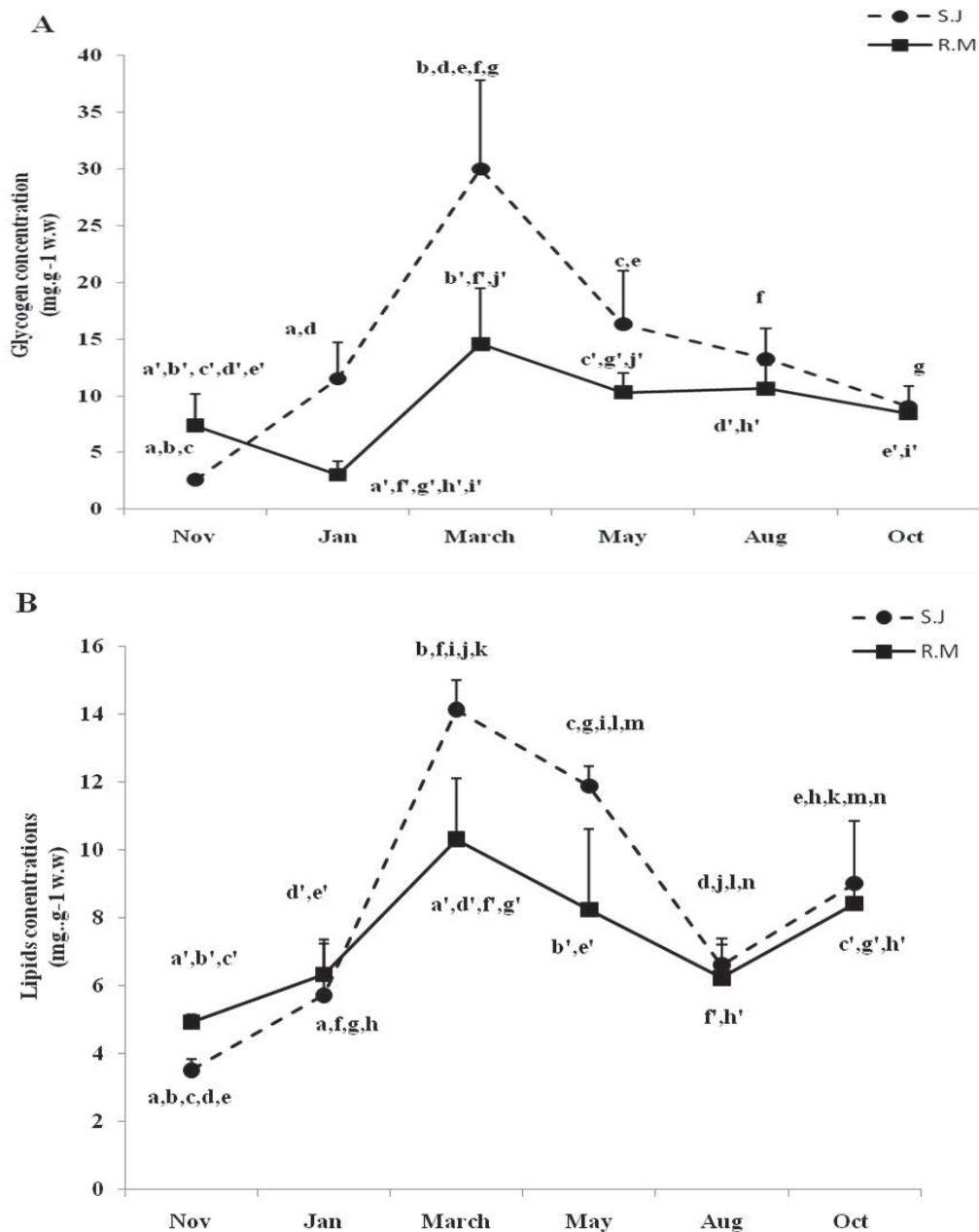


Fig. 31: Temporal variations (means±S.D) of energy reserves (Glycogen: A, Lipids: B) in *D. trunculus* collected from November 2008 to October 2009 in the Sidi Jehmi (●) and the Radès Méliane (■) sites in the Gulf of Tunis. Same letters indicate a significant statistical difference between sampling periods.

VII.5.4. Condition index and Allometry

VII.5.4.1. Condition index

Seasonal variations of condition index (C.I) from both studied sites (S.J and R.M) are illustrated in Fig. 32. The C.I mean values increased from November 2008 (2.7 ± 0.8) and January 2009 (3.8 ± 1.2) in bivalves from the reference S.J site and the polluted R.M site respectively, to reach significant maximum values in March (S.J: 8.4 ± 1.2 ; R.M: 8.7 ± 2.1) and May 2009 (S.J: 9.3 ± 0.9 ; R.M: 8.3 ± 1.4). Then a decrease was observed in August (S.J: 4.7 ± 1.2 ; R.M: 4.9 ± 0.9) followed by a significant increase in October 2009 (S.J: 7.3 ± 2.9 ; R.M: 8.1 ± 2.5). Intersite differences were depicted only in November 2008 where the C.I of *D. trunculus* was significantly ($p < 0.002$) higher in the polluted R.M site (5.0 ± 1.2) comparatively to the reference S.J site (2.7 ± 0.8).

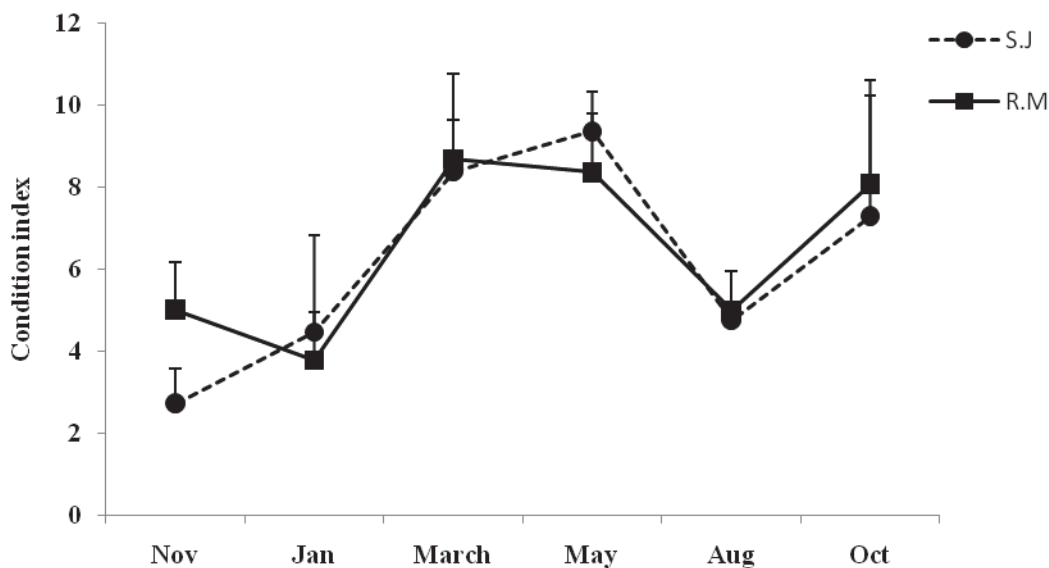


Fig. 32: Temporal variations (means±S.D) of condition index (CI) in *D. trunculus* collected from November 2008 to October 2009 in the Sidi Jehmi (●) and the Radès Méliane (■) sites in the Gulf of Tunis. Same letters indicate a significant statistical difference between sampling periods.

VII.5.4.2. Allometry (length-weight relationships)

The length-weight relationships (length-total weight, length-wet tissue weight, length-dry tissue weight and length-shell weight) of *D. trunculus* collected bimonthly from November 2008 to October 2009 from both sites (S.J: n=120; R.M: n=136) are illustrated in Fig. 33.

The relationships followed an exponential pattern. The exponential pattern observed for the whole bivalves collected from January to October 2009 was depicted at each sampling date. In November 2008, it was impossible to establish these relationships because of an insufficient number of bivalves collected for statistical analysis. Linear regressions between length and weight (total weight, wet tissue weight, dry tissue weight, shell weight) obtained after Log transformation were indeed statistically significant at all sampling dates in both studied sites. The analyses of covariance using the site of origin as covariate are summarized in Table 14. Except in one occasion (October 2009), significant intersite differences were revealed. For an identical shell length, the weight assessed by any kind of measurements (total weight, wet tissue weight, dry tissue weight, shell weight), was higher in the polluted R.M bivalves than in reference S.J animals in January, May and October 2009, as indicated by comparing the slopes as shown in Table 14. An inverse pattern was depicted in March and August 2009.

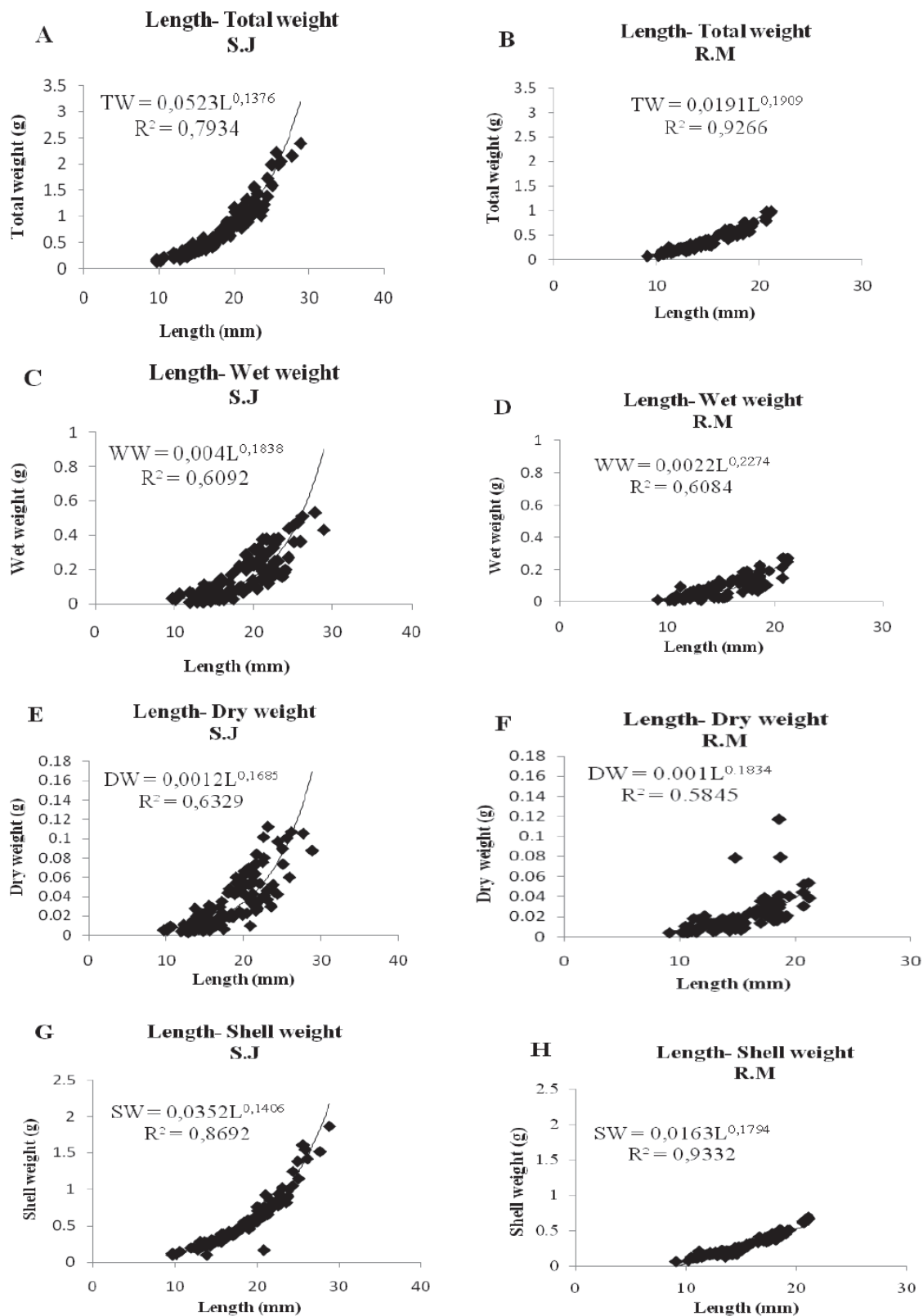


Fig. 33: Allometry relationships (A: Length-Total weight in S.J, B: Length-Total weight in R.M, C: Length-Wet weight in S.J, D: Length-Wet weight in R.M, E: Length-Dry weight in S.J, F: Length-Dry weight in R.M, G: Length-Shell weight in S.J, H: Length-Shell weight in R.M) in *D. trunculus* collected from the Sidi Jehmi and the Radès Méliane sites in the Gulf of Tunis.

Chapitre VII: Combinaison des paramètres de la reproduction et des relations

Period	Allometric relationship	Site	n	a	b	R²	p value
January 2009	Length-Total weight	S.J	20	2.496	-7.876	0.913	< 0.0001
		R.M	18	2.771	-9.104	0.978	
	Length-Wet weight	S.J	20	2.666	-9.478	0.350	< 0.0001
		R.M	18	3.659	-13.79	0.796	
	Length-Dry weight	S.J	20	1.193	-1.990	0.541	< 0.0001
		R.M	18	2.851	-10.94	0.665	
	Length-Shell Weight	S.J	20	2.616	-8.466	0.959	< 0.0001
		R.M	18	2.651	-8.665	0.971	
March 2009	Length-Total weight	S.J	22	2.942	-9.678	0.978	< 0.0001
		R.M	20	2.488	-7.841	0.786	
	Length-Wet weight	S.J	22	2.880	-10.00	0.944	< 0.0001
		R.M	20	2.585	-8.808	0.636	
	Length-Dry weight	S.J	22	2.676	-9.794	0.961	< 0.0001
		R.M	20	1.903	-6.714	0.408	
	Length-Shell Weight	S.J	22	2.891	-9.632	0.969	< 0.0001
		R.M	20	0.933	-4.642	0.167	
May 2009	Length-Total weight	S.J	20	0.707	-0.030	0.371	< 0.0001
		R.M	20	2.752	-8.910	0.908	
	Length-Wet weight	S.J	20	0.576	-0.023	0.292	0.017
		R.M	20	2.956	-10.33	0.801	
	Length-Dry weight	S.J	20	0.592	-0.757	0.284	0.029
		R.M	20	3.116	-11.74	0.745	
	Length-Shell Weight	S.J	20	0.782	-0.542	0.386	0.0002
		R.M	20	2.648	-8.668	0.898	
August 2009	Length-Total weight	S.J	20	2.602	-7.281	0.954	< 0.0001
		R.M	20	2.233	-6.742	0.550	
	Length-Wet weight	S.J	20	2.669	-9.311	0.843	0.0002
		R.M	20	1.458	-4.175	0.072	
	Length-Dry weight	S.J	20	2.521	-9.378	0.841	0.0002
		R.M	20	1.081	-3.259	0.044	
	Length-Shell Weight	S.J	20	2.697	-8.555	0.965	< 0.0001

		R.M	20	2.408	-7.609	0.683	
October	Length-Total weight	S.J	20	2.445	-7.544	0.988	0.591
2009		R.M	20	2.649	-8.473	0.953	
	Length-Wet weight	S.J	20	2.678	-9.152	0.971	0.964
		R.M	20	3.164	-11.270	0.803	
	Length-Dry weight	S.J	20	2.642	-9.763	0.749	0.849
		R.M	20	2.844	-10.488	0.656	
	Length-Shell Weight	S.J	20	2.293	-7.137	0.723	0.445
		R.M	20	2.507	-8.021	0.938	
Annual	Length-Total weight	S.J	102	2.459	-7.647	0.846	< 0.0001
		R.M	98	2.865	-9.417	0.94	
	Length-Wet weight	S.J	102	3.109	-11.158	0.572	< 0.0001
		R.M	98	3.426	-12.464	0.623	
	Length-Dry weight	S.J	102	2.863	-10.763	0.599	< 0.0001
		R.M	98	2.786	-10.425	0.610	
	Length-Shell Weight	S.J	102	2.372	-7.418	0.823	< 0.0001
		R.M	98	2.697	-8.863	0.935	

Table 14. Intersite comparison of length-weight (Total weight, Wet weight, Dry weight and Shell weight) linear regressions after logarithm transformation (S.J: Sidi Jehmi, R.M: Radès Méliane).

VII.6. Discussion

The presence of residual polychlorinated biphenyls (PCBs) has been reported in superficial sediment of Méliane Wadi and in marine stations located offshore (Masmoudi et al., 2005). More recently studies in fish and sediments sampled in 16 stations in the Gulf of Tunis provide important information on levels and sources of contamination by aliphatic hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons and total aromatic hydrocarbons (Mzoughi et al., 2010). Even if other contaminants (other organic compounds, etc.) have not yet been quantified, considering the types of effluents likely encountered in the polluted R.M site it can

be assumed that, as in similar sites around the world, various types of endocrine disruptor compounds will be present in this location. This site, therefore, was particularly suitable for investigating the effect of endocrine disruptors on the suspension-feeder bivalve *D. trunculus*. In contrast, the S.J site, because of its very low level of urbanization was appropriate as the reference site (Tlili et al., 2010) in comparing the biological and physiological responses studied in this work.

D. trunculus is recognized as a gonochoric species; no hermaphroditism or sex reversal was encountered (Gaspar et al., 1999). These authors showed that both males and females of *D. trunculus* originating from Faro (southern Portugal) exhibited a synchronism in the gametogenic evolution and spawning throughout the period studied. Thus, it did not appear necessary to do a separate analysis of the gametogenic cycle by sex. In the present study, the sex-ratio of *D. trunculus* populations from both studied sites; the reference S.J and the polluted R.M site was equilibrated excepted in one occasion (March 2009) where the sex-ratio of bivalves from the polluted site was slightly in favour of females (67%) compared to males (33%). Badino and Marchionni (1972) and Mouëza and Frenkiel-Renault (1973) reported in *D. trunculus* a sex-ratio of 1:1. Gaspar et al. (1999) found that the proportion of males increased in population of *D. trunculus* from Portugal and might be explained as differential growth or differential mortality as a result of spawning effort.

Many different effects on reproduction were recorded in mollusc species exposed to chemical contaminants including some known or suspected endocrine disruptors. Among them, histological alterations such as delayed oogenesis or spermatogenesis may be the more relevant and the more widespread among all mollusc groups (e.g. Binelli et al., 2001; Aarab et al., 2004; Ortiz-Zarragoitia and Cajaraville, 2005; Gauthier-Clerc et al., 2002; Siah et al., 2003). The gametogenic cycle of *D. trunculus* originating from different locations in the Mediterranean coast has been previously investigated. In Camargue, this species spawned from April-September with two periods of gamete release (Bodoy and Masse, 1979). On the Algerian coast, spawning occurred in summer (Mouëza and Frenkiel-Renault, 1973; Ansell et al., 1980). In southern Portugal and the Moroccan Atlantic coast, the spawning period was comprised between March and August (Bayed, 1990; Gaspar et al., 1999). In the present study, similar observations were depicted. However, differences between both studied sites were observed. Mature *D. trunculus* from the polluted R.M site were found only in one occasion in March 2009 whereas in the reference S.J site mature specimens were observed also in May 2009. Moreover, the spawning period began in March until August 2009 in the polluted R.M site and was extended until October 2009 in the reference S.J site. This may

indicate that the reproductive strategy in the reference site is to extend the spawning period as already observed in other populations of *D. trunculus* (Gaspar et al., 1999). Possible interferences of pollutants on endogenous mechanisms that normally delays the development of some gametes could explained the present results in the polluted site where spawning specimens were absent in October 2009 comparatively with those observed in the reference S.J site. The gametogenic cycle recovery of *D. trunculus* from the polluted R.M site was observed earlier; from October 2009 with 36% of specimens in undifferentiated stage and 46% in developing compared to the reference S.J site, since during this period, the majority of S.J bivalves were spent (73%) and spawning (27%). The relationship between gametogenesis and energy metabolism is of great interest because considering that the investment of resources in reproduction reduces somatic investment, the life cycle is a pattern of resources between reproductive and somatic functions (Barnes et al., 1988). Glycogen and lipids are important nutrient storages, usually used as energy sources during gametogenesis. In the present study, bivalves from both sites exhibited high energy reserves levels during periods corresponding to high SMI and could be explained by their investment in gametes. Concerning the influence of site in energy reserves levels, lower glycogen and lipids usually observed in bivalves from the polluted R.M site compared to the reference S.J site could be explained by differences in food availability between sites and by the cost of tolerance (Calow, 1991) endured by organisms from the polluted site to face to chemical contaminants. Intersite differences (R.M vs S.J) in the responses of biomarkers (defense and damage) in *D. trunculus* suggested environmental exposure of bivalves from the R.M site to various chemical contaminants (Tlili et al., 2010). Condition indices are usually regarded as useful measurements of the nutritive status of bivalves (Crosby and Gale, 1990) and are influenced by many factors including food availability, temperature, and most importantly the gametogenic cycle (Boscolo et al., 2003). Results of the present study showed higher values of CI in spring, when environmental conditions are favorable, rather than in winter, when food availability is limited and a clear association of both CI and SMI cycles. Differences in allometry allow life-history comparisons between populations from different habitats. In the present study, intersite differences depicted in weight-length relationships could be related to differences observed in growth (Tlili et al., 2010) and reproduction between the sites of origin of bivalves. It must be duly noted that the shell-length for the bivalves from the polluted R.M site never reached maximum values as high as those registered for reference site (S.J) specimens. If we try to link allometry, energy reserves and reproduction, it can be hypothesized that for bivalves from the S.J reference site, energy reserves are allocated to

gametogenesis and length growth. With regard to bivalves from the R.M polluted site, energy reserves could be devoted to tolerance to chemical stress and to reproductive processes.

VII.7. Conclusion

In conclusion, the suspension-feeder bivalve *Donax trunculus* is a suitable species in environmental studies and the knowledge of reproduction physiology allows us to better understand environmental contaminants impacts. This study is the first to investigate *in situ* biological index, allometry, energy reserves and sexual maturity. Several consistent differences have been observed in reproduction (gametogenic and energy reserves cycles) and biological indices (CI, allometry) between the two populations and could be attributed to differences in the level of pollution of site of origin of bivalves as indicated by biomarkers (Tlili et al., 2010). Anyway, it is needed to take into account also the trophic status of the system since at low levels of nutrients or food availability, the ability of organisms to cope with pollutants is generally decreased (Heugens et al., 2001).

Acknowledgments

This study was supported by a PhD fellowship accorded to Sofiène Tlili from the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF). The authors would to thank the Université Catholique de l'Ouest (France) and the University of Sousse (Tunisia) for providing logistical help. Authors would thank also Dr. Zohra Haouas from the Faculty of Medicine (University of Monastir, Tunisia) for her grateful help in the histological study of gonads.

VII.8. Conclusion partielle du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons étudié les paramètres liés à la reproduction chez *D. trunculus* par une approche intégrative de plusieurs éléments en relation avec le cycle reproductif (suivi saisonnier du cycle gamétogénique, cycle des réserves énergétiques, sex ratio) d'une part, et certains paramètres de la croissance comme les relations allométriques et l'indice de condition, d'autre part. Le site multi-contaminé (R.M) est situé au niveau de l'estuaire de l'oued le plus pollué en Tunisie, l'oued Mèliane, en l'occurrence. Cet oued draine les effluents de diverses agglomérations industrielles et urbaines (Tableau 2, chapitre III) mais également les effluents directs (traités à 50% et non traités) des STEPs qui sont vraisemblablement chargés de substances chimiques à caractère P.E comme cela a déjà été montré dans d'autres sites au niveau mondial (Hashimoto et al., 2000; Noaksson et al., 2001).

Des différences au niveau du cycle gamétogénique selon le site d'origine de bivalves ont été observées. La période de ponte a commencé en mars et a été maximale en mai chez les bivalves des deux sites, mais le pourcentage des organismes en période d'émission gamétique a été plus élevé dans le site multi-contaminé (R.M) vs le site de référence (S.J). De plus, la période de ponte a été plus courte chez les animaux du site multi-contaminé en comparaison avec ceux du site de référence. Les taux des réserves énergétiques (glycogène, lipides) ont été plus élevés en mars et mai par rapport aux autres périodes du cycle annuel d'étude chez les bivalves originaires des deux sites. Cette augmentation, peut être expliquée par l'accumulation des réserves énergétiques chez les bivalves pour fournir l'énergie nécessaire à la libération des gamètes lors de la période de ponte. Des niveaux inférieurs en réserves énergétiques ont été généralement observés chez les bivalves originaires du site multi-contaminé par rapport à ceux du site de référence. Cette différence inter-site peut être expliquée par l'allocation différentielle des réserves énergétiques chez les bivalves originaire du site multi-contaminé (R.M), qui, mis à part, le succès du processus reproductif, doivent mettre en place des mécanismes de tolérance (coûteux d'un point de vue énergétique) vis-à-vis du stress chimique. Les variations saisonnières de l'indice de condition peuvent être associées à l'état physiologique et nutritionnel des bivalves. Durant le cycle annuel de l'étude, l'indice de condition atteint son maximum en mars et mai 2009 pour les bivalves originaires des deux sites (S.J et R.M). Cette période correspond à la fin de la période de maturité sexuelle et le début de la ponte, période des premières libérations gamétiques. Une chute de l'indice de condition est observée en août correspondant à la période des dernières libérations

gamétiques (valeur minimale pour les bivalves des deux sites), suivie d'une nouvelle augmentation dès le mois d'octobre et qui correspond à la reprise du cycle gamétogénique.

Des différences dans les relations allométriques (longueur-poids) entre les bivalves des deux sites étudiés ont été mises en évidence. En effet, nos résultats ont montré que pour une longueur de coquille identique, le poids (poids total, poids total frais, poids des coquilles et poids sec des tissus) était plus élevé chez les bivalves originaires du site multi-contaminé (R.M) en comparaison avec ceux du site de référence (S.J). Ce résultat a été statistiquement significatif (test de significativité sur les pentes après transformation logarithmique) pour les périodes de janvier, mai et octobre 2009. Ces différences inter-site (S.J vs R.M) dans les relations longueur-poids peuvent être expliquées par l'allocation énergétique destinée principalement au succès de la reproduction et au coût de la tolérance vis-à-vis de la contamination chimique chez les bivalves du site multi-contaminé. Ce qui peut expliquer, en partie, ces différences au niveau des caractères biométriques en relation avec la morphologie externe de *D.trunculus*.

Si l'on tente de relier les réponses au niveau allométrique, les niveaux des réserves énergétiques et le cycle gamétogénique, on peut émettre l'hypothèse suivante : pour les bivalves du site de référence (S.J), les réserves énergétiques seraient attribuées principalement à la gamétogenèse et à la croissance longitudinale. En revanche, pour les bivalves du site multi-contaminé (R.M), les réserves énergétiques pourraient être allouées aux mécanismes de tolérance au stress chimique ainsi qu'aux processus physiologiques de la reproduction.

Généralement, il est considéré que les mécanismes de défense et/ou la réparation des dommages dus au stress chimique impliquent des coûts énergétiques responsables d'une réallocation des réserves accumulées (Calow, 1991; Postma et al., 1995). Toute l'énergie acquise par les processus nutritionnels et consacrée aux mécanismes de défense n'est donc plus disponible pour d'autres processus comme l'entretien ou la croissance induisant des conséquences potentielles sur l'état de santé des organismes et de la population.

Pour pouvoir valider l'utilisation de *D. trunculus*, bivalve représentatif des côtes sableuses en Méditerranée, dans les études sur l'évaluation des risques écotoxicologiques des contaminants à caractère PE, d'autres travaux sont nécessaires. Cette partie sera présentée dans le chapitre VIII (Synthèse générale et perspectives).



Chapitre VIII : Synthèse générale et perspectives

Chapitre VIII. Synthèse générale et perspectives

Dans le contexte d'environnements fortement anthropisés comme les zones littorales et côtières, la dispersion de nombreuses substances naturelles et chimiques dans le milieu aquatique contribue à la dégradation de ces écosystèmes. Il en résulte des problèmes de santé publique mais également de santé environnementale. La prise de conscience par les pouvoirs publics des conséquences liées à la présence de tels contaminants dans l'environnement a conduit à la mise en place de programmes de biosurveillance qui reposent principalement sur deux approches complémentaires ; chimique et biologique. Parmi les outils d'aide au diagnostic environnemental, figurent les biomarqueurs qui ont fait l'objet d'importants efforts de recherche et de développement. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse dont les recherches avaient pour objectif majeur de contribuer à l'estimation de l'état de santé environnemental du golfe de Tunis, à travers l'étude de diverses réponses biochimiques, physiologiques et populationnelles d'un mollusque bivalve (*D. trunculus*) représentatif des côtes sableuses en Méditerranée et exposé chroniquement à des effluents des oueds.

VIII.1. Quelle pertinence de la batterie des biomarqueurs utilisés ?

La mesure d'un seul biomarqueur à un instant précis de l'état physiologique d'un organisme ne permet pas de conclure quant à l'estimation de son état de santé général. C'est pourquoi l'approche multi-marqueur a été proposée (Moore et al., 2004 ; Galloway et al., 2006). D'autre part, de nombreux travaux ont mis en exergue l'influence de facteurs abiotiques (e.g. température, salinité) et biotiques (e.g. âge, statut reproducteur, parasitisme) sur les réponses des biomarqueurs, préconisant ainsi un suivi temporel de ces mesures (Amiard-Triquet & Rainbow, 2009 ; Kalman et al., 2010 ; Fossi-Tankoua et al., 2011, Minguez et al., 2009; 2011; 2012).

Dans ce travail, les biomarqueurs sélectionnés ont été choisis dans l'objectif de refléter une grande partie des polluants susceptibles d'être présents dans les sites d'étude et pouvant exercer des effets mesurables. Nos travaux ont montré que l'AChE est un biomarqueur pertinent pour l'étude des perturbations d'ordre neurotoxique chez *D. trunculus* dans un

contexte de biosurveillance. L'AChE s'avère également un marqueur de stress général, reflétant l'exposition à une panoplie de polluants (organiques, métalliques et toxines algales).

Nos résultats ont montré également le rôle préventif de la Cat contre la peroxydation lipidique pouvant être générée par le stress oxydant chez les mollusques bivalves.

L'inhibition de l'activité des GSTs chez les bivalves originaires du site multi-contaminé R.M, peut être expliquée par la forte charge polluante au niveau du site multi-contaminé qui provoque une dénaturation des enzymes de métabolisation ou une saturation des sites actifs de ces dites enzymes. D'autre part, la technique de dosage des GSTs, utilisée dans ce travail, repose sur la quantification de la superfamille d'iso-enzymes des GSTs. Etant donné que la réponse de certains iso-formes peut en masquer d'autres, une inhibition globale peut se reproduire. L'étude de l'expression des profils protéomiques des GSTs permettrait de vérifier cette hypothèse.

L'activité LDH semble être un biomarqueur en harmonie avec le cycle de reproduction de *D. trunculus*.

Le suivi des variations temporelles de la réponse de cette batterie de biomarqueurs a démontré que toutes les variables biochimiques étudiées n'échappent pas à la règle de la saisonnalité des réponses. Ainsi, quel que soit le degré de contamination des sites, le mois de mai (qui correspond au début de la période de ponte pour les populations de *D. trunculus* dans le golfe de Tunis) semble avoir une influence nette dans la régulation des mécanismes biochimiques de la réponse des biomarqueurs. La saison hivernale, période de crue des oueds, est également, une période influente sur les réponses des biomarqueurs avec l'apport de xénobiotiques de tous genres dans le golfe de Tunis.

Ainsi dans les études de biosurveillance, la prise en compte des facteurs biotiques et/ou abiotiques en tant que facteurs de confusion dans les réponses des biomarqueurs est absolument capitale. Les variations inter-site des réponses de ces biomarqueurs ont permis généralement de discriminer les sites selon leur degré de contamination. Ainsi, les bivalves du site R.M peuvent être considérés comme étant des organismes sous stress suite à leur exposition à plusieurs types de contaminants chimiques et ayant développé des mécanismes de protection contre les effets du stress oxydant.

En conclusion, dans ce travail, en dépit du grand nombre de biomarqueurs actuellement disponibles, ceux sélectionnés et mesurés par spectrophotométrie étaient à la fois pertinents

pour la surveillance de la qualité de l'environnement et d'un coût raisonnable pour une application dans les pays en voie de développement comme la Tunisie.

VIII.2. Quel intérêt de l'utilisation d'indices biomarqueurs intégratifs ?

En biosurveillance, plus la nature et la diversité des biomarqueurs augmentent, plus l'interprétation devient délicate surtout dans le cas d'un suivi temporel où les influences biotiques et abiotiques sont prévisibles. L'utilisation d'indices intégratifs s'incruste dans ce cadre et propose tout d'abord la standardisation des réponses de ces biomarqueurs et ensuite leur intégration sous forme d'indices numériques facilement représentatifs de ces résultats diversifiés. Il devient alors plus facile d'attribuer à un site donné pour une période choisie, un indice qui résume ces réponses. Mais cette conversion réponse des biomarqueurs/ indices intégratifs est elle aussi simple que cela ?

En effet, depuis l'apparition du premier indice biomarqueur développé par Narbonne et al. (1999) jusqu'au développement du système expert doté d'une interface graphique élaborée par Dagnino et al. (2007), les travaux dans ce domaine tendent à vérifier et à améliorer l'applicabilité de ces indices (diversité des écosystèmes et des organismes sentinelles) ainsi que leur valorisation en vue de leur développement comme des outils simples et fiables pour le management environnemental.

Dans notre travail, deux indices ont été testés : l'IBR et le HSI dans l'objectif d'une évaluation de l'état de santé environnementale du golfe de Tunis. Aussi, quatre sites contrastés par leur degré potentiel de contamination ont été sélectionnés : S.J, K.A, R.P et R.M.

L'utilisation de l'IBR nous a permis de classer les quatre sites étudiés (S.J, K.A, R.P et R.M) en fonction de leur degré de stress selon l'ordre suivant : S.J> K.A> R.P> R.M. La validation par l'IBR de S.J en tant que site le moins impacté par rapport aux trois autres est d'un grand intérêt pour la validité de la mise en œuvre du HSI qui impose de déterminer un site de référence à priori. La représentation en radar est également d'un grand intérêt puisqu'elle permet de déterminer précisément la contribution de chaque biomarqueur dans la batterie utilisée qui n'est pas possible lors des études prenant en compte chaque biomarqueur isolément.

L'IBR a été appliqué avec succès dans plusieurs études *in situ* utilisant les bivalves marins (Beliaeff & Burgeot, 2002; Broeg & Lehtonen, 2006; Damiens et al., 2007; Pytharopoulou et al., 2008; Raftopoulou & Dimitriadis, 2010). L'IBR a également été utilisé chez les bivalves originaires des estuaires (Serafim et al., 2011), des lagunes (Cravo et al., 2011), mais également de certains écosystèmes dulcicoles (Guerlet et al., 2007). Nos travaux ont montré l'utilité de l'application de l'IBR chez *D. trunculus* pour la surveillance des plages sableuses en Méditerranée.

L'application du système expert HSI nous a permis d'observer deux états de stress seulement (A : bonne santé et C : stress moyen), ce qui montre l'absence de sites gravement impactés dans notre aire de prospection dans le golfe de Tunis.

Si l'on compare le rendement de ces deux indices, l'IBR apparaît comme un indice biomarqueur dynamique qui permet non seulement de classer les sites selon leur degré de pollution mais également la modélisation de la contribution de chacun des biomarqueurs utilisés. Le système expert (HSI) est un indice facile à manipuler, dotée d'une grande flexibilité (possibilité d'ajout de nouveaux biomarqueurs à la batterie proposée initialement). Cependant, il est nécessaire que le choix du site de référence soit incontestable. La problématique liée au choix de cette « référence » peut être considérée comme un inconvénient pour le système expert (HSI) par rapport à l'IBR qui classe les sites selon leur état de stress sans le recours à un groupe (site) de référence.

En conclusion, ces deux indices complémentaires se présentent comme des outils simples et efficaces pour la gestion du risque environnemental et semblent parfaitement adaptés aux conditions socio-économiques des pays du Sud de la Méditerranée. En l'absence de réseau organisé de surveillance du milieu marin en Tunisie, la pertinence de ces indices de faible coût relatif peut servir d'argument pour les décideurs afin de concrétiser ce projet ambitieux.

VIII.3. Quelles relations entre les réponses des biomarqueurs mesurées à l'échelle sub-individuelle et individuelle et celles au niveau populationnel ?

Les réponses biologiques mesurées à l'échelle sub-individuelle et individuelle ne présentent d'intérêt en écotoxicologie que si elles sont capables d'expliquer, de prédire les effets à des niveaux d'organisation biologique plus élevés (e.g. populations) (Forbes et al., 2006).

Si plusieurs travaux de biosurveillance avaient pour objectif l'utilisation combinée des biomarqueurs conventionnels aux analyses chimiques et l'optimisation de ces variables biologiques en tant qu'outils d'évaluation précoce de l'état de santé des écosystèmes naturels, rares sont les études qui ont essayé d'élargir la gamme de ces biomarqueurs pour couvrir les différents niveaux de l'organisation biologique notamment ceux de haute significativité écologique tels que le niveau populationnel.

Ainsi, dans ce travail l'étude du nombre des cohortes et leur évolution temporelle ainsi que les modes de recrutement de *D.trunculus* associés à un suivi spatio-temporel d'une batterie de biomarqueurs mesurés à échelle biochimique et cellulaire a permis, au moins, d'étudier si ces changements observés précocement peuvent prédire des altérations qui peuvent atteindre la structure d'une population. Nos résultats sur l'identification et le suivi de la croissance des cohortes recrutées au niveau des deux sites d'étude (S.J et R.M) ont permis la mise en évidence de certaines modifications structurales entre les deux populations considérées. Ainsi le nombre de cohortes identifiées au niveau de chaque site était différent : 5 cohortes pour le site de référence (S.J) et 4 pour le site multi-contaminé (R.M). L'étude des modes de recrutement montre que celui-ci est bimodal dans le site de référence (un entre mai et août et un autre entre août et octobre) mais seulement unimodal dans le site multi-contaminé (entre août et octobre). Or les données de la littérature indiquent que le mode de recrutement de *D.trunculus* est généralement bimodal dans le bassin méditerranéen (Ramón et al., 1995). La différence entre le mode de recrutement entre les bivalves originaires de deux sites appartenant au même écosystème et subissant l'influence des mêmes fluctuations naturelles pourrait être le résultat d'une modification de stratégie populationnelle des bivalves du site contaminé (vs ceux du site de référence) pour faire face à l'exposition chronique à des effluents urbains, modifiant ainsi la composition physicochimique du milieu et par conséquent pouvant agir sur le réseau trophique et les conditions favorables à la reproduction et à la croissance de l'espèce.

C'est dans ce contexte que l'étude de la structure et la dynamique des populations de *D. trunculus* dans le golfe de Tunis nous a permis dans l'ensemble de mieux comprendre la gestion de la variabilité démographique et les mécanismes d'adaptation écologique qu'adopte une espèce dans un biotope donné et sous certaines conditions environnementales. Précisément, nos travaux ont montré l'intérêt de l'étude des réponses populationnelles des bivalves exposés chroniquement à un stress et a permis de mieux élucider l'ensemble des mécanismes que peut adopter une espèce face à des agressions de l'environnement.

Cet aspect a encore été investigué dans la deuxième partie de la thèse notamment avec l'étude combinatoire des paramètres de la reproduction (réserves énergétiques, cycle gamétogénique) et des relations allométriques comme nouvel outil de diagnostic environnemental. Le suivi du cycle annuel de la reproduction de *D.trunculus* a permis l'identification des étapes-clés du cycle gamétogénique et la durée de celles-ci. Le suivi du cycle des réserves énergétiques et les indices de condition ont donné la possibilité d'observer une corrélation physiologique d'ores et déjà bien établie chez les mollusques bivalves : une accumulation des réserves énergétiques au niveau tissulaire pendant la période de maturité sexuelle suivie d'une chute de ces réserves due à la libération des gamètes et une reprise précoce de la synthèse et l'accumulation des lipides pour préparer le nouveau cycle reproductif (Beninger & Lucas, 1984; Ojea et al., 2004 ; Mouneyrac et al., 2008).

Des différences structurales concernant le cycle sexuel des populations étudiées selon leur site d'origine ont été mises en évidence. La durée de la période de ponte était réduite chez les bivalves du site multi contaminé (la ponte commence en mars, atteint un maximum en mai et s'achève en août) par rapport aux bivalves du site de référence (la ponte commence en mars, atteint un maximum en mai et se prolonge jusqu'en octobre). Le pourcentage des animaux en phase de ponte était plus important au niveau du site multi-contaminé (mars : 30 % ; mai 89,47 %) vs le site de référence (mars: 8,57%, mai ; 71,42 %). L'évolution de l'indice de maturité sexuelle (I.M.S) a indiqué chez les bivalves du site multi-contaminé, une reprise du cycle avancée dès le mois d'octobre avec déjà 46 % des animaux en phase de développement gamétique. Par contre, chez les bivalves du site de référence, l'évolution de l'I.M.S a montré que la libération des gamètes continuait pendant le mois d'octobre avec 27 % des animaux en phase d'émission gamétique.

Concernant les relations allométriques, nos résultats ont montré que pour une longueur de coquille identique, le poids considéré (poids total, poids total frais, poids des coquilles et poids sec des tissus) était généralement plus élevé chez les bivalves originaires du site multi-contaminé (R.M) vs ceux du site de référence (S.J) pour trois périodes de l'étude (janvier, mai et octobre 2009). Ces différences allométriques peuvent en partie être expliquées par l'allocation énergétique destinée principalement au succès de la reproduction et au coût de la tolérance vis-à-vis à la contamination chimique chez les bivalves du site multi-contaminé (R.M). D'autres paramètres relatifs aux mécanismes de tolérance vis-à-vis du stress chimique chez *D. trunculus* sont nécessaires pour confirmer ces explications (e.g. la consommation d'O₂, l'allocation énergétique cellulaire, ...).

Compte tenu des résultats acquis dans ce travail, l'on peut toutefois émettre l'hypothèse que pour les bivalves du site de référence, les réserves énergétiques seraient attribuées principalement à la gamétogenèse et à la croissance longitudinale. En revanche pour les bivalves du site multi-contaminé, les réserves énergétiques pourraient être allouées aux mécanismes de tolérance au stress chimique ainsi qu'aux processus physiologiques de la reproduction. Si l'étude des relations allométriques peut fournir des informations fondamentales sur la croissance et le développement d'une espèce, il existe peu de données bibliographiques sur des travaux qui ont essayé de mettre en relation les réponses perçues à l'échelle sub-individuelle et les modifications qui peuvent survenir et atteindre la croissance d'une population de bivalves subissant un stress chimique.

En général, l'étude des relations allométriques ne permet pas à elle seule d'observer des changements visibles de la croissance. C'est dans le cadre d'une étude multi-paramétrique (à différents niveaux d'organisation biologique) que l'allométrie peut s'avérer pertinente pour expliquer certains changements à l'échelle individuelle et par conséquent déjà traduits par la réponse de certains biomarqueurs à l'échelle sub-individuelle.

L'influence des facteurs de l'environnement qui peuvent affecter la croissance ou encore la stratégie de recrutement des cohortes est complexe. L'origine de ces complexités des effets peut être attribuée à: *i)* La durée de l'incorporation des signaux de l'environnement, *ii)* Leur détection par les composantes de l'échelle sub-individuelle (cellules, molécules), *iii)* Les répercussions au niveau des individus modifiant les modalités de leur croissance ou de leur reproduction.

En effet, dans le cas d'une exposition de longue durée à une pollution chimique, un grand nombre de macromolécules sont affectées et des altérations cellulaires ou tissulaires vont vraisemblablement se produire. Le stress chimique est tolérable dans le cas où un certain nombre de cellules est encore hors d'atteinte, compte tenu du fait que les fonctions de base ne sont pas atteintes. Au niveau individuel, le facteur temps devient de plus en plus important, puisque les effets aux niveaux des populations et des communautés ne se manifestent qu'après un certain temps d'exposition (années, dizaines d'années). Dans une telle situation, attribuer les effets notés à une seule composante, à un stress spécifique est délicat, sinon impossible en raison des interactions réelles ou supposées l'être entre les différents changements environnementaux et les niveaux populationnel et communautés. Les niveaux population et communauté possèdent, en tant que niveaux d'organisation biologique supérieurs, des

propriétés émergentes en comparaison au niveau individuel ou sub-individuel. Les changements constatés dans la composition spécifique d'une communauté sont en fait l'aboutissement d'un processus de perturbation de longue date. Ainsi, il s'avère difficile d'établir des relations « facilement interprétables » entre les conséquences aux niveaux d'organisation biologique plus élevés (e.g. population) et des réponses précoces (au niveau sub-individuel).

Une analyse en composantes principales intégrant d'une part l'ensemble des données des réponses des biomarqueurs biochimiques (Cat, GST, TBARs, MTs, AChE, LDH), des valeurs de l'IBR, des niveaux en réserves énergétiques (lipides, glycogène) et des indices de condition (IC) et d'autre part l'ensemble des individus des populations du site de référence S.J et du site multi-contaminé R.M a permis clairement de différencier ces deux populations (Figures 34A et 34B).

L'analyse a permis d'extraire 10 axes parmi lesquels seuls les axes F1, F2 et F3 sont définis par des valeurs propres supérieures à 1. Les axes F1 et F2 ont finalement été retenus pour représenter les variables dans un espace à deux dimensions.

Les IBRs, les activités enzymatiques Cat et AChE, les niveaux en MTs et en lipides, contribuent majoritairement (contribution collective : 75,62%) à la formation du premier axe F1. Les indices de condition et les activités GST et LDH, contribuent majoritairement (contribution collective : 61,19%) à la formation du second axe F2. Le plan principal F1-F2 (Figure 34A) conserve 64,26% de l'information initiale.

Dans le cercle des corrélations des variables, la première composante principale (F1) montre que les IBR sont de façon significative, positivement corrélés aux taux de MTs, de TBARs et aux activités Cat, mais négativement corrélés aux activités AChE. Dans la seconde composante principale (F2), les activités LDH et GST sont, de façon significative, négativement corrélées confirmant les résultats observés lors du suivi spatio-temporel de la réponse des biomarqueurs (Chapitre VI; Tlili et al, 2010). Une corrélation significative et positive entre les niveaux des réserves énergétiques (lipides et glycogène) et les indices de condition des bivalves est également mise en évidence dans cette composante F2.

La Figure 34B présente la carte factorielle des données présentées dans le plan principal en fonction des sites (site de référence S.J ; site multi-contaminé R.M) et des périodes de prélèvement des bivalves. L'analyse fait apparaître des différences marquées entre les deux sites. Dans la partie négative de l'axe F1 sont regroupées les variables correspondant aux bivalves collectés sur le site de référence (S.J.) présentant notamment des activités élevées

d'AChE. Dans la partie positive de l'axe F1, les données correspondent aux individus issus du site pollué (R.M.) présentant des IBR plus élevés, des activités et taux de biomarqueurs de stress oxydant (Cat), de défense (MTs) et de dommage (TBARs) également plus élevés. On peut donc associer un gradient de pollution à l'axe F1 de la partie négative de l'axe vers la partie positive, les individus du site multicontaminé présentant majoritairement des activités AChE faibles et des taux élevés des autres biomarqueurs à l'inverse des individus du site de référence S.J.

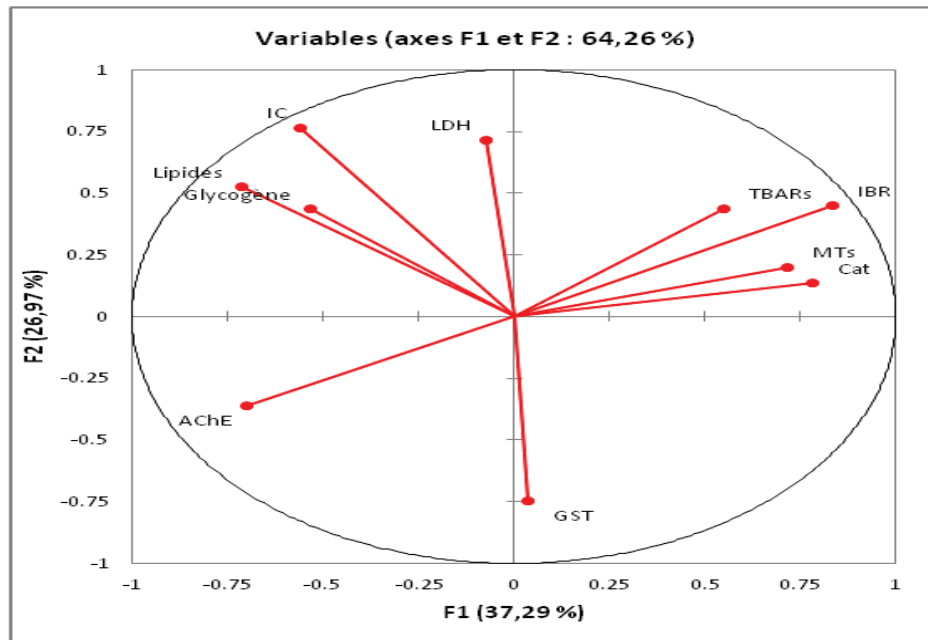


Figure 34A : Analyse en composantes principales de l'ensemble des données obtenues à partir de l'analyse des bivalves issus des deux sites (S.J. et R.M.). MTs : concentrations en métallothionéines ; Cat : activités catalase ; TBARs : thiobarbituric acid reactive substances ; LDH : activités lactate déshydrogénase ; GST : activité glutathione-S-transférases ; AChE : activité Acétylcholinestérase, IBR : Integrated Biomarker Response.

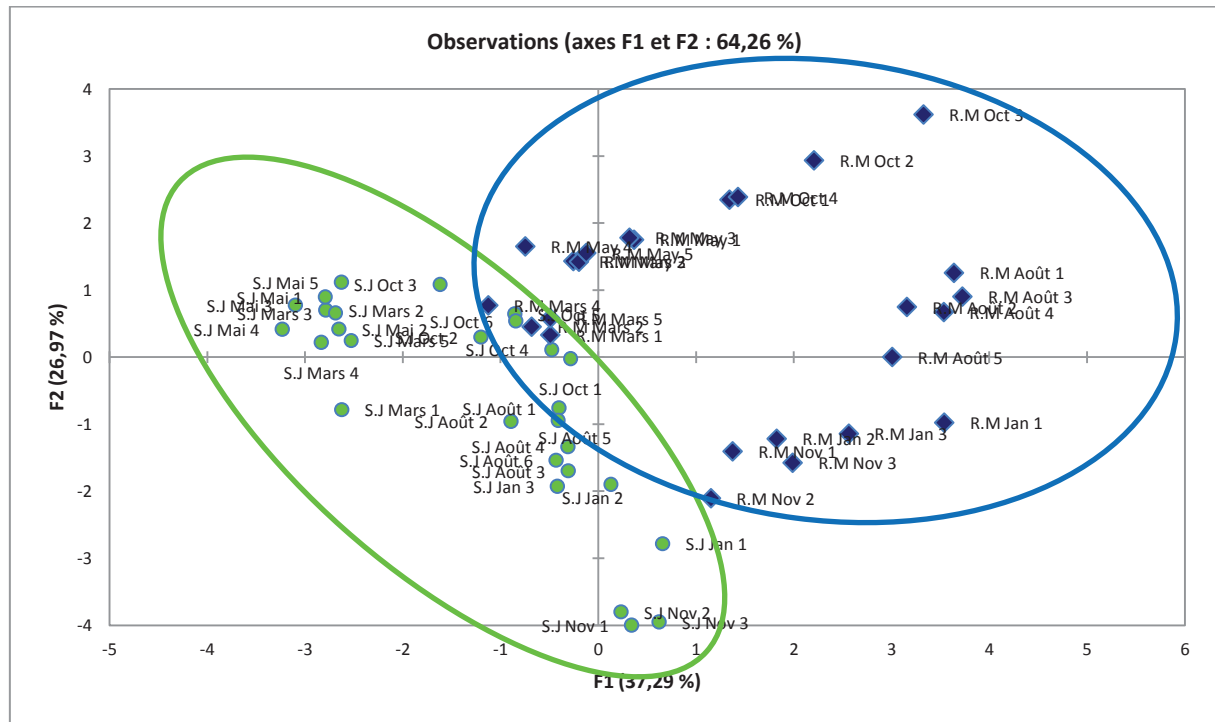


Figure 34B : Carte factorielle présentant les variables par campagne de prélèvement et par site selon les axes F1 et F2 de l'analyse en composantes principales. L'ellipse verte entoure les variables correspondant aux bivalves récoltés sur le site de référence Sidi Jehmi (S.J.) ; L'ellipse bleue entoure les variables correspondant aux bivalves collectés sur le site pollué Radès Méliane (R.M). Chaque nom de site est suivi du mois de prélèvement.

En se basant sur les résultats de cette thèse, le schéma ci-dessous (Figure 35) résume l'ensemble de la cascade des réponses observées à différentes échelles d'organisation biologique chez *D.trunculus* exposé chroniquement à des effluents urbains dans le golfe de Tunis.

De façon synthétique, nos travaux ont montré que suite à une exposition chronique au stress chimique (et naturel), les mécanismes de défense s'activent chez *D.trunculus* et les biomarqueurs de stress oxydant sont les premiers à se mettre en place. D'un point de vue dommage, ces effets se traduisent principalement par une inhibition de l'activité AChE et une diminution des niveaux des réserves énergétiques. Par la suite, ces effets pourraient être à l'origine de modifications de l'allocation énergétique. Ces déséquilibres peuvent être la cause directe de la modification de la stratégie de la reproduction. Ces perturbations de la reproduction se manifestent par une modification du cycle gamétogénique (e.g. durée, pourcentage des animaux à chaque stade). Des modifications des relations allométriques

pourraient avoir lieu et se traduiraient par une altération de la croissance individuelle. Ces altérations se poursuivraient à l'échelle populationnelle en induisant une modification de la croissance des cohortes et du mode de recrutement. Cette perturbation de la structure et de la dynamique des populations de *D.trunculus* pourrait à terme provoquer une extinction locale de l'espèce si le stress chimique se maintient ou même augmente.

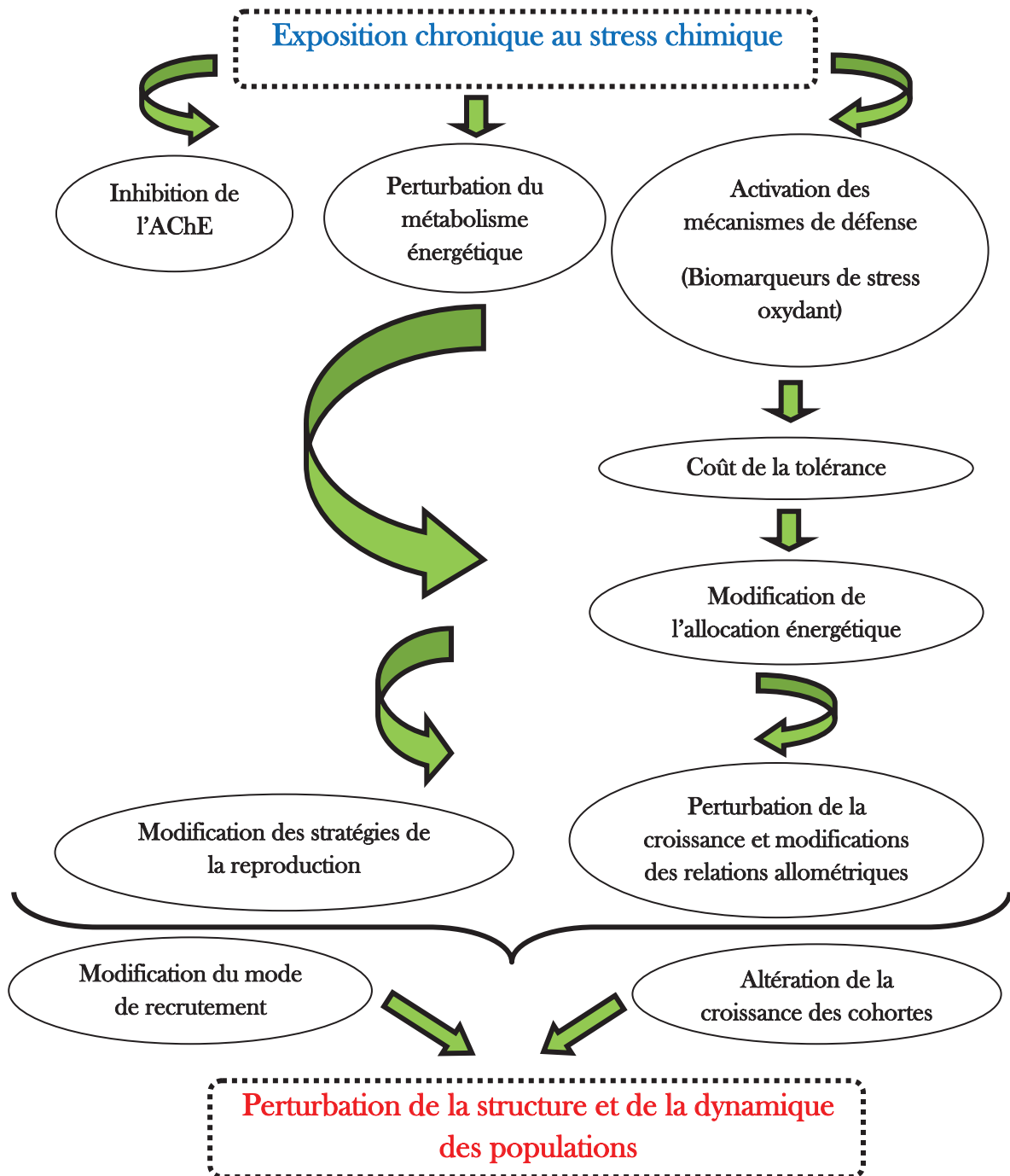


Figure 35 : Schéma conceptuel de l'ensemble des réponses observées à différents niveaux d'organisation biologique chez *D.trunculus* exposé chroniquement à des effluents urbains dans le golfe de Tunis.

VII.4. Quelles perspectives ?

A l'issue de ce travail, plusieurs perspectives se dégagent :

- **Identification des contaminants chimiques et surveillance du golfe de Tunis**

Les sédiments étant des réservoirs importants de contaminants chimiques, il serait pertinent de pouvoir quantifier les polluants potentiellement responsables de l'altération des réponses biologiques dans cette matrice physique.

Dans un premier lieu, une évaluation de l'état de contamination chimique complète des polluants classiques (métaux traces, HAPs, PCBs...) des côtes de faible bathymétrie (eaux de baignade entre autres) du golfe de Tunis s'avère une perspective prometteuse d'autant plus que les rares données chimiques disponibles actuellement ne concernent que les eaux du large du golfe. Cependant, l'analyse globale des contaminants dans les matrices physiques (eau, sédiments) ou biologiques (dans les organismes) n'a pas de signification écotoxicologique. L'utilisation des capteurs passifs serait pertinente puisqu'ils permettent non seulement une mesure intégrative de la quantification des contaminants mais également la connaissance de certaines caractéristiques physico-chimiques des contaminants détectés. L'utilisation des capteurs de types DGT (Diffusive Gradient in Thin-films) semble être appropriée pour la détection et la quantification des métaux traces dans ce contexte. Par ailleurs, les capteurs de type SPMD (Semi-Permeable Membrane Device) semblent être les mieux adaptés pour la mesure des xénobiotiques organiques puisqu'ils sont capables d'assurer la détection simultanée des pesticides organochlorés, des HAPs, et des PCBs. Toutefois, le coût élevé (particulièrement par rapport au contexte tunisien) de ce genre d'analyses, doit être négocié et argumenté par l'implication de plusieurs acteurs dans le cadre de programmes de coopération (e.g. implication des organisations internationales, agences de l'environnement, unités de recherches...).

En ce qui concerne la quantification des contaminants dans les organismes, il serait judicieux d'étudier les formes physico-chimiques de stockage (e.g. les métaux traces) dans les tissus qui conditionnent leur toxicité. Ces différentes mesures chimiques permettraient de valider les hypothèses basées sur les résultats des biomarqueurs quantifiés dans cette thèse. A noter qu'au cours de ce travail, une étude sur la quantification des métaux traces dans les fractions soluble et insoluble des tissus (glandes digestives) de *D. trunculus* collecté dans les quatre sites du golfe de Tunis (S.J, K.A, R.P et R.M) est actuellement en cours.

La nette inhibition de l'activité AChE, observée chez les bivalves originaires du golfe de Tunis observée lors de ce travail, suggère la présence de produits neurotoxiques comme les pesticides. Il sera intéressant d'étudier le flux de la circulation de ces produits phytosanitaires largement utilisés dans les zones limitrophes au golfe de Tunis. Cette étude s'avère d'autant plus nécessaire de nos jours en raison de l'absence quasi-totale de données actualisées sur l'accumulation et la dispersion des résidus de pesticides en Tunisie. Ceci nécessitera tout d'abord, un sérieux travail de documentation (recensement des quantités et de la nature des pesticides utilisés, cartographie des zones traités, moyens d'épandage...). Ensuite, la mise en place d'un réseau d'échantillonneurs passifs aux débouchés des oueds, et au large du golfe de Tunis permettra d'étudier le flux de circulation de ces résidus. Une étude de quantification des résidus des pesticides dans différents organismes de la chaîne trophique, pourra contribuer à étudier l'accumulation des résidus et leur transfert dans la chaîne (bioamplification). L'utilisation de l'inhibition de l'activité AChE comme marqueur de neurotoxicité, pourra indiquer l'effet probable de ces substances sur la faune marine étudiée du golfe de Tunis.

Toujours dans le cadre de la surveillance chimique, certaines régions limitrophes au golfe de Tunis nécessiteront une attention particulière. A titre d'exemple, les zones fortement agricoles du Cap Bon, Nord Est de la Tunisie (dont la ville de Grombalia) sont depuis une vingtaine d'années en plein développement économique. Outre la vocation agricole de la région (principalement vignes et agrumes), plusieurs installations agroalimentaires ont été créées (industrie laitière, brasseries, transformations des viandes...). Le réceptacle final des effluents (peu de données existent sur le traitement de ces eaux) de ces industries demeure le golfe de Tunis via les oueds et certaines STEP. De plus, l'évaluation de la toxicité des effluents industriels du « vieux » complexe de Mégrine et Radès (implanté directement sur les côtes du golfe de Tunis) reste encore un champ d'investigation intéressant.

Dans un second lieu, il sera particulièrement pertinent d'étudier la présence et le devenir d'un certain nombre de contaminants émergents tels que les substances à caractère P.E. En effet, le site R.M étudié dans cette thèse est chroniquement exposé à des effluents urbains des STEP contenant vraisemblablement plusieurs substances à caractère P.E. Dans cette perspective, il est envisageable d'utiliser un ensemble de tests *in vitro* sur lignées cellulaires pour mettre en évidence des activités oestrogéniques, androgéniques ou anti-androgéniques sur des extraits de sédiments provenant des sites concernés. Plusieurs types de bioessais

comme par exemple le test YES (Yeast Estrogen Screen) ont été validés pour le « screening » du potentiel PE de xénobiotiques dans les échantillons environnementaux.

Dans un troisième lieu, on pourra s'intéresser à une « nouvelle » gamme de contaminants émergents telles que certaines substances médicamenteuses et les produits de soin : les PPCPs (pharmaceuticals and substances used in personal care products), qui n'ont pas été étudiés jusqu'à ce jour au niveau du golfe de Tunis ou d'autres sites impactés en Tunisie (e.g. golfe de Gabès, lagune de Bizerte...). Ce genre d'études peut s'avérer très onéreux et nécessite la mise en place d'un réseau de coordination et de réalisation des travaux impliquant les ministères de l'environnement et de la santé publique et d'autres institutions à l'échelle méditerranéenne (e.g. le programme MEDPOL). Une étude préliminaire sur les rejets des PPCPs et les principales substances à risque dans le contexte tunisien, permettra de mieux cerner les objectifs de cette étude.

En conclusion, compte tenu de la pression anthropique croissante sur les côtes du golfe de Tunis, il s'avère plus que jamais nécessaire de penser sérieusement à une « cartographie » de la pollution chimique dans cette zone. Certes ce genre d'études est onéreux, surtout dans les conditions socio-économiques actuelles, mais une répartition minutieuse des tâches et une meilleure coordination entre les différents acteurs (ministère, agences de l'environnement, instituts de recherches, unités de recherches universitaires...) pourrait contribuer à soulever ces défis. C'est dans ce cadre que le projet du premier « réseau tunisien de surveillance de l'environnement marin » pourrait voir le jour et contribuer de façon active à une meilleure gestion environnementale des côtes tunisiennes.

Dans cette perspective, les mollusques bivalves peuvent servir de bioindicateurs pertinents pour étudier l'accumulation des xénobiotiques lors d'expériences de transplantation au large du golfe et en face des embouchures des oueds ou de toute autre source directe de pollution (e.g. en face des complexes industriels, STEPs). La moule *M. galloprovincialis* semble être un bon candidat pour ces expériences de transplantation pour évaluer la qualité de l'eau.

- **Utilisation de *D. trunculus* comme indicateur des modifications de granulométrie des plages sableuses**

Concernant la qualité des sédiments du golfe de Tunis, une des thématiques passionnantes sera l'utilisation des bivalves de la famille des Donacidae pour mesurer les éventuelles modifications de la granulométrie des plages sableuses. En fait, outre les polluants, les oueds drainent également des quantités importantes de matériaux détritiques, surtout lors des crues hivernales. Une étude récente (La Valle et al., 2011) montre l'efficacité de l'utilisation de *D. trunculus* comme un indicateur biologique pertinent capable de détecter les variations de la granulométrie des plages sableuses des côtes italiennes. L'évaluation à long terme des paramètres écologiques (abondance, densité) de *D. trunculus* peut présenter un outil efficace pour l'étude de l'érosion et l'effet des apports des oueds, problématique parfaitement adaptée au contexte environnemental tunisien.

- **Etude des biomarqueurs comportementaux**

Parmi les biomarqueurs pertinents d'un point de vue écologique figurent les biomarqueurs comportementaux. *D. trunculus* étant un bivalve suspensivore doté d'une grande capacité d'enfouissement dans le sable, l'utilisation du test de l'enfouissement de *D. trunculus* dans les sédiments serait une occasion d'étudier les réponses de biomarqueurs comportementaux (cinétique d'enfouissement des bivalves) et l'inhibition de l'activité AChE en tant que biomarqueur de neurotoxicité. Par exemple, Fossi et al., (2010) ont mis en évidence chez *Scrobicularia plana* collectée de trois sites différant par leur gradient de pollution (Baie de Bourgneuf, estuaire de la Loire et estuaire de la Seine), des corrélations positives entre l'inhibition de l'activité AChE et la vitesse de l'enfouissement des bivalves dans les sédiments.

Par ailleurs, une étape préliminaire d'adaptation du protocole du test de l'enfouissement (e.g. caractérisation détaillée des sédiments utilisés) chez *D. trunculus* est primordiale puisque la qualité de tri des sables est un caractère fondamental pour l'écophysiologie de *Donax* (La Valle et al., 2011).

D'autres méthodes, telles que l'observation de la fermeture des valves de *D. trunculus* en réponse à la présence de contaminants peuvent également être abordées. Pour ce faire, on peut envisager l'utilisation des certaines techniques automatisées de traitement des mouvements ou

de prise d'images telles que celles proposées par le « Musselmonitor » (Baldwin & Kramer, 1994) ou le « Multispecies Freshwater Biomonitor » (Gerhardt & Schmidt, 2002).

De plus, ces biomarqueurs comportementaux sont des moyens non- destructifs et à « faible coût » permettant de mesurer sur les mêmes individus d'autres biomarqueurs biochimiques ou physiologiques. Cette approche est donc parfaitement appropriée à notre contexte.

- **Perturbations de la reproduction**

Des études complémentaires portant sur d'autres biomarqueurs d'altération de la reproduction sont nécessaires.

Dans le but de mieux caractériser les éventuelles perturbations de la reproduction chez les bivalves, d'autres biomarqueurs, principalement développés pour le suivi de la qualité des naissains et des larves en aquaculture, peuvent être utilisés. Parmi ces biomarqueurs figure l'étude de la qualité des gamètes et des larves (e.g. vitesse de déplacement des gamètes, survie des larves D, détection des anomalies larvaires).

D'autre part, il s'avère intéressant d'étudier l'impact de certaines infestations parasitaires sur le cycle reproducteur de *D. trunculus*. Parmi ces parasites, figure le trématode *Bacciger bacciger* précédemment isolé dans les gonades femelles de *D. trunculus* originaire de différents sites du golfe de Tunis (Dhaoui-Ben Khedher et al., 2003 ; Hamrouni, 2006). Dans cette perspective, l'étude des éventuelles interactions entre le stress chimique et le parasitisme chez les bivalves, sera une d'une grande importance dans le but de mieux comprendre la complexité des mécanismes régulant le succès de la reproduction chez ces animaux.

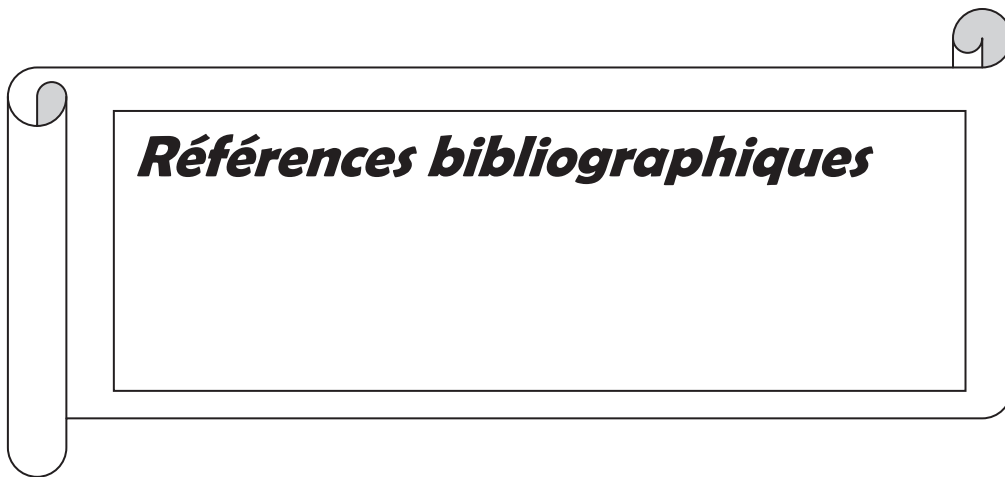
- **Les indices biomarqueurs intégratifs**

Les indices biomarqueurs intégratifs actuels ne prennent en charge que les variables biochimiques, moléculaires ou dans un certain cas des paramètres individuels (e.g. MuSES). Une optimisation qui vise l'intégration des données de différents niveaux d'organisation biologique notamment les paramètres physiologiques et populationnels, est proposée. Cette perspective nécessitera une étape de réflexion préalable sur les modalités de conversion de ces données (e.g stades de maturité sexuelle, nombre de cohortes...) en indices numériques intégrables et compatibles avec les réponses des biomarqueurs. D'ailleurs au niveau

populationnel, certains paramètres non traités dans la présente étude, tels que les paramètres de mortalité ou des équations de la croissance absolue, peuvent constituer une thématique de recherche destinée à une éventuelle valorisation pour l'étude de l'effet d'un stress chronique sur les populations de bivalves.

- **Autres indices au niveau des communautés**

Finalement, dans le contexte de la représentativité écologique, une étude comparative associant les données issues de ce travail et celles d'indices écologiques (notamment les indices des peuplements benthiques tels que les indices BENTIX et AZTI Marine Biotic Index) est envisageable dans le golfe de Tunis et ce dans le souci de sélectionner et d'optimiser les outils de surveillance environnementale relatifs aux conditions environnementales et surtout socio-économiques des pays du Sud de la Méditerranée.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Aarab, N., 2004.** *Les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves: de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain.* Université de Bordeaux I. 233 p.
2. **Abarnou, A., Burgeot, T., Chevreuil, M., Leboulenger, F., Loizeau, V., Madoulet-Jaouen, A., Minier, C., 2000.** *Les contaminants organiques : quels risques pour le monde vivant ?* Programme scientifique Seine-Aval, ifremer, 35 p.
3. **Adams, S.M., Brown, A.M., Goede, R.W., 1993.** *A quantitative index for rapid evaluation of fish condition in the field.* T. Am. Fish. Soc. 122, 63-73.
4. **Adams, S.M., Shepard, K.L., Greeley, Jr. M.S., Jimenez ,B.D., Ryon, M.G., Shugart, L.R., McCarthy, J.F., 1989.** *The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish.* Mar. Environ. Res. 28, 459-464.
5. **Added, A., Ben Mammou, A., Abdeljaoued, S., Essonni, N., Fernex, F., 2003.** *Caractérisation géochimique des sédiments de surface du Golfe de Tunis.* Bull. Inst. Natl. Sci. Tech. Mer (Tunisie). 30, 135-142
6. **Aebi, H., 1983.** *Catalase.* In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 3. Academic Press, New York, pp. 237-286.
7. **Affi, A., Ayari, R., Zaabi, S., 2008.** *Ecological quality of some Tunisian coast and lagoon locations, by using benthic community parameters and biotic indices.* Estuar. Coast. Shelf. Sci. 80, 269-280.
8. **Ait Alla, A., Mouneyrac, C., Durou, C., Moukrim, A., Pellerin, J., 2006.** *Tolerance and biomarkers as useful tools for assessing environmental quality in the Oued Souss estuary (Bay of Agadir, Morocco).* Comp. Biochem. Physiol. C 143, 23-29.
9. **Alexander, R.R., Stanton, R.J., Dodd, J.R., 1993.** *Influence of sediment grain size on the burrowing of bivalves: correlation with distribution and stratigraphic persistence of selected neogene clams.* Palaios 8, 289- 303.
10. **Allderdice, P.W., Gardner, H.A.R., Galutira, D., Lockridge, O., La Du, B.N., McAlpine, P.J., 1991.** *The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26.* Genomics 11:452-454.
11. **Almeida, E.A., Bairy, A.C.D., Loureiro, A.P.M., Martinez, G.R., Miyamoto, S., Onuki, J., Barbosa, L.F., Garcia, C.C.M., Prado, F.M., Ronsein, G.E., Sigolo, C.A., Brochini, C.B., Martins, A.M.G., de Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2007.** *Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental*

- stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage.* Comp. Biochem. Phys. Part A 146, 588–600.
12. **Alongi, D.M., 1998.** *Coastal ecosystem processes.* CRC Press, Boca Raton.
 13. **Alvarez, D.A., Petty, J.D., Huckins, J.N., Jones-Lepp, T.L., Getting, D.T., Goddard, J.P., Manahan, S.E., 2004.** *Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments.* Environ. Toxicol. Chem 23, 1640-1648.
 14. **Alves, S.R.C., Severino, P.C., Ibbotsom, D.P., Silva, A.Z.X., Lopes, F.R.A.S., Saenz, L.A., Bairy, A.C.D., 2002.** *Effects of furadan in the brown mussel Perna perna and in the mangrove oyster Crassostrea rhizophorae.* Mar. Environ. Res. 54, 241–245.
 15. **Amiard, J.C., Caquet, T. & Lagadic, L., 1998.** *Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement.* In Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement (eds L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard & F. Ramade), pp. XXI-XXXI. Lavoisier, Paris.
 16. **Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., 2008.** *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques.* Lavoisier Tec & Doc, Paris.
 17. **Amiard-Triquet, C., 2009.** *Behavioral disturbances: the missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research.* Hum. Ecol. Risk. Assess. 15, 87–110.
 18. **Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., 2009.** *Environmental Assessment of Estuarine Ecosystems: A Case Study.* CRC Press, Boca Raton.
 19. **Andral, B., Stanisière, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thébault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004.** *Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging.* Mar. Pollut. Bull. 49, 704–712.
 20. **Andrews, G.K., 2000.** *Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions.* Biochem. Pharmacol. 59, 95-104.

21. **ANPE., 2006.** *Rapport national de l'état de l'environnement.* Agence Nationale de Protection de l'Environnement. Ministère de l'Environnement et du Développement Durable, Tunisie.
22. **Arkhipchuk, V., 1995.** *Change of nucleolus characteristics in fish embryo cells under the influence of low-level Radiation.* Radiat. Biol. Radioecol. 35, 512–517.
23. **Arkhipchuk, V., Garanko, N., 2002.** *A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity.* Environ. Toxicol. 17, 187–194.
24. **Arkhipchuk, V., Malinovskaya, V., 2000.** *Use of the complex approach in natural water biotesting.* Chem. Water. Technol. 22, 428–443.
25. **Astley, K.N., Meigh, H.C., Glegg, G.A., Braven, J., Depledge, M.H., 1999.** *Multi-variate Analysis of Biomarker Responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees Estuary (UK).* Mar. Pollut. Bull. 39, 145-154.
26. **Atrill, M. J., Rundle, S. D., 2002.** *Ecotone or Ecocline: Ecological Boundaries in Estuaries.* Estuar. Coast. Shelf. S. 55, 929-936.
27. **Axiak, V., Micallef, D., Muscat, J., Vella, A., Mintoff, B., 2003.** *Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: some further observations.* Environ. Int. 28 (8), 743-749.
28. **Badino, G., Marchionni, B., 1972.** *Neurosecretion and gonad maturation in a population of *Donax trunculus* L. from Leghorn (Italy).* Bull. Zool. 39, 321-326.
29. **Baldwin, I.G., Kramer, K.J.M., 1994.** *Biological early warning systems, in: Kramer (Ed.), Biomonitoring of coastal waters and estuaries.* CRC Press, Boca Raton, pp. 1-23.
30. **Banni, M., Jebali, J., Daubeze, M., Clerendeau, 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, 105–116.

31. **Banni, M., Bouraoui, Z., Ghedira, J., Clerendeau, C., Guerbej, H., Narbonne, J.F., Boussetta, H., 2009.** *Acute effects of benzo[a]pyrene on liver phase I and II enzymes, and DNA damage on seabream Sparus aurata.* Fish.Physiol.Biochem., 35, 293-299.
32. **Barnes, R.S.K., Calow, P., Olive, P.J.W., Golding, D.W., 1988.** *The Invertebrates. A New Synthesis.* Blackwell Science, Oxford.
33. **Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq, J., 1998.** *Concentrations of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level.* Mar. Pollut. Bull. 36, 951-960.
34. **Bayed, A., 1998.** *Variabilité de la croissance de Donax trunculus sur le littoral marocain.* CIHEAM - Options Méditerranéennes. 23pp.
35. **Bayed, A., 1990.** *Reproduction de Donax trunculus sur la côte Atlantique marocaine.* Cah. Biol. Mar. 31, 159–170.
36. **Bebianno, M.J., Serafim, M.A., 1998.** *Comparaison of the metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve Molluscs Mytilus galloprovincialis and Ruditapes decussatus.* Sci. Total. Environ. 214, 223-231.
37. **Beldi, H., Gilbert, H., Maas, S., Scheifler, R., Soltani, N., 2006.** *Seasonal variations of Cd, Cu, Pb and Zn in the edible mollusc Donax trunculus (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba, Algeria.* Afr. J. Agric. Res. 1 (4), 85-90.
38. **Bellomo, G., Richelmi, P., Mirabelli, F., Marinoni, V., Abbagnano, A., 1985.** *Inhibition of liver microsomal calcium ion sequestration by oxidative stress: role of protein and sulphhydryl groups.* In: Poli, G., Cheeseman, K.H., Dianzani, M.U., Slater, T.F., (Eds.), Free Radicals in Liver Injury. IRL Press, Oxford, p. 139.
39. **Ben Charrada, R., Moussa, M., 1997.** *Modélisation hydrodynamique et écologique des eaux côtières du Golfe de Tunis.* La Houille Blanche 6, 66–78.

40. **Ben Hamza Ch., 1994.** *Bilan hydrologique, sédimentologique et géochimique d'un bassin versant en zone semi-aride: La Mejerda (Tunisie du Nord). Impact sur l'environnement.* Thèse doctorat Es Sc., Univ. P. M. Curie, Paris VI, 283 p.

41. **Ben Kheder- Dhaoui, R., 2001.** *Contribution à l'étude éco-biologique de *Donax trunculus*, (Linnaeus, 1758), mollusques bivalves dans le Golfe de Tunis.* Diplôme d'Etudes Approfondies en Ecologie Générale, Faculté des sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, 126 pp.

42. **Ben Kheder- Dhaoui, R., Aloui-Bejaoui, N., Le Pennec, M., 2003.** *Cycle sexuel de *Donax trunculus* (mollusque bivalve) du Golfe de Tunis.* Bull. Sco. Zool. Fr. 128 (1-2) : 9-20.

43. **Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002.** *Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment.* Environ.Toxicol.Chem. 21, 1316–1322.

44. **Ben Lamine, Y., 2005.** *Contribution de communautés méso-zooplanktoniques de la partie Sud Ouest de la Baie de Tunis subissant les apports de l'oued Méliane.* Mémoire de Master en Biologie Intégrative des Ecosystèmes Littoraux, Faculté des Sciences de Tunis, 122 p.

45. **Ben Mammou, A., 1998.** *Barrages Nebeur, Sidi Salem, Sidi Saad et Sidi Boubaker. Quantification, étude sédimentologique et géotechnique des sédiments piégés. Apports des images satellitaires.* Thèse de Doctorat Es Sc Géologie, Université de Tunis II, Faculté des Sciences de Tunis, 345 p.

46. **Ben Mustapha, K., Hattour, A., Mhetli, M., El Abed, A., Tritar. B., 1999.** *Bionomie des étages infra et circalittoral du golfe de Gabès.* Bull. Inst. Natl. Sci. Tech. Mer (Tunisie), 26: 5-48.

47. **Beninger, P.G., 1984.** *Seasonal variations of the major lipid classes in relation to the reproductive activity of two species of clams raised in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys, 1863) and *T. philippinarum* (Adams & Reeve, 1850).* J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 79, 79–90.

48. **Bergayou, H., Mouneyrac, C., Pellerin, J., Moukrim, A., 2009.** *Oxidative stress responses in bivalves (*Scrobicularia plana*, *Cerastoderma edule*) from the Oued Souss estuary (Morocco).* Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 765–769.

49. **Berthet, B., 2008.** *Les espèces sentinelles*. In Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, Amiard & Amiard-Triquet, Eds., Lavoisier TEC & Doc, Paris, 121- 148.
50. **Beyer, J., Sandvik, M., Hylland, K., Fjeld, E., Egaas, E., Aas, E., Skare, J.U., Goksoyr, A., 1996.** *Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (Platichthys flesus L.) and Atlantic cod (Gadus morhua L.) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway*. *Aquat. Toxicol*, 36, 75-98.
51. **Bhattacharya, C.G., 1967.** *A simple method of resolution of a distribution into gaussian components*. *Biometrics* 23, 115–135.
52. **Billoir, E, Péry, A.R.R, Charles S., 2007.** *Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of Daphnia magna: a combination of the DEBtox and matrix population models*. *Ecol. Modell.* 203 (3-4): 204–214
53. **Binelli, A., Bacchetta, R., Vailati, G., Galassi, S., Provini, A., 2001.** *DDT contamination in Lake Maggiore (N. Italy) and effects on zebra mussel spawning*. *Chemosphere* 45, 409–415
54. **Björk, M., 1995.** *Bioavailability and uptake of hydrophobic organic contaminants in bivalve filter-feeders*. *Annales Zoologici Fennici* 32, 237-245.
55. **Bocquené, G., Galgani, F., Truquet, P., 1990.** *Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring*. *Mar. Environ. Res.* 30, 75–89.
56. **Bocquené, G., Galgani, F., Walker, C.H., 1997.** *Les cholinestérases, biomarqueurs de neurotoxicité*. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie: Aspects fondamentaux*. Masson, Paris, pp. 209–240.
57. **Bodoy, A., Masse. H., 1979.** *Quelques paramètres permettant de suivre la production organique d'un mollusque bivalve au cours d'un cycle saisonnier*. *Publ. Sci. Tech. CNEXO: Actes de colloque n° 7: 753-766*.
58. **Boldina-Cosqueric, I., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Dedourge-Geffard, O., Métais, I., Mouneyrac, C., Moutel, B., Berthet, B., 2010.** *Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve Scrobicularia plana as tools for the assessment of estuarine sediment quality*. *Ecotox. Environ. Safe.* 73, 1733-1741.

59. **Bolognesi, C., Rabboni, R., Roggieri, P., 1996.** *Genotoxicity Biomarkers in M. galloprovincialis as indicators of marine pollutant.* Comp. Biochem. Physiol. 113C, 2. 319-323.
60. **Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P., Fabbri, R., Viarengo, A., 1999.** *Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies.* Environ. Mol. Mutagen. 33, 287–292.
61. **Bordajandi, L.R., Martin, I., Abad, E., Rivera, J., Gonzalez, M.J., 2006.** *Organochlorine compounds (PCBs, PCDDs and PCDFs) in seafish and seafood from the Spanish Atlantic Southwest Coast.* Chemosphere 64, 1450–1457.
62. **Borgmann, U., Norwood, W.P., Reynoldson, T.B., Rosa, F., 2001.** *Identifying cause in sediment assessments: bioavailability and the sediment quality triad.* Can. J. Fish. Aquat. Sci. 58, 950-960.
63. **Boscolo, R., Cornello, M., Giovanardi, O., 2003.** *Condition index and air survival time to compare three kinds of Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve) farming systems.* Aquacult. Internat. 11, 369-374.
64. **Boussoufa, D., Masmoudi, W.M., Ghazali, N., Dridi, M.S., Romdhane, M.S., El Cafsi., 2007.** *Utilisation d'un mollusque bivalve : donax trunculus (linne, 1758) comme indicateur de la qualité des eaux littorales dans le Golfe de Tunis.* Rapp. Comm. int. Mer Medit.38. http://www.ciesm.org/online/archives/abstracts/pdf/38/Pg_00239.pdf
65. **Bradford, M., 1976.** *Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein–dye binding.* Anal. Biochem. 72, 248–254.
66. **Broeg, K., Zander, S., Diamant, A., Körting, W., Krüner, G., Paperna, I., Westernhagen, H., 1999.** *The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring I. Red Sea and Mediterranean Sea.* Helgol. Mar. Res. 53, 195-208.
67. **Broeg, K., Koehler, A., Westernhagen, H.von., 2002.** *Disorder and recovery of environmental health monitored by means of lysosomal stability in liver of European flounder (*Platichthys flesus* L.).* Mar. Environ. Res. 54, 569-573.

68. **Broeg, K., Westernhagen, H.V., Zander, S., Körting, W., Köhler, A., 2003.** *The “Bioeffect Assessment Index” (BAI) as a promising tool for the estimation of German Bight and Baltic Sea environmental quality?* ICES CM 2003/M: 14.
69. **Broeg, K., Westernhagen, H.V., Zander, S., Körting, W., Köhler, A., 2005.** *The “bioeffect assessment index” (BAI). A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach.* Mar. Pollut. Bull. 50 (5), 495–503.
70. **Broeg, K., Lehtonen, K.K., 2006.** *Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: integrated assessment of a multi-biomarker approach.* Mar. Pollut. Bull. 53 (8–9), 508–522.
71. **Brooks, S., Harman, C., Zaldibar, B., Izagirre, U., Glette, T., Marigomez, I., 2011.** *Integrated biomarker assessment of the effects exerted by treated produced water from an onshore natural gas processing plant in the North Sea on the mussel *Mytilus edulis*.* Mar. Pollut. Bull. 62, 327–339
72. **Buchberger, W.W., 2011.** *Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment.* J. Chromatogr. A. 1218, 603–618
73. **Buffet, P.E., Fossi Tankoua, O., Pan, J.F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Bérard, J.B., Risso, C., Guibbolini, M., Roméo, M., Reip, P., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2011.** *Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles.* Chemosphere 84, 166-174.
74. **Burlando, B., Marchi, B., Panfoli, I., Viarengo, A., 2002.** *Essential role of Ca^{2+} dependent phospholipase A2 in estradiol-induced lysosome activation.* Am. J. Physiol. Cell Physiol. 283C, 1461-1468.
75. **Cairns, J., 1992.** *The threshold problem in ecotoxicology.* Ecotoxicology 1, 3-16.
76. **Cajaraville, M.P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000.** *The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach.* Sci. Tot. Environ. 247(2-3): 295-311.

77. **Calow, P., 1991.** *Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications.* Comp. Biochem. Physiol. C 100, 3–6.
78. **Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2006.** *Biochemical and physiological biomarkers in Prochilodus lineatus submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil.* Environ. Toxicol. Pharmacol. 21, 61–69.
79. **Canova, S., Degan, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R., Voltan, R., Venier, P., 1998.** *Tissue dose, DNA adducts, oxydative DNA damage and CYP1A-immunopostive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene.* Mutat. Res. 399, 17-33.
80. **Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C., Gallo, G., 2004.** *Environmental estrogens can affect the function of mussel hemocytes through rapid modulation of kinase pathways.* Gen. Comp. Endocrinol. 138, 58-69.
81. **Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G., 2011.** *Bivalve molluscs as an unique target group for nanoparticle toxicity.* Mar. Environ. Res. 1-6. In Press.
82. **Carafoli, E., 1987.** *Intracellular calcium homeostasis.* Annu Rev.Biochem., 56, 395-433.
83. **Carafoli, E., 1991.** *Calcium pump of the plasma membrane.* Physiol. Rev., 71, 129-153
84. **Carafoli, E., 1994.** *Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme.* FASEB J., 8 (13), 993-1002.
85. **Carr, R.S., Neff, J.M., 1984.** *Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen.* Comp. Biochem. Physiol. B 77, 447–449.
86. **Castonguay, M., Cyr, D.G., 1998.** *Effects of temperature on spontaneous and thyroxine-stimulated locomotor activity of Atlantic cod.* J Fish Biol 53: 303-315.
87. **CCE, 2001.** *Community Strategy for Endocrine Disrupters-A Range of Substances Suspected of Interfering With the Hormone Systems of Humans and Wildlife.* COM 262. Bruxelles. 46pp.

88. **Chainho, P., Costa, J.L., Chaves, M.L., Dauer, D.M., Costa, M.J., 2007.** *Influence of seasonal variability in benthic invertebrate community structure on the use of biotic indices to assess the ecological status of a Portuguese estuary.* Mar. Pollut. Bull. 54, 1586–1597.
89. **Chase, M.E., Jones, S.H., Hennigar, P. J., Sowles, G.C.H., Harding, K., Freeman, P.G., Wells, C., Krahforst, K., Coombs, R., Crawford, J., Pederson, and D. Taylor. 2001.** *Gulfwatch: monitoring spatial and temporal patterns of trace metal and organic contaminants in the Gulf of Maine (1991-1997) with the blue mussel, Mytilus edulis L.* Mar. Pollut. Bull. 42, 491-505.
90. **Chatonnet, A., Lockridge, O., 1989.** *Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase.* Biochem. J., 260,625-634.
91. **Cheggour, M., Chafik, A., Fisher, N.S., Benbrahim, S., 2005.** *Metal concentrations in sediments and clams in four Moroccan estuaries.* Mar. Environ. Res. 59, 119–137.
92. **Center for Coastal Monitoring and Assessment (CCMA),, 2011.** <http://ccma.nos.noaa.gov/>.
93. **Chèvre, N., Gagne, F., Blaise, C., 2003.** *Development of a biomarker-based index for assessing the ecotoxic potential of aquatic sites.* Biomarkers 8, 287–298.
94. **Chouba, L., 2009.** Bioaccumulation et tendance temporelle des métaux traces (Cd, Pb, Hg) dans les sédiments et chez les mollusques bioindicateurs de la qualité du littoral tunisien. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Aronomique de Tunis, Université de Carthage, Tunisia, 200 pp.
95. **Cloern, D. J., 2001.** *Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem.* Mar. Ecol. Prog. Ser. 210, 223-253.
96. **Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Vasseur, P., 1997.** *Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques.* In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie: Aspects fondamentaux.* Masson, Paris, pp. 149–163.
97. **Costanza, R., D'arge, R., De Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'neill, R.V., Paruelo, J., Raskin, R. G., Sutton, P., Van**

- den belt, M., 1997.** *The value of the world's ecosystem services and natural capital.* Nature 387, 253-260.
98. **Cravo, A., Pereira, C., Gomes, T., Cardoso, C., Serafim, A., Almeida, C., Rocha, T., Lopes, B., Company, R., Medeiros, A., Norberto, R., Pereira, R., Araújo, O., Bebianno, M.J., 2011.** *A multibiomarker approach in the clam *Ruditapes decussatus* to assess the impact of pollution in the Ria Formosa lagoon, South Coast of Portugal.* Mar. Environ. Res. , doi:10.1016/j.marenvres.2011.09.012
99. **Crosby, M.P., Gale, L.D., 1990.** *A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method.* J. Shellfish. Res. 91, 233-237.
100. **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.
101. **Dailianis, S., Domouhtsidou, G.P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2003.** *Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring.* Mar. Environ. Res. 56, 443–470.
102. **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.
103. **Davison, W., Zhang, H., 1994.** *In situ* speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. Nature 367, 546-548.
104. **Dayton, P., Curran, S., Kitchingman, A., Wilson, M., Catenazzi, A., Restrepo, J., Birkeland, C., Blaber, S., Saifullah, S., Branch, G. et al., 2005.** *Coastal Systems*, In: Hassan, Scholes, Ash (Eds.), *Ecosystems and Human Well-being: Current State and Trends*, Volume 1. Island Press, Washington, DC, pp. 513-549.
105. **De Coen, W.M., Janssen, C.R., 2003.** *The missing biomarker link: relationship between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics.* Environ. Toxicol. Chem. 22, 1632–1641.

106. **De Kock, W.C., Kramer, K.J.M, 1994.** In: K.J.M. Kramer (Ed.), *Biomonitoring of coastal waters and estuaries* Boca Raton: CRC, pp.51–78.
107. **De la Huz, R., Lastra, M., López, J., 2002 .***The influence of sediment grain size on burrowing, growth and metabolism of Donax trunculus L. (Bivalvia: Donacidae).* J. Sea. Res. 47, 85–95.
108. **De La Tore, F ., Ferrari, L., Salibian, A., 2002.** *Freshwater pollution biomarker : response of brain acetylcholinesterase activity in two fish Species.* Comp. Biochem. Physiol. C 131, 271-280.
109. **De Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M., 2000.** *Biomarkers in zebra mussels (Dreissena polymorpha) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada).* Aquat. Toxicol 50, 51-71.
110. **Delgado, M., Pérez-Camacho, A., 2005.** *Histological study of the gonadal development of Ruditapes decussatus (L.) (Mollusca: Bivalvia) and its relationship with available food.* Sci. Mar. 69, 87–97.
111. **De Luca-Abbott, S.B., Richardson, B.J., McClellan, K.E., Zheng, G.J., Martin, M., Lam, P.K., 2005.** *Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (Perna viridis) and clams (Ruditapes philippinarum) transplanted in Hong Kong coastal waters.* Mar. Pollut. Bull. 51, 694–707.
112. **Dellali, M., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Aissa, P., 2001.** *The use of acetylcholinesterase activity in Ruditapes decussatus and Mytilus galloprovincialis in the biomonitoring of Bizerta lagoon.* Comp. Biochem. Phys., Part C 130, 227–235.
113. **Dellali, M., Romeo, M., Gnassia-Barelli, M., Aissa, P., 2004.** *A multivariate data analysis of the clam Ruditapes decussatus as sentinel organism of the Bizerta lagoon (Tunisia).* Water Air Soil Poll. 156, 131-144.
114. **Depledge, W.H., Fossi, M.C., 1994.** *The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates.* Ecotoxicology 3, 161-172.

115. **Depledge, M.H., 1999.** *Recovery of ecosystems and their components following exposure to pollution.* J. Aquat. Ecosyst. Stress and Recovery 6, 199–206.
116. **Deval, M.C., 2009.** *Growth and reproduction of the wedge clam (Donax trunculus) in the Sea of Marmara, Turkey.* J. Appl. Ichthyol. 25 (5), 551–558.
117. **Dhaoui-Ben Khedher, R., Aloui-Bejaoui, N., Le Pennec, M., 2003.** *Cycle sexuel de Donax trunculus (mollusque bivalve) dans le Golfe de Tunis.* Bull.Soc.Zoo.fr. 128 (1-2): 9-20.
118. **Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M., Guilhermino, L., 2001.** *Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with Daphnia magna Straus.* Chemosphere 45, 553–560.
119. **Dimitriadis, V.K., & Koukouzika, N., 2003.** *Effect of sampling procedures, transportation stress and laboratory maintenance on the structure and function of the digestive gland epithelium of the mussel Mytilus galloprovincialis.* Mar. Biol., 142, 915-924.
120. **Dondero, F., Dagnino, A., Jonsson, H., Capri, F., Gastaldi, L., Viarengo, A., 2006.** *Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (Mytilus edulis) using a combined biomarker/gene expression approach.* Aquat. Toxicol., 78, 13-24.
121. **Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M., Vasseur, P., 1997.** *Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve Unio tumidus.* Aquat. Toxicol. 39, 93–110.
122. **Drif, F., and Abdennour, C., 2010.** *Trace Metals in the Mussel Donax trunculus Linnaeus 1758 from Urban and Industrial Contaminated Locations.* J. Appl. Sci. Res, 6(12), 2063-2067.
123. **Ducrottoy, J. P., 2010.** *La restauration écologique des estuaires.* Editions TEC & DOC, Lavoisier, Paris, France.
124. **Duquesne, S., Liess, M., Bird, D.J., 2004.** *Sub-lethal effects of metal exposure: physiological and behavioural responses of the estuarine bivalve Macoma balthica.* Mar. Environ. Res. 58, 245–250.
125. **Durou, C., 2006.** *Recherche d'indicateurs de l'état physiologique de l'annélide polychète endogée Nereis diversicolor en relation avec la qualité du milieu.* Thèse de Doctorat en Ecotoxicologie, Université de Nantes. 201 pages.

126. **Eggleton, J., Thomas, K.V., 2004.** *A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events.* Environ. Int. 30, 973–980.
127. **Einsporn, S., Broeg, K., Koehler, A., 2005.** *The Elbe flood 2002-toxic effects of transported contaminants in flatfish and mussel of the Wadden Sea.* Mar. Pollut. Bull. 50, 423–429.
128. **Ekholm, M., 2001.** *Predicting relative binding free energies of substrate and inhibitors of acetylcholin- and butyrylcholinesterases.* J. Mol. Struct. 572, 25–34.
129. **El Arrim, A., 1996.** *Etude de l'impact de la dynamique sédimentaire et des changements de stabilité du littoral du Golfe de Tunis.* Thèse de Doctorat en géologie, Faculté des Sciences de Tunis, 208 pp.
130. **Eljarrat, E., Caixach, J., Rivera, J., 2001.** *Evaluation of dioxin contamination in sewage sludge discharges on coastal sediments from Catalonia, Spain.* Wat. Res. 35, 2799–2803.
131. **El Hamidi, F., 2003.** *Etude de Donax trunculus comme espèce sentinelle pour l'évaluation de l'état de santé des plages sableuses de la baie d'Agadir.* Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences Agadir, Université Ibn Zohr, 202 pp.
132. **Elliott, M., Mclusky, D. S., 2002.** *The Need for Definitions in Understanding.* Environ. Toxicol. Chem. 20, 37–45.
133. **Elliott, M., Hemingway, K., 2002.** *Fishes in Estuaries.* Blackwell, London, 656pp.
134. **Ellman, G.L., Courtneyk, D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961.** *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.* Biochem. Pharmacol. 7, 88–95.
135. **Ennouri, R., Chouba, L., Magni, P., Kraiem, M.M., 2010.** *Spatial distribution of trace metals (Cd, Pb, Hg, Cu, Zn, Fe and Mn) and oligo-elements (Mg, Ca, Na and K) in surface sediments of the Gulf of Tunis (Northern Tunisia).* Environ. Monit. Assess. 163, 229–239.
136. **Enzenros, L., Enzenros, R., 2001.** *Untersuchungen uber das, Vorkommen mariner Mollusken in Tunesischen Gewasser Shriften sur malakozoologie.* Cismar 17, 45-62.
137. **Ermak, G., Davies, K.J., 2001.** *Calcium and oxidative stress: from cell signalling to cell death.* Mol. Immunol. 38, 713-721.

138. **Etchian, O.A., Pellerin, J., Audet, C., Mathieu, M., 2004.** *Sexual maturation and related changes in aspartate transcarbamylase activity of gonad tissues in the soft shell clam (*Mya arenaria*)*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 139, 287–297.
139. **Fairbridge, R. W., 1980.** *The estuary: its definition and geochemical role*. In *Chemistry and geochemistry of estuaries* (ed. E. Olausson and I. Cato), John Wiley, New-York. pp. 1-35.
140. **FAO, 1987.** *Fiches d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire*. Edition, FAO, Rome.
141. **FAO, 2010.** *Statistiques FAO*. <http://faostat.fao.org/>
142. **Fernley, P.W., Moore, M.N., Lowe, D.M., Donkin, P., Evans, S., 2000.** *Impact of the Sea Empress oil spill on lysosomal stability in mussel blood cells*. *Mar. Environ. Res.* 50, 451–455.
143. **Ferreira, A., Dolder, H., 2003.** *Cytochemical study of spermiogenesis and mature spermatozoa in the lizard *Tropidurus itambere* (Reptilia, Squamata)*. *Acta Histochem.* 105, 339–352.
144. **Fishelson, L., Bressler, V., Manelis, R., Zuk-Rimon, Z., Dotan, A., Yawetz, A., 1999.** *Toxicological aspects associated with the ecology of *Donax trunculus* (Bivalvia, Mollusca) in polluted environment*. *Sci. Total Environ.* 226, 121–131.
145. **Fitzpatrick, P.J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh, A.R., 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.
146. **Flammarion, P., Migeon, B., Garric, J., 1996.** *Joint effects of copper sulphate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE activities*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56, 3, 440-445.
147. **Forbes, V.E., Forbes, T.L., 1997.** *Ecotoxicologie, théorie et applications*. INRA Editions, Versailles, 256 p.
148. **Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006.** *The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 272-280.

149. **Fossi-Tankoua, O., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B., Mouneyrac, C., Rainbow P.S., 2010.** *Towards a comprehensive methodology for assessing the health status of coastal and estuarine ecosystems.* International Council for the Exploration of the Sea, Nantes, pp. 1-20. <http://www.ices.dk/products/CMdocs/CM-2010/F/F1510.pdf>
150. **Fossi-Tankoua, O., Buffet, P.E., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Mouneyrac C., Berthet, B., 2011.** *Potential influence of confounding factors (size, salinity) on biomarker tools in the sentinel species Scrobicularia plana used in monitoring programmes of estuarine quality.* *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 1253-1263.
151. **Frankignoulle, M., Abril, G., Borges, A., Bourge, I., Canon, C., Delille, B., Libert, E., Théate, J.-M., 1998.** *Carbon Dioxide Emission from European Estuaries.* *Science* 282, 434-436.
152. **Frasco, M., Guilhermino, L., 2002.** *Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of Poecilia reticulata.* *Fish. Physiol. Biochem.* 26, 149–156.
153. **Frings, C.S., Fendley, T.W., Dunn, R.T., Queen, C.A., 1972.** *Improved determination of total serum lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction.* *Clin. Chem.* 18, 673–674.
154. **Fulton, M. H., 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.
155. **Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Gauthier-Clerc, S., 2002.** *Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam Mya arenaria at contaminated sites in the Saguenay Fjord.* *Mar. Environ. Res.* 53, 295-310.
156. **Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Pelletier, E., Douville, M., Gauthier-Clerc, S., Viglino, L., 2003.** *Sex alteration in soft-shell clams (Mya arenaria) in an intertidal zone of the Saint Lawrence River (Quebec, Canada).* *Comp. Biochem. Physiol C* 134, 189-198.
157. **Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Pelletier, E., Strand, J., 2005.** *Health status of Mya arenaria bivalves collected from contaminated sites in Canada (Saguenay Fjord) and Denmark (Odense Fjord) during their reproductive period.* *Ecotox. Environ. Safe.* 64, 348–61.

158. **Gagné, F., Burgeot, Thierry., Hellou, J., St Jean, S., Farcy, E., Blaise, C., 2008.** *Spatial variations in biomarkers of Mytilus edulis mussels at four polluted regions spanning the Northern Hemisphere.* Environ. Res. 107(2), 201-217.
159. **Galgani, F., Bocquené, G., 1989.** *A method for routine detection of organophosphates and carbamates in sea water.* Environ. Technol. Lett. 10, 311-322.
160. **Galgani, F., Bocquené, G., 1991.** *Semi-automated colorimetric and enzymatic assays for aquatic organisms using microplate readers.* Water. Res. 25, 147-150.
161. **Gallagher, E.P., Sheehy, K.M., Lame, M.W., Segall, H.J., 2000.** *In vitro kinetics of hepatic glutathione S-transferase conjugation in largemouth bass and brown bullheads.* Environ. Toxicol. Chem. 19, 319-326.
162. **Galloway, T., Sanger, R.C., Smith, K.L., Fillmann, G., Readman, J.W., Ford, T.E., Depledge, M.H., 2002.** *Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays.* Environ. Sci. Technol. 36, 2219-2226.
163. **Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Depledge, M.H., Jones, M.B., 2006.** *The ECOMAN project: A novel approach to defining sustainable ecosystem function.* Mar. Pollut. Bull. Recent Developments in Estuarine Ecology and Management, 53, 186-194.
164. **Gandhi, C.R., Ross, D.H., 1988.** *Characterization of a high affinity Mg²⁺-independent Ca²⁺-ATPase from rat brain synaptosomal membranes.* J. Neurochem., 50(1), 248-256.
165. **Garmendia, L., Soto, M., Vicario, U., Kim, Y., Cajaraville, M.P., Marigomez, I., 2011.** *Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and Bay of Biscay: Tissue-level biomarkers and histopathology.* J. Environ. Monitor. 13, 933-942.
166. **Gaspar, M.B., Monteiro, C.C., 1998.** *Reproductive cycles of the razor clam Ensis siliqua and the clam Venus striatula off Vilamoura, southern Portugal.* J. Mar. Biol. Ass. UK. 78, 1247-1258.
167. **Gaspar, M.B., Ferreira, R., Monteiro, C.C., 1999.** *Growth and reproductive cycle of Donax trunculus L., (Mollusca: Bivalvia) off Faro, southern Portugal.* Fish. Res. 41, 309-316.
168. **Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Blaise, C., Gagné, F., 2002.** *Delayed gametogenesis of Mya arenaria in the Saguenay fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors?* Comp. Biochem. Physiol. C 131, 457-467.

169. **Gayanilo, F.C.J., Pauly, D., 2005.** *The FAO-ICLARM Stock Assessment Tools (FISAT II) Reference Manual*, eighth ed. FAO (Food and Agricultural organisation) Computerized Information Series (Fisheries), Rome.
170. **Gerhardt, A., Schmidt, S., 2002.** *The multispecies freshwater biomonitor a potential new tool for sediment biotests and biomonitoring.* Journal of Soils and Sediments 2, 67-70.
171. **Ghazali, N., 2005.** *Contribution à l'étude écologique et biologique d'un mollusque bivalve : Donax trunculus (L. 1758) du Golfe de Tunis.* Mémoire de D.E.A, Faculté des Sciences de Tunis. 80p
172. **Gibbs, P. E., Pascoe, P. L., Bryan, G. W., 1991.** *Tributyltininduced imposex in stenoglossan gastropods: pathological effects on the female reproductive system.* Comp. Biochem. Physiol. C. 100, 231-235
173. **Gibbs, P.E., Bryan, G.W., 1986.** *Reproductive failure in populations of the dogwhelk *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from anti-fouling paints.* J. Mar. Biol. Ass. U.K. 66, 767-777.
174. **Goksøyr, A., Beyer, J., Egaas, E., Grosvik, B.E., Hylland, K., Sandvik, M., Skaare, J.U., 1996.** *Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring.* Mar. Pollut. Bull. 33, 36-45.
175. **Gómez-Gutiérrez A., Garnacho E., Bayona J.M., Albaigés J., 2007.** *Screening ecological risk assessment of persistent organic pollutants in Mediterranean sea sediments.* Environ. Int. 33, 867-876.
176. **Gourlay-Francé, C., Delmas, F., Mazzella, N., Tusseau-Vuillemin, M.H., 2010.** *Que sait-on de la biodisponibilité des contaminants dissous dans le milieu aquatique ?* Sciences Eaux & Territoires 01, 6-11.
177. **Grall, J., Glemarec, M., 2003.** *L'indice d'évaluation de l'endofaune côtière.* In: Alzieu, C., (Ed.), Bioévaluation de la qualité environnementale des sédiments portuaires et des zones d'immersion. Edition Ifremer, pp. 51-85.

178. **Gubbins, M.J., Moore, J., Fryer, R., Davies, I.M., 2010.** *Long time series data showing recent recovery of gastropod populations from effects of tri-butyl tin at the Shetland oil terminal.* ICES Annual Science Conference <<http://www.ices.dk>>.
179. **Guilhermino, L., Barros, L., Silva, M.C., Soares, A.M.V.M., 1998.** *Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned?* *Biomarkers*. 3, 157–163.
180. **Guillou, J. & Le Moal, Y., 1980.** *Aspects de la dynamique des populations de Donax trunculus et D. vittatus en baie de Douarnenez.* *Annal, Inst. océanogr.*, Paris, 5:6 5 5-64.
181. **Guillou, J., Bayed, A., 1991.** *Contraintes du milieu sur les populations de Donax trunculus L. et Donax venustus Poli du littoral atlantique marocain.* *Oceanol. Acta* 14 (3), 291–298.
182. **Guerlet, E., Ledy, K., Meyer, A., Giamberini, L., 2007.** *Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussels: a 2-year integrative field study of seasonal and pollution-induced variations.* *Aquat. Toxicol.* 81, 377-388.
183. **Gurlet, E., 2007.** *Utilisation de biomarqueurs cellulaires chez plusieurs espèces d'invertébrés pour l'évaluation de la contamination des milieux dulçaquicoles.* Thèse de Doctorat en Ecotoxicité et Biodiversité. Université Paul Verlaine, Metz. 317 pp.
184. **Guerlet, E., Vasseur, P., Giambérini, L., 2010.** *Spatial and temporal variations of biological responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel.* *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1170–2118.
185. **Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974.** *Glutathione S-transferases, the first step in mercapturic acid formation.* *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
186. **Heugens, E.H.W., Jan Hendricks, A., Dekker, T., Van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2001.** *A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainly factors for use in risk assessment.* *Crit. Rev. Toxicol.* 31, 247–284.

187. **Hagger, J.A., Jones, M.B., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T.S., 2006.** *Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers?* Int. Environ. Assess. Manag. 2: 312–329.
188. **Hagger, J.A., Jones, M.B., Lowe, D., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T.S., 2008.** *Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: a case study.* Mar. Pollut. Bull. 56, 1111–1118.
189. **Hamer, D.H., 1986.** *Metallothionein.* Annu. Rev. Biochem., 55, 913-951.
190. **Hamrouni, M., 2006.** *Biosurveillance de Donax trunculus dans le Golfe de Tunis.* Mémoire de Master en Biologie Intégrative des Ecosystèmes littoraux. Faculté des Sciences de Tunis, Université Tunis El Manar, 108 pp.
191. **Hamza-Chaffai, A., Pellerin, J., Amiard, J.C., 2003.** *Health assessment of a marine bivalves Ruditapes decussates from the Gulf of Gabés (Tunisia).* Environ. Int, 28, 609-617.
192. **Heddl, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P., MacGregor, J.T., 1991.** *Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future.* Environ. Mol. Mutagen. 18 (4), 277–291.
193. **Hoarau, P., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Girard, J.P., 2001.** *Differential induction of glutathione S-transferases in the clam Ruditapes decussatus exposed to organic compounds.* Environ. Toxicol. Chem. 20, 523–529.
194. **Hoarau, P., Damiens, G., Roméo, M., Gnassia-Barelli, M., Bebianno, M.J., 2006.** *Cloning and expression of a GST-pi gene in Mytilus galloprovincialis. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution.* Comp. Biochem. Phys. Part C 143, 196–203.
195. **Holloway, G.J., Sibly, R.M., Povey, S.R., 1990.** *Evolution in toxin-stressed environments.* Func. Ecol. 4, 289-294
196. **Huckins, J.N., Tubergen, M.W., Manuweera, G.K., 1990.** *Semi-Permeable Membrane Devices containing model lipid: a new approach to monitoring the*

- bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential*. Chemosphere 20, 533-552.
197. **Huet, M., Le Goïc, N., Koken, M., 2009.** *Intensité de l'imposex chez Nucella lapillus le long des côtes de la manche et de l'atlantique en 2009*. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Paris, Nantes. http://envlit.ifremer.fr/content/download/80707/550777/version/2/file/ImposexRapportFinal_2009.pdf
198. **Humanson, G.L., 1979.** *Animal Tissue Techniques*, fourth ed. W.H. Freeman, San Francisco.
199. **INSTM, 2005.** *Rapport national du projet ESSREB*. INSTM, Tunisie.
200. **Izagirre, U., Marigomez, I., 2009.** *Lysosomal enlargement and lysosomal membrane destabilisation in mussel digestive cells measured by an integrative index*. Environ. Pollut. 157, 1544–1553.
201. **Jacquet, S., 2000.** *Dynamique des populations planctoniques marines*. Thèse de Doctorat en Océanologie biologique et environnement marin. Université Paris VII. 309 p.
202. **Jager, T., Klok, C., 2010.** *Extrapolating toxic effects on individuals to the population level: the role of dynamic energy budgets*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 365, 3531-3540.
203. **Jebali, J., 2006.** *Etude de la toxicité moléculaire et sub-cellulaire des polluants environnementaux sur un modèle biologique marin*. Thèse de Doctorat. Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, Université de Monastir. Tunisie.
204. **Jebali, J., Banni, M., Alves de Almeida, E., Boussetta, H., 2007.** *Oxidative DNA damage levels clams *Ruditapes decussatus* as pollution biomarkers of Tunisian marine environment*. Environ. Monit. Ass., 124, 195-200.
205. **Jebali, J., Banni, M., Guerbej, H., Almeida, E.A., Bannaoui, A., Boussetta, H., 2006.** *Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli**. Fish.Physiol.Biochem. 32, 93-98.

206. **Kägi, J.H.R., 1991.** *Overview of metallothionein.* Methods Enzymol. 205, 613-626.
207. **Kaiser J., 2001.** *Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment*, illustrated edition ed. Taylor and Francis Inc. 240 pages.
208. **Kalman, J., Buffet, P.E., Amiard, J.C., Denis, F., Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C., 2010.** *Assessment of the influence of confounding factors (weight, salinity) on the response of biomarkers in the estuarine polychaete Nereis diversicolor.* Biomarkers 15, 461-469.
209. **Kennish, M.J., 1999.** *Estuary Restoration and Maintenance: The National Estuary Program.* Taylor & Francis, Inc. CRC Press. 376 pages.
210. **Ketata, I., Denier, X., Hamza-Chaffai, A., Minier., C., 2008.** *Endocrine-related reproductive effects in molluscs.* Comp. Bioch. Phys. C 147, 261–270.
211. **Kikugawa, K., Kato, T., Beppu, M., Hayasaka, A., 1989.** *Fluorescent and crosslinked proteins formed by free radical and aldehyde species generated during lipid oxidation.* Adv. Exp. Med. Biol. 266, 345-357.
212. **Klerks, P.L., Weis, J.S., 1987.** *Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review.* Environ. Pollut 45, 173-205.
213. **Knight, J.A., Pieper, R.K., McClellan, L., 1988.** *Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation.* Clin. Chem. 34, 2433–2438.
214. **Koehler, A., 1991.** *Lysosomal perturbations in fish liver as indicator for toxic effects of environmental pollution.* Comp. Biochem. Physiol. 100C, 123-127.
215. **Koehler, A., 2004.** *Toxic injury and gender-specific hepatocellular carcinogenesis in flounder (Platichthys flesus (L.)).* Aquat. Toxicol. 70, 257-276.
216. **Koehler, A., Soeffker, K., Wahl, E., 2002.** *Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarker of toxic injury in a marine flatfish Platichthys flesus (L.).* Environ. Toxicol. Chem. 21, 2434–2444.

217. **Köhler, A., Deisemann, H., Lauritzen, B., 1992.** *Histological and cytochemical indices of toxic injury in the liver of dab *Limanda limanda**. Mar. Ecol.Prog. Ser. 91, 141-153.
218. **Kooijman, S.A.L.M., 1986.** *Energy budgets can explain body size relations*. J. Theor. Biol. 121, 269-282.
219. **Kooijman S.A.L.M., Baas J., Bontje D., Broerse M., Van Gestel C.A.M., Jager T., 2009.** *Ecotoxicological Applications of Dynamic Energy Budget Theory*. In: Devillers (Ed.), *Ecotoxicology Modeling*. Springer, Berlin, pp. 237-259.
220. **Koukouzika, N., Dimitriadis, V.K., 2005.** *Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece coast: lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress*. Ecotoxicology 14(4), 449-463.
221. **Kozlovskaya, V.I., Mayer, F.L., Menzikova, O.V., Chuyko, G.M., 1993.** *Cholinesterases of aquatic animals*. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 132, 117-140.
222. **Kraak, M.H.S., Scholten, M.C.T., Peeters, W.H.M., De Kock, W.C., 1991.** *Biomonitoring of heavy metals in the western European rivers Rhine and Meuse using the freshwater mussel *Dreissena polymorpha**. Environ. Pollut. 74, 101-114.
223. **Królak, E., 1997.** *The content of heavy metals in *Dreissena polymorpha* (Pall.) in lakes Majcz and Inulec, Masurian Lakeland*. Polskie Archiwum Hydrobiologii 44, 477-486.
224. **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, 23-30.
225. **Lafaurie, M., 1991.** *Les effets génotoxiques et cancérigènes utilisés comme biomarqueur de contamination de l'environnement marin*. Océanis, 17, 475-496.
226. **Lafaurie, M., Narbonne, J.F., Galgani, F., 1992.** *Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin*. Anal. Mag., v. 20, n° 6: 27-33.

227. **Lafaurie, M., 1998.** *Biomarqueurs: les pollutions sous surveillance.* Biofutur, 179, 79-81.
228. **Lafont, R., Mathieu, M., 2007.** *Steroids in aquatic invertebrates.* Ecotoxicology 16, 109–130.
229. **Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F., 1994.** *The role of biomarkers in environmental assessment. (5) Invertebrate populations and communities.* Ecotoxicology 3, 193-208.
231. **Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., 1997.** *Intérêt d'une approche mutliparamétrique 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, 393-402.
232. **Langston, W.J., Burt, G.R., Chesman, B.S., Vane, C.H., 2005.** *Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in the aquatic environment.* J. Mar. Biol. Assoc. UK. 85, 1–31.
233. **Laurec, A & Le Guen, J.C., 1981.** *Dynamique des populations marines exploitées.* Publications du centre national pour l'exploitation des océans, Centre océanologique de Bretagne. 117 pp.
234. **La Valle, P., Nicoletti L., Finoia M.G., Ardizzone G.D., 2011.** *Donax trunculus (Bivalvia: Donacidae) as a potential biological indicator of grain-size variations in beach sediment.* Ecol. Indic. 11, 1426-1436.
235. **Le Gal, Y., et al. 1997.** *Charge energetique en adenylates (CEA) et autres biomarqueurs associes au metabolisme energetique.* In *Biomarqueurs en Écotoxicologie: Aspects Fondamentaux.*
236. **Leclercq, L., 2001.** *Intérêt et limites des méthodes d'estimation de la qualité de l'eau.* Station scientifique des Hautes-Fagnes, Belgique. Document de travail, pp : 44.
237. **Leonardo, C.E., Rainhardt, O., Nancy, A.S., Kurt, K., 1980.** *Measurement of DNA damage in unlabeled mammalian analysed by alkaline elution and fluorometric DNA assay.* Anal. Biochem. 106, 169-174.

238. **Lehtonen, K.K., Kankaanpa, H., Leiniö, S., Sipiä, V.O., Pflugmacher, S., Sandberg-Kilpi, E., 2003.** *Accumulation of nodularin-like compounds from the cyanobacterium Nodularia spumigena and changes in acetylcholinesterase activity in the clam Macoma balthica during short-term laboratory exposure.* *Aquat. Toxicol.* 64, 461–476.
239. **Lehtonen, K.K., Leinio, S., Schneider, R., Leivuori, M., 2006.** *Biomarkers of pollution effects in the bivalves Mytilus edulis and Macoma balthica collected from two areas in the southern coast of Finland (Baltic Sea).* *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 322, 155–168.
240. **Le Petit Robert, Dictionnaire de la Langue Francaise, 2002.** Dictionnaires le Robert, Paris, pp 1810.
241. **Lima, I., Moreira, S.M., Rendon-Von Osten, J., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2007.** *Biochemical responses of the marine mussel Mytilus galloprovincialis to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal.* *Chemosphere* 66, 1230–1242.
242. **Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., Wenzel, A., 2003.** *Endocrine disruptors in the environment (UPAC Technical Report).* *Pure. Appl. Chem.* 75, 631–681.
243. **Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Lowe, D.M., Minier, C., Mitchelmore, C.L., Moore, M.N., Peters, L.D., Pipe, R.K., 2000.** *Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (Mytilus edulis L.) and other mytilids.* *Int. J. Environ. Pollut.* 13, 56-91.
244. **Livingstone, D.R., 2001.** *Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative Damage in aquatic organism.* *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656-666.
245. **Lopes, C., Péry, A.R.R., Chaumot, A., 2005.** *Ecotoxicology and population dynamics: Using DEBtox models in a Leslie modeling approach.* *Ecol. Modell.* 188, 30-40
246. **Lowe, D.M., Pipe, R.K., 1994.** *Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study.* *Aquat. Toxicol.* 30, 357-365.

247. **Lower & Kendall, 1990.** *Sentinel species and sentinel bioassay*. In : Mac Carthy, J.F., Shugart, L.R., (eds), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, 309-331.
248. **Lüllman-Rauch, R., 1979.** *Drug-induced lysosomal storage disorders*. *Lysosomes in Biology and Pathology*, 6, pp. 49-130.
249. **Maanan, M., 2008.** *Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region*. *Environ. Pollut.* 153, 176-183.
250. **Machala, M., Dusek, L., Hilscherova, K., Kubinova, R., Jurajda, P., Neca, J., Ulrich, R., Gelnar, M., Studnickova, Z., Holoubek, I., 2001.** *Determination and multivariate statistical analysis of biochemical responses to environmental contaminants in feral freshwater fish *Leuciscus cephalus* L.* *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 1141-1148.
251. **Maha A. M. Abdallah & Aly M. A. abdall., 2008.** *Biomonitoring study of heavy metals in biota and sediments in the South Eastern coast of Mediterranean sea, Egypt*. *Environ. Monit. Assess.* 146, (1-3), 139-145.
252. **Malin, D.C., Polissar, N.L., Ggamer, M.N., Gunselman, S.J., 1996.** *Mutagenic DNA base-modifications are correlated with lesions in nonneoplastic hepatic tissue of the English sole carcinogenesis model*. *Cancer Res.* 56, 5563-5565.
253. **Manca-Zeichen, M., Agnesi, S., Mariani, A., Maccaroni, A., Ardizzone, G.D., 2002.** *Biology and population dynamics of *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Donacidae) in the South Adriatic Coast (Italy)*. *Estuar. Coast. Shelf. S.* 54, 971-982.
254. **Masmoudi, W., Romdhane, M.S., Kheriji, S., El Cafsi, M., 2005.** *Levels of polychlorinated biphenyl residues in coastal sediments from Tunis bay, Tunisia*. X. European ecological congress, November 8-13, 2005. Kusadasi, Turkey. p. 196 (Abstract Book).
255. **Masmoudi, W., Romdhane, M.S., Khériji, S., El Cafsi, M., 2007.** *Polychlorinated biphenyl residues in the golden grey mullet (*Liza aurata*) from Tunis Bay, Mediterranean sea (Tunisia)*. *Food. Chem.* 105, 72-76.

256. **Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M.T., Laroche, J., 2004.** *Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast.* *Aquat. Toxicol.* 70, 327–343.
257. **Marchi, B., Burlando, B., Moore, M.N., Viarengo, A., 2004.** *Mercury and copper induced lysosomal membrane destabilisation depends on $[Ca^{2+}]$ dependent phospholipase A2 activation.* *Aquat. Toxicol.*, 66, 197–204.
258. **Marcomini, S.C, Penchaszadeh, P., Lopez RA, Luzzatto D., 2002.** *Beach morphodynamics and clam (*Donax hanleyanus*) densities in Buenos Aires, Argentina.* *J. Coast. Res.* 18, 601–611.
259. **Mari, F., Politi, L., Biggeri, A., Accetta, G., Trignano, C., Di Padua, M., Bertol, E., 2009.** *Cocaine and heroin in waste water plants: A 1-year study in the city of Florence, Italy.* *Forensic. Sci. Int.* 189, 8–92.
260. **Maroni, G., 1990.** *Animal Metallothioneins. In: Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects.* Ed.: A.J Shaw. CRC Press, Florida, 215-232.
261. **Martínez-Gómez, C., Vethaak, A.D, Hylland, K., Burgeot, T., Köhler, A., Lyons, B.P., Thain, J., Gubbins, M.J., Davies, I.M, 2010.** *A guide to toxicity assessment and monitoring effects at lower levels of biological organization following marine oil spills in European waters.* *ICES J. Mar. Sci.* 67:1105–1118
262. **Mason, A.Z., Jenkins, K.D., 1995.** *Metal detoxication in aquatic organisms. In Metal speciation and bioavailability in aquatic systems.* Eds Tessier A, Turner DR, Vol 3. Wiley & Sons, Chichester, 469-608.
263. **Mathiessen, P., Johnson, I., 2007.** *Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union.* *Environ. Pollut.* 146, 9–18.
264. **Mathieu, M., 1994.** *Endocrine control of carbohydrate metabolism in mollusc.* *Perspect. Comp. Endo.* In: Davey, K.G., Peter, R.E., Tobe, S.S. (Eds.), *Perspectives in Comparative Endocrinology.* National Research Council of Canada, Ottawa, pp. 471–474.

265. **Mayer, F. L., et al., 2002.** *Physiological and nonspecific biomarkers*. In Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress, ed. R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. J. Mehrle, and H. L. Bergman, 5–85. SETAC Special Publication Series. Boca Raton, FL: Lewis Publishers.
266. **McCarthy, J.F., Shugart, L.R., 1990.** *Biomarkers of environmental contamination.*, Boca Raton: Lewis Publishers.
267. **Mclusky, D. S., Elliott, M., 2004.** *The Estuarine Ecosystem: Ecology, Threats and Management (third ed.)*. Oxford University Press, Oxford, 222pp.
268. **MEDPOL, UNEP., 2001.** <http://www.medpol.unepmap.org>.
269. **Mersch, J., Pihan, J.C., 1993.** *Simultaneous assessment of environmental impact on condition and trace metal availability in zebra mussels *Dreissena polymorpha* transplanted into the Wiltz River, Luxembourg – Comparison with the aquatic moss*. Arch. Environ. Con. Tox. 25, 353-364.
270. **Mersch, J., Wagner, P., Pihan, J.C., 1996.** *Copper in indigenous and transplanted zebra mussels in relation to changing water concentrations and body weight*. Environ. Toxicol. Chem. 15, 886-893.
271. **Michel, X., Narbonne, M., 1997.** *Systèmes de biotransformations chez les mollusques aquatiques*. In : Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., Biomarqueurs en écotoxicologie. Masson, Paris, 11-26.
272. **Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques de Tunisie., 2003.** *Annuaire des statistiques* .<<http://www.onagri.nat.tn/Ann-Stat.htm>>.
273. **Minguez, L., Meyer, A., Molloy, D.P., Giambérini, L., 2009.** *Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): importance in ecotoxicological studies*. Environ. Res. 109, 843-850.
274. **Minguez, L., Molloy, D.P., Guérol, F., Giambérini, L., 2011.** *Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) parasites: potentially useful bioindicators of freshwater quality?* Water Res. 45, 665-673.
275. **Minguez, L Buronfosse, T., Beisel, J.N., Giambérini, L., 2012.** *Parasitism can be a confounding factor in assessing the response of zebra mussels to water contamination*. Environ. Poll.162, 234-240.

276. **Moderan, J., Bouvais, P., David, V., Le Noc, S., Simon-Bouhet, B., Niquil, N., Miramand P., Fichet D., 2010.** *Zooplankton community structure in a highly turbid environment Charente estuary, France): Spatio-temporal patterns and environmental control.* Estuar. Coast. Shelf. S. 88, 219-232.
277. **Moore, M.N., 1988.** *Cellular and histopathological effects of a pollutant gradient - summary.* Mar. Ecol.Prog. Ser. 46, 109-110.
278. **Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Paul Leonard, D.R., 2004.** *An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management.* Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 552, 247-268.
279. **Moreau, J.L., Baudrimont, M., Carrier, P., Peltier, G., Bourdineaud, J.P., 2008.** *Metal binding and antioxidant properties of chimeric tri- and tetra-domained metallothioneins.* Biochimie 90, 705-716.
280. **Moreira, S.M., Lima, I., Ribeiro, R., Guilhermino L., 2006.** *Effects of estuarine sediment contamination on feeding and on key physiological functions of the polychaete Hediste diversicolor: Laboratory and in situ assays.* Aquat. Toxicol. 78, 186-201.
281. **Moore, M.N., Allen, J.I., Mc Veigh, A., 2006.** *Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status.* Mar. Environ. Res. 61, 278–304.
282. **Mouëza, M., 1972.** *Contribution a` l'étude de la biologie de Donax trunculus L. (mollusque Lamellibranche) dans l'Algérois: la croissance.* Pelagos. 4, 25–35.
283. **Mouëza, M., Frenkiel-Renault, L., 1973.** *Contribution à l'étude de la biologie de Donax trunculus L. (Mollusque Lamellibranche) dans l'Algérois: la reproduction.* Cah. Biol. Mar. 14, 261–283.
284. **Mouëza, M. 1976.** *Contribution à l'étude de la Biologie de Donax trunculus (Mollusque, Lamellibranche). Mécanisme de la nutrition.* J. Moll. Stud. 42, 17–30.
285. **Moukrim, A., El Hamidi, F., Lagbouri, A., Kaaya, A., Zekhnini, A., Bouhaimi, A., Narbonne, J.F., 2004.** *Donax trunculus as a sentinel species for environmental monitoring of sandy beaches on Moroccan coasts.* B. Environ. Contam. Tox. 73, 674-681.

286. **Mouneyrac, C., Geffard, A., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., 2000.** *Metallothionein-like proteins in Macoma balthica: effects of metal exposure and natural factors.* Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 34–42.
287. **Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Cottier, A., Rainbow, P.S., Smith, B.D., 2002.** *Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean Orchestia gammarellus: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers.* Aquat. Toxicol. 57, 225–242.
288. **Mouneyrac, C., Linot, S., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Métais, I., Durou, C., Minier, C., Pellerin, J., 2008.** *Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve Scrobicularia plana from three sites differing by their level of contamination.* Gen. Comp. Endocrinol. 157, 133–141.
289. **Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C.** *Biomarkers of Ecological relevance.* In: Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology, Springer, *In press.*
290. **Mouneyrac, C., Leung, P., Leung, K., 2011.** *Cost of Tolerance, in: Amiard-Triquet, Rainbow, Roméo (Eds.), Tolerance to Environmental Contaminants.* CRC Press, Boca Raton, pp. 265-297.
291. **Munaron, D., Dubernet, J. F., Delmas, F., Stanisiere, J. Y., Scribe, P., Feunteun, E., Miramand, P., 2006.** *Assessment of the quantities of herbicides and nutrients brought down by the river Charente to the coast and modelling of the dispersion of atrazine in the Marennes-Oléron Bay.* Cahiers De Biologie Marine 47, 85-92.
292. **Munaron, D., Tapie, N., Budzinski, H., Andral, B., Gonzalez, J.L., 2011.** *Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers.* Estuar. Coast. Shelf. S. doi:10.1016/j.ecss.2011.09.009.
293. **Mzoughi, N., Chouba, L., Lespes, G., 2010.** *Assessment of total aromatic hydrocarbons, aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediment and fish from the Gulf of Tunis (Tunisia).* Soil Sed. Contam. 19, 467– 486.
294. **Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubèze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J.F., Moukrim, A., 1997.** *Use of acetylcholinesterase in Perna perna and Mytilus galloprovincialis as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco).* B. Environ. Contam. Tox. 58, 901-908.

295. **Namieśnik, J., Zabiegała, B., Kot-Wasik, A., Partyka, M., Wasik, A., 2005.** *Passive sampling and/or extraction techniques in environmental analysis: a review.* Anal. Bioanal. Chem. 381, 279-301.
296. **Narbonne, J.F., Daubeze, M., Clerandau, C., Garrigues, P., 1999.** *Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts.* Biomarkers 4 (6), 415–424.
297. **Namour, P., 1992.** *Les mono-oxygénases de poissons, un outil pour la caractérisation des pollutions chroniques.* Etudes du CEMAGREF, série Ressources en Eau, n° 6, 232 p.
298. **Nasci, C., DaRos, L., Campesan, G., VanVleet, E.S., Salizzato, M., Sperti, L., Pavoni, B., 1999.** *Clam transplantation and stress-related biomarkers as useful tools for assessing water quality in coastal environments.* Mar. Pollut. Bull. 39, 255-260.
299. **Neuberger-Cywiak, L., Achituv, Y., Mizrahi, L., 1990.** *The ecology of Donax trunculus Linnaeus and Donax semistriatus Poli from the Mediterranean Coast of Israel.* J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 134, 203–220.
300. **Neuberger-Cywiak, L., Achituv, Y., Garcia, E.M., 2007.** *Effects of sublethal Zn⁺⁺ and Cd⁺⁺ concentrations on filtration rate, absorption efficiency and scope for growth in Donax trunculus (Bivalvia; Donacidae).* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 79, 622–627.
301. **Nicholson, S., Lam, P.K.S., 2005.** *Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel Perna viridis (Mytilidae: Bivalvia).* Environ. Int. 31, 121-132.
302. **Noaksson, E., Tjarnlund, U., Bosveld, A.T.C., Balk, L., 2001.** *Evidence forendocrine disruption in perch (Perca fluviatilis) and roach (Rutilus rutilus) in a remote Swedish lake in the vicinity of a public refuse dump.* Toxicol. Appl. Pharmacol. 174, 160-176.
303. **NRC (Committee on Biological Markers of the National Research Council), (1987).** *Biological markers in environmental health research.* Environ. Health Perspect. 74, 3 -9.
304. **NRC (National Research Council), 2003.** *Bioavailability of contaminants in soils and sediments: processes, tools and applications.* National Academic Press, 432 p.
305. **Oetken, M., Bachmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., 2004.** *Evidence for endocrine disruption in invertebrates.* Int. Rev. Cytol. 236, 1-44.

306. **Office de la Marine Marchande et des ports de Tunisie., 2011.** http://www.ommp.nat.tn/page.php?code_menu=4
307. **ONAS (Office National de l'Assainissement, Tunisie), 2010. Rapport Annuel.** <http://www.onas.nat.tn/Fr/upload/telechargement/telechargement99.pdf>.
308. **Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., 2005.** *Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 49, 1–9.
309. **Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., 2010.** *Intersex and oocyte atresia in a mussel population from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay).* Ecotox. Environ. Safe. 73, 693-701.
310. **Özden, Ö., Erkan, N., Deval, M.C., 2009.** *Trace mineral profiles of the bivalve species Chamelea gallina and Donax trunculus.* Food Chem. 113 (1), 222–226.
311. **Palais F., Mouneyrac C., Dedourge-Geffard O., Giambérini L., Biagianti-Risbourg S., Geffard A., 2011.** *One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (Dreissena polymorpha).* Chemosphere 83, 1062-1073.
312. **Palais, F., 2011.** *Potentiel informatif des réponses enzymatiques digestives dans l'évaluation des effets d'un stress toxique sur l'état physiologique des invertébrés aquatiques : Etude de cas chez un bivalve d'eau douce : Dreissena polymorpha.* Thèse de Doctorat en Ecotoxicologie. Université de Reims Champagne-Ardenne. 200 p.
313. **Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L., 1996.** *Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland.* Mar. Pollut. Bull. 23, 225–231.
314. **Peakall, D.B., 1994.** *Biomarkers. The way forward in environmental assessment.* Toxicol. Ecotoxicol. News 1, 55-60.
315. **Pellerin-Massicotte, J., 1997.** *Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (Mytilus galloprovincialis L.).* J. Rech. Océanogr. 22, 91–98.

316. **Pellerin-Massicotte, J., Tremblay, R., 1998.** *La fragilité lysosomiale en tant que biomarqueur cytologique.* In : *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement.* Eds : Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., Tec & Doc Lavoisier, Paris, 225-242.
317. **Pelletier, E., Campbell, P.G.C., 2008.** *L'écotoxicologie aquatique – Comparaison entre les micropolluants organiques et les métaux : constats actuels et défis pour l'avenir.* Revue des Sciences de l'Eau / Journal of Water Science 21, 173-197.
318. **Petrovic, S., Semencic, L., Ozretic, B., Ozretic, M., 2004.** *Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north adriatic coastal waters (Croatia).* Mar. Pollut. Bull. 49, 713-720.
319. **Piementa, J., 1959.** *Les cycles pliocènes actuels dans les bassins paraliques de Tunisie.* Mémoire de la Société Géologique de France, nouvelle série, 85, 176 pp.
320. **Pohlo, R.H., 1967.** *Aspects of the biology of Donax gouldi and a note on the evolution in Tellinacea (Bivalvia).* Veliger, 9, 330-337.
321. **Potter, I. C., Chuwen, B. M., Hoeksema, S. D., Elliott, M., 2010.** *The concept of an estuary: a definition that incorporates systems which can become closed to the ocean and hypersaline.* Estuar. Coast. Shelf. S. 87, 497-500.
322. **Power, M., McCarty, L.S., 1998.** *A comparative analysis of environmental risk assessment/risk management frameworks.* Environ. Sci. Technol. 32, 224A- 231A.
323. **Pritchard, D. W., 1967.** *What is an estuary: a physical viewpoint.* Estuaries 83, 3-5 American association for Advancement of Science, Washington.
324. **Purchon, R.D., 1977.** *The Biology of the Mollusca.* 2nd ed. Pergamon Press. 560 pp.
325. **Pytharopoulou, S., Sazakli, E., Grintzalis, K., Georgiou, C.D., Leotsinidis, M., Kalpaxis, D.L., 2008.** *Translational responses of Mytilus galloprovincialis to environmental pollution: integrating the responses to oxidative stress and other biomarker responses into a general stress index.* Aquat.Toxicol.89, 18–27.

326. **Quiniou, F., Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Geffard, A., Mouneyrac, C., Budzinski, H., Roméo, M., 2007.** *Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae.* Environ. Int. 33, 27-33.
327. **Quintino, V., Elliott, M., Rodrigues, A.M., 2006.** *The derivation, performance and role of univariate and multivariate indicators of benthic change: case studies at differing spatial scales.* J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 330, 368–382.
328. **Ramón, M., Abelló, P., Richardson, C.A., 1995.** *Population structure and growth of *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) in the western Mediterranean.* Mar. Biol. 121, 665–671.
329. **Raftopoulou, E.K., Dimitriadis, V.K., 2010.** *Assessment of the health status of mussels *Mytilus galloprovincialis* along Thermaikos Gulf (Northern Greece): An integrative biomarker approach using ecosystem health indice.* Ecotox. Environ. Safe. 73, 1580–1587.
330. **Raïs, M., 1999.** *Géochimie des métaux lourds (Fe, Mn, Pb, Zn, Cu, Ni et Cd) dans les eaux et les sédiments du littoral du golfe de Tunis. Mobilité et impact des activités anthropiques. Thèse de Doctorat en Géologie.* Faculté des Sciences de Tunis, Tunis University publications, Tunis, p. 190.
331. **Ramesha, M.M., Thippeswamy, S., 2009.** *Allometry and condition index in the freshwater bivalve *Parreysia corrugate* (Muller) from river Kempuhole, India.* Asian. Fish. Sci. 22, 203-214.
332. **Roméo, M., Gnassia-Barelli, M., 1988.** **Donax trunculus* and *Venus verrucosa* as bioindicators of trace metals concentrations in Mauritanian coastal waters.* Mar. Biol. 99, 223–227.
333. **Roméo, M., Mourgaud, Y., Geffard, A., Gnassia-Barelli, M., Amiard, J.C., Budzinski, H., 2003.** *Multimarker approach in transplanted mussels for evaluating water quality in Charentes, France, coast areas exposed to different anthropogenic conditions.* Environ. Toxicol. 18 (5), 295–305.
334. **Roméo, M., Gharbi-Bouraoui, S., Gnassia-Barelli, M., Dellali, M., Aissa, P., 2006.** *Responses of *Hexaplex (Murex) trunculus* to selected pollutants.* Sci. Total Environ. 359, 135–144.

335. **Ramón, M., Abelló, P., Richardson, C.A., 1995.** *Population structure and growth of Donax trunculus (Bivalvia: Donacidae) in the western Mediterranean.* Mar. Biol. 121, 665–671.
336. **Ramón, M., Gracenea, M., Gonzalez-Moreno, O., 1999.** *Bacciger bacciger (Trematoda, Fellodistomidae) infection in commercial clams Donax trunculus (Bivalvia, Donacidae) from the sandy beaches of the Western Mediterranean.* Dis. Aquat. Organ. 35, 37–46.
337. **Rank, J., Jensen, K., Jespersen, P.H., 2005.** *Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (Mytilus edulis) sampled from coastal sites in Denmark.* Mutat. Res. 585, 33–42.
338. **Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scancelli, V., Fattorini, D., Nigro, M., 2004.** *Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity, and lysosomal stability in mussels, Mytilus galloprovincialis, during a field traslocation experiment.* Aquat. Toxicol. 68, 167–178.
339. **Regoli, F., Nigro, M., Orlando, E., 1998.** *Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop Adamussium colbecki.* Aquat. Toxicol. 40, 375–392.
340. **Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G.W., 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. Pollut. Bull. 44, 912–922.
341. **Rice, S., Whitehead, S.A., 2006.** *Phytoestrogens and breast cancer –promoters or protectors?* Endocr. Relat. Cancer 13, 995-1015.
342. **Richardson, B.J., Mak, E., De Luca-Abbott, S.B., Martin, M., McClellan, K., Lam, P.K.S., 2008.** *Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in greenlipped mussels (Perna viridis): do mussels “integrate” biomarker responses?* Mar. Pollut. Bull. 57, 503–514.
343. **Rickwood, C.J., Galloway, T.S., 2004.** *Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect a study of Mytilus edulis exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos.* Aquat. Toxicol. 67, 45–56.

344. **Ringwood, A.H., Hameedi, M.J., Lee, R.F., Brouwer, M., Peters, E.C., Scott, G.I., Luoma, S.N., Di Giulio, R.T., 1999.** *Bivalve biomarker workshop: overview and discussion summaries*. *Biomarkers*, 4 (6), 391–399.
345. **Roesijadi, G., 1992.** *Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals*. *Aquat. Toxicol.*, 22, 81-114.
346. **Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girare, J.P., 2000.** *Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax**. *Aquat. Toxicol.* 48,185–194.
347. **Roméo, M., Gharbi-Bouraoui, S., Gnassia-Barelli, M., Dellali, M., Aissa, P., 2006.** *Responses of *Hexaplex (Murex) trunculus* to selected pollutants*. *Sci. Total Environ.* 359, 135–144.
348. **Roméo, M., Gnassia-Barelli, M., 1988.** **Donax trunculus* and *Venus verrucosa* as bioindicators of trace metals concentrations in Mauritanian coastal waters*. *Mar. Biol.* 99, 223–227.
349. **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*. *Environ. Pollut.* 122, 369– 378.
350. **Roméo, M., Giambérini, L., 2008.** *Historique* . In: Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., (Eds.), *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Lavoisier, Paris, pp. 17-54.
351. **Roméo, M., Poirier, L., Berthet, B., 2009.** *Biomarkers based upon biochemical responses*. In *Environmental assessment of estuarine ecosystems: a case study*. CRC Press, Boca Raton.
352. **Rosenberg, R., Blomqvist, M., Nilsson, H.C., Cederwall, H., Dimming, A., 2004.** *Marine quality assessment by use of benthic species-abundance distributions: a proposed new protocol within the European Union Water Framework Directive*. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 728-739.
353. **Ruus, A., Schaanning, M., Øxnevad, S., Hylland, K., 2005.** *Experimental results on bioaccumulation of metals and organic contaminants from marine sediments*. *Aquat. Toxicol.* 72, 273-292.
354. **Salas, F., Marcos, C., Neto, J.M., Patricio, J., Perez-Ruzafa, A., Marques, J.C., 2006.** *Userfriendly guide for using benthic ecological indicators in coastal and marine quality assessment*. *Ocean. Coast. Manage.* 49, 308–331.

355. **Salazar, M.H., Salazar, S.M., 1995.** *In situ bioassays using transplanted mussels: I. Estimating chemical exposure and bioeffects with bioaccumulation and growth.* In: Hughes, J.S., Biddinger, G.R., Mones, E., (Eds.), *Environmental toxicology and risk assessment, Third volume, ASTM STP 1218.* American Society for Testing and Materials, 216-241.
356. **Salazar, M.H., Salazar, S.M., 1997.** *Using caged bivalves to characterize exposure and effects associated with pulp and paper mill effluents.* *Wa. Sci. Technol.* 35, 213-220.
357. **Salazar, M.H., Salazar, S.M., 1998.** *Using caged bivalves as part of an exposure-dose-response triad to support an integrated risk assessment strategy.* In: Peyster, A., Day, K., (Eds.), *Proceedings – Ecological Risk Assessment: a meeting of policy and science.* SETAC Press, 167-192.
358. **Salazar, M.H., Salazar, S.M., 2007.** *Linking bioaccumulation and biological effects to chemicals in water and sediment: a conceptual framework for freshwater bivalve ecotoxicology.* In: Farris, J.L., Van Hassel, J.H., (Eds.), *Freshwater bivalve ecotoxicology.* SETAC Press, 215-255.
359. **Schiedek, D., Broeg, K., Baršienė, J., Lehtonen, K.K., Gercken, J., Pfeifer, S., Vuontisjärvi, 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 (*Zoarcesviviparus*) from the southwestern Baltic Sea.* *Mar. Pollut. Bull.* 53, 387–405.
360. **Schmolke, S., Broeg, K., Zander, S., Bissinger, V., Hansen, P., Kress, N., Herut, B., Jantzen, E., Krüner, G., Sturm, A., Körting, W., Westernhagen, H.V., 1999.** *Multivariate statistical approach to the temporal and spatial patterns of selected bioindicators observed in the North Sea during the years 1995-1997.* *Helgoland Mar. Res.* 53, 257-266.
361. **Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Fonseca, V.F., Franc, S., Vasconcelos, R.P., Bebianno, M.J., Cabral H.N., 2011.** *Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems.* *Ecol. Indic.* doi:10.1016/j.ecolind.2011.08.009.
362. **Siah, A., Pellerin, J., Amiard, J.C., Pelletier, E., Viglino, L., 2003.** *Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to in situ contamination to organotins and heavy metals in the St. Lawrence River (Canada).* *Comp. Biochem. Physiol. C* 135, 145–156.

363. **Sifi, K., Chouahda, S., Soltani, N., 2007.** *Biosurveillance de l'environnement par la mesure de biomarqueurs chez Donax trunculus dans le golfe d'Annaba (Algérie).* Mésogée 63, 11-18.
364. **Simboura, N., Zenetos, A., 2002.** *Benthic indicators to use in ecological quality classification of Mediterranean soft bottom marine ecosystems, including a new biotic index.* Mediterranean Marine Science 3, 77–111.
365. **Siu, W., Cao, J., Jack, R., Wu, R., Richardson, B., Xu, L., Lam, P., 2004.** *Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (Perna viridis).* Aquat. Toxicol. 66, 381–392.
366. **Sliti, M., 1990.** *Fonctionnement des brises-lames dans le système littoral du Golfe de Tunis.* Thèse de spécialité en Géologie, Université de Bordeaux I, 204 pp.
367. **Smaoui-Damak, W., Hamza-Chaffai, A., Berthet, B., Amiard, J.C., 2003.** *Preliminary study of the clam Ruditapes decussatus exposed in situ to metal contamination and originating from the Gulf of Gabès, Tunisia.* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71, 961–970.
368. **Smaoui-Damak, W., Hamza-Chaffai, A., Bebianno, M.J., Amiard, J.C., 2004.** *Variation of metallothioneins in gills of the clam Ruditapes decussatus from the Gulf of Gabès (Tunisia).* Comp. Biochem. Physiol. 139C, 181–188.
369. **Smaoui-Damak, W., Rebai, T., Berthet, B., Hamza-Chaffai, A., 2006.** *Does cadmium pollution affect reproduction in the clam Ruditapes decussatus? A one-year case study.* Comp. Biochem. Physiol. 143C, 252–261.
370. **Smaoui-Damak, W., Mathieu, M., Rebai, T., Hamza-Chaffai, A., 2007.** *Histology of the reproductive tissue of the clam Ruditapes decussatus from the Gulf of Gabès (Tunisia).* Inv. Rep. Dev. 50 (3), 117–126.
371. **Smith, B.S., 1971.** *Sexuality in the American mud snail, Nassarius obsoletus Say.* Proceedings of the Malacological Society of London 39, 377–381.
372. **Smolders, R., Bervoets, L., Blust, R., 2002.** *Transplanted zebra mussels (Dreissena polymorpha) as active biomonitors in an effluent-dominated river.* Environ. Toxicol. Chem. 21, 1889-1896.
373. **Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., 2004.** *Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization.* Environ. Pollut. 129, 99-112.

374. **Smolders, R., Bervoets, L., Wepener, V., Blust, R., 2003.** *A conceptual framework for using mussels as biomonitors in whole effluent toxicity.* Hum. Ecol. Risk Assess. 9, 741–760.
375. **Solé, M., Kopecka-Pilarczyk, J., Blasco, J., 2009.** *Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, Nereis diversicolor and Scrobicularia plana, from a Marsh ecosystem in SW Spain.* Environ. Int. 35, 523–531.
376. **Stentiford, G.D., Feist, S.W., 2005.** *First reported cases of intersex (ovotestis) in the flatfish species dab Limanda limanda: Dogger Bank, North Sea.* Mar. Ecol. Prog. Ser. 301, 307-310.
377. **Stoeckmann, A.M., Garton, D.W., 2001.** *Flexible energy allocation in zebra mussels (Dreissena polymorpha) in response to different environmental conditions.* J. North Am. Benthol. Soc. 20, 486–500.
378. **Strehler, E.E., 1991.** *Recent advances in the molecular characterization of the plasma membrane Ca^{2+} pump.* J. Membr. Biol., 120, 1-15.
379. **Sumpter, J.P., Johnson, A.C., 2005.** *Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment.* Environ. Sci. Technol. 39, 4321– 4332.
380. **Sunderman, F.W., Marzoul, A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Reid, M.C., 1985.** *Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats.* Ann. Clin. Lab. Sci. 15, 229-236.
381. **Suter, G.W., II, 1993.** *Ecological Risk Assessment.* Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, p. 538.
382. **Tannenbaum, L.V., 2005.** *A Critical Assessment of the Ecological Risk Assessment Process: A Review of Misapplied Concepts.* Integrated Environ. Assess. Manag. 1, 66-72.
383. **Terman, A., Brunk, U.T., 2004.** *Molecules in focus: Lipofuscin.* Int. J. Biochem. Cell Biol. 36, 1400-1404.
384. **Thomas, K. V., Hilton, M. J., 2004.** *The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries.* Mar. Pollut. Bull. 49, 436-444.
385. **Thornalley, P.J., Vasak, M., 1985.** *Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals.* Biochim. Biophys. Acta, 827, 36-44.

386. **Thorsen, W.A., Cope, W.G., Shea, D., 2007.** *Toxicokinetics of environmental contaminants in freshwater bivalves*. In: Farris, J.L., Van Hassel, J.H., (Eds.), *Freshwater bivalve ecotoxicology*. SETAC Press, 169-214.
387. **Tim-Tim, A.L.S., Morgado, F., Moreira, S., Rangel, R., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 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.
388. **Tlili, S., Métais, I., Boussetta, H., Mouneyrac, C., 2010.** *Linking changes at sub-individual and population levels in *Donax trunculus*: Assessment of marine stress*. *Chemosphere* 81, 692-700.
389. **Tlili, S., Métais, I., Ayache, N., Boussetta, H., Mouneyrac, M., 2011.** *Is the reproduction of *Donax trunculus* affected by their sites of origin contrasted by their level of contamination?* *Chemosphere* 84, 1362-1370.
390. **Tom, M., Jakubov, E., Rinkevich, B., Herut, B., 1999.** *Monitoring of hepatic metallothionein mRNA levels in the fish *Lithognathus mormyrus**. Evaluation of transition metals pollution in a Mediterranean coast. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 503-508.
391. **Udroiu, I., 2006.** *The micronucleus test in piscine erythrocytes*. *Aquat. Toxicol.* 79, 201-204.
392. **Usero, J., Morillo, J., Gracia, I., 2005.** *Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain*. *Chemosphere*, 59 (8): 1175-1181.
393. **Van der Oost, H., Beyer, J., Vermeulen, P.E., 2003.** *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
394. **Van Hassel, J.H., Farris, J.L., 2007.** *Freshwater bivalve ecotoxicology*. In: Farris J.L., Van Hassel J.H. (Eds.), *Freshwater bivalve ecotoxicology*. SETAC Press, 1-18.
395. **Van Leeuwen, C.J. and Vermeire, T.G., 2007.** *Risk assessment of chemicals – An introduction 2nd edition*. Springer, The Netherlands.
396. **Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003.** *Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety*. *Environment International* 28, 711-717.

397. **Viarengo, A., Canesi, L., 1991.** *Seasonal variations in the antioxidant defence system and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels.* Comp. Biochem. Physiol. C 100, 187–190.
398. **Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991.** *Seasonal variations in the antioxidant defense systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels.* Comp. Biochem. Physiol. C 100, 187-190.
399. **Viarengo, A., Nott, J.A., 1993.** *Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates.* Comp. Biochem. Physiol. C 104 , 355-372.
400. **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.
401. **Voets, J., Talloen, W., de Tender, T., van Dongen, S., Covaci, A., Blust, R., Bervoets, L., 2006.** *Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters.* Aquat. Toxicol. 79, 213-225.
402. **Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J.V., Brandt, I., Vethaak, A.D., 2000.** *Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation.* Crit. Rev. Toxicol. 30 (1), 71–133.
403. **WGBEC (working group on biological effects of contaminants), 2006.** *ICES Marine Habitat Committee, ICES CM 2006/MHC: 04, Copenhagen.* <<http://www.ices.dk>>.
404. **Weis, J.S., Smith, G., Zhou, T., Santiago-Bass, C., Weis, P., 2001.** *Effects of Contaminants on Behavior: Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences.* BioScience 51, 209-217.
405. **Weis, J.S., Bergey, L., Reichmuth, J., Candelmo, A., 2011.** *Living in a Contaminated Estuary: Behavioral Changes and Ecological Consequences for Five Species.* BioScience 61, 375-385.
406. **Wheeler, J.R., Gimeno, S., Crane, M., et al., 2005.** *Vitellogenin: A review of analytical methods to detect (anti) estrogenic activity in fish.* Toxicol. Mech. Methods 15, 293-306.
407. **WHO., 1993.** *International Programme on Chemical Safety (IPCS). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles.* Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva.

408. **Widdows, J., Donkin, P., 1992.** *Mussel and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects.* In: Gosling E. (Ed.), *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture.* Elsevier, 383-424.
409. **Widdows, J., Donkin, P., Brinsley, M.D., Evans, S. V., Salkeld, P. N., Franklin, A., Lawr, J., Waldock, M. J., (1995).** *Scope for growth and contaminants levels in North Sea mussels Mytilus edulis.* Mar. Ecol. Prog. Ser. 127, 131-148.
410. **Wogon, G., Goderlick, N., 1985.** *Chemical and biochemical dosimetry to exposure to genotoxic chemical.* Environ. Health. Pers. 62, 5-18.
411. **Wosniok, W., Broeg, K., Feist, S.W., 2005.** *On the applicability of the various available 'health indices' for the interpretation of data obtained from biological effects monitoring activities and associated research studies using pathology and disease endpoints.* ICES WGPDMO Report, 76-84.
412. **Wu, R.S.S., Lam, P.K.S., 1997.** *Glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in the green-lipped mussel (Perna viridis): possible biomarkers for hypoxia in the marine environment.* Water. Res. 31, 2797–2801.
413. **Yeom, D.H., Adams S.M., 2007.** *Assessing effects of stress across levels of biological organization using an aquatic ecosystem health index.* Ecotoxicol. Environ. Saf. 67, 286–295.
414. **Zaïri, M., Ferchichi, M., Ismaïl, A., Jenayeh, M., Hammami, H., 2004.** *Rehabilitation of El Yahoudia dumping site, Tunisia.* Waste Manage. 24, 1023–1034.
415. **Zabiegała, B., Kot-Wasik, A., Urbanowicz, M., Namieśnik, J., 2010.** *Passive sampling as a tool for obtaining reliable analytical information in environmental quality monitoring.* Anal. Bioanal. Chem. 396, 273-296.
416. **Zaggaf-Tahri, M., 1999.** *Etude de l'impact des ouvrages de protection sur la dynamique sédimentaire du littoral au Golfe de Tunis et des côtes nord de Mahdia.* Thèse de Doctorat en géologie, Faculté des Sciences de Tunis, 140 pp.
417. **Zarrad, R., El Abed, A., M'rabet, R., Missaoui, H., Romdhane, M.S., 2003.** *Distribution spatiale de l'ichtyoplancton en été et en automne et conditions*

environnementales dans le golfe de Tunis. Bull. Inst. Natl. Sci. Tech. Mer (Tunisie), Vol. 30, 39-47.

418. **Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2006.** *Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): an integrated biochemical, histochemical and histological study*. *Aquat. Toxicol.* 78, 109-116.

Résumé

Les recherches actuelles préconisées en écotoxicologie pointent l'intérêt de la mise en évidence et de la caractérisation des liens qui peuvent exister entre les différents niveaux d'organisation biologique. En particulier, les relations entre les réponses des organismes observées à l'échelle sub-individuelle (e.g. biomarqueurs) à celles détectées à des niveaux d'organisations biologiques supérieurs (e.g. population). C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse dont les recherches avaient pour objectif majeur de contribuer à l'estimation de l'état de santé environnemental du golfe de Tunis, au travers de l'étude de diverses réponses biochimiques, physiologiques et populationnelles d'un mollusque bivalve (*Donax trunculus*) représentatif des côtes sableuses en Méditerranée exposé chroniquement à des effluents des oueds. Les relations entre la réponse d'une batterie de biomarqueurs (de défense et de dommage) et les perturbations au niveau populationnel (structure et dynamique des populations) ont été étudiées et discutées. L'intégration des réponses individuelles des biomarqueurs étudiés dans deux indices (Integrated Biomarker Response: IBR et Health Status Index: HSI) a permis de classer les sites d'études selon leur état de stress. Une proposition d'un nouvel outil de diagnostic environnemental moyennant une combinaison des paramètres de la reproduction (cycle gamétogénique, indice de maturité sexuelle, réserves énergétiques, sex-ratio) et des relations allométriques (relations longueurs-poids) et des indices biologiques) a été également discutée et argumentée.

Mots clés : *Donax trunculus*, biomarqueurs, structure et dynamique des populations, perturbation de la reproduction, indices biomarqueurs, évaluation du risque environnemental.

Abstract

Research in ecotoxicology currently focuses to fill the gap existing between sub-organismal responses (e.g. biomarkers) to toxicants and effects occurring at higher levels of biological organisation (e.g. population). In this context, the main objective of this PhD thesis was to contribute to the eco-toxicological risk assessment of the Gulf of Tunis across the use of the intra-sedimentary bivalve *Donax trunculus*. A battery of biomarkers measured at different level of biological organization (biochemical, physiological and population) was assessed. Links between the responses at the infra-individual level (core biomarkers) to supra-individual level (structure and population's dynamic) were depicted. Results of biochemical markers were incorporate into two biomarkers integrated indices (Integrated Biomarker Response: IBR and Health Status Index: HIS). Finally, a new biomonitoring tool based on the combined use of reproduction endpoints, allometry relationships and biological indices was proposed and discussed.

Key words: *Donax trunculus*, biomarkers, structure and population's dynamic, reproduction impairments, integrated biomarker indices, environmental risk assessment.