

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université d'Oran

Faculté Des Sciences
Département De Biologie
Laboratoire Réseau De Surveillance Environnementale



MEMOIRE PRESENTE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MAGISTER

Spécialité : Sciences de l'Environnement
Option : Biologie et Pollution Marines

Présenté par Bénichou Fatima Zahra

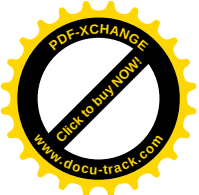
Thème : _____

**Biosurveillance du littoral oranais par la mesure de l'activité de deux biomarqueurs :
l'acétylcholinestérase et la glutathion S-transférase chez l'oursin commun *Paracentrotus
lividus* utilisé comme espèce bioindicatrice.**

Commission du jury composée de :

Président: O.Kheroua
Examineur M.Slimani
Examineur : Sahraoui
Examineur : M.Bouderbalah
Encadreur : Z. Boutiba

Professeur, Université d'Oran
Professeur, Université d'Oran
Professeur, Université d'Oran
Maitre de Conférences, Université d'Oran
Professeur, Université d'Oran

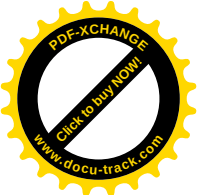


La fange côtière, à l'interface terre mer est un lieu d'activités humaines, mais aussi un lieu de déversement et de concentration des polluants de diverses origines entraînant des effets délétères sur les écosystèmes littoraux et marins.

La biosurveillance par ses différentes approches permet de détecter de manière précoce et continue un éventuel stress environnemental dû à la pollution et cela par la mesure de marqueurs biologiques dans un organisme vivant.

Dans ce travail il s'agit de la mesure de deux biomarqueurs l'acétylcholinestérase et la glutathion S-transférase, chez l'oursin *Paracentrotus lividus* prélevé au niveau du port d'Arzew et au niveau du site de référence de Madagh, les résultats obtenus montrent pour les deux biomarqueurs, des différences significatives entre les deux sites et entre les différentes saisons de prélèvements.

Mots clés : Biosurveillance, biomarqueurs, acétylcholinestérase, glutathion S-transférase, bioindicateurs, *Paracentrotus lividus*, port d'Arzew.

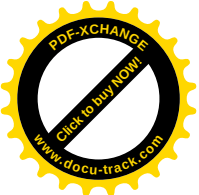


The coastal mud, the land-sea interface are a place of human activities, but also a place of discharge and concentration of pollutants of various origins leading to deleterious effects on coastal and marine ecosystems.

Biomonitoring through its various approaches, allows us to detect in an early and continuing way, a possible environmental stress due to pollution and that by measuring biomarkers in a living organism.

In this study, we measured two biomarkers, the acetylcholinesterase and the glutathioneS-transferase, in sea-urchin *Paracentrotus lividus*, collected at the Arzew harbor and at the reference site Madagh, the results show for both biomarkers, significant differences between the two sites and between different seasons of sampling.

Keywords: Biomonitoring – biomarkers – acetylcholinesterase - glutathione S- transferase - bioindicators - *Paracentrotus lividus* – Arzew harbor.

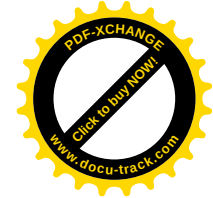
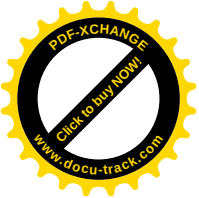


المنطقة الساحلية ، واجهة البر والبحر هي مكان للأنشطة البشرية ، ولكن أيضا مكان التفريغ وتركيز الملوثات من مصادر مختلفة مما يؤدي إلى آثار ضارة على النظم الايكولوجية الساحلية.

الرصد البيولوجي من خلال النهج المختلفة يسمح لنا بالكشف و بطريقة مبكرة مستمرة ، عن ضغوطات بيئية محتملة ناجمة عن التلوث وذلك من خلال قياس المؤشرات الحيوية في الكائنات الحية.

خلال دراستنا ، قمنا بقياس لمؤشرين حيويين هما ، أستيل كولينستراز AChE وجلوتاثيون اس ترانسفيراز GST ، في قنفذ البحر *Paracentrotus lividus* ، التي جمع في ميناء أرزيو و الموقع المرجعي مداغ

الكلمات الهامة : الرصد البيولوجي -- المؤشرات الحيوية -- أستيل كولينستراز -- الجلوتاثيون دإ ترانسفيراز - s -
- *Paracentrotus lividus* ميناء أرزيو



Les encouragements à entreprendre et terminer ce travail ont été trop nombreux pour que je puisse remercier ici tous ceux qui m'ont aidé, je vais certainement commettre de nombreuses injustices et de nombreux oublis dans la liste suivante qu'il me soit pardonné.

J'exprime toute ma gratitude aux membres de jury qui ont accepté la lourde tâche de juger ce travail.

*Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **O.Kheroua**, responsable du Laboratoire de Physiologie et de Sécurité Alimentaire au Département de Biologie de l'Université d'Oran, d'avoir accepté de présider ce jury, veuillez monsieur trouver l'expression de ma profonde gratitude.*

*Je suis très honorée de la présence de Monsieur **M.Slimani**, Professeur à l'Université d'Oran, merci monsieur pour l'intérêt que vous portez à mon modeste travail en acceptant de l'examiner.*

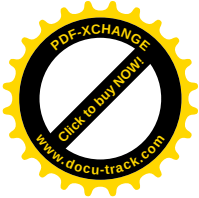
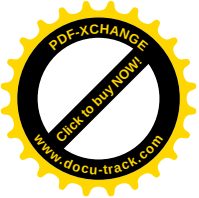
*Je remercie vivement Monsieur **T.Sahraoui**, pour avoir accepté d'examiner mon mémoire, je suis honorée de votre présence.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur **M.Bouderbalah**, chercheur au Laboratoire Réseau de Surveillance Environnementale. Vous m'avez apporté une aide inestimable en m'accordant largement votre attention et en me prodiguant vos conseils, je suis très reconnaissante de l'intérêt que vous m'avez porté en toutes circonstances.*

*Je ne pourrais guère trouver les mots pour remercier mon encadreur Monsieur le Professeur **Z. Boutiba**, Directeur du Laboratoire Réseau de Surveillance Environnementale (LRSE), je tiens à vous remercier pour votre confiance et la grande liberté que vous m'avez accordées dans ma recherche, et qui m'a permis d'avoir confiance en moi et d'acquérir l'autonomie et le courage nécessaires pour terminer mon travail. Merci d'avoir mis à ma disposition tous les moyens dont j'avais besoin, il suffisait que je frappe à votre porte pour que tout soit réglé, merci pour votre attention, vos encouragements, vos conseils de valeurs et pour votre disponibilité malgré votre emploi du temps chargé. Veuillez Monsieur, accepter mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.*

*Je ne pourrai oublier la précieuse aide que m'a apporté Monsieur **Ahmed Fouatih Amine**, Chef du port d'Arzew-STH. Merci d'avoir suivi mon travail sur le terrain, d'avoir déployé tous les moyens pour le bon déroulement de mes campagnes d'échantillonnage au sein de votre structure, où vous m'avez accueilli chaleureusement, grâce à votre modestie, je me sentais parmi les vôtres. Merci d'avoir participé à la réalisation de ce travail et d'avoir assuré le transport de mes spécimens du port à notre laboratoire dans les plus brefs délais, merci aussi d'avoir mis entre mes mains, toute la documentation et les informations dont j'avais besoin.*

*Un très grand merci à **Chergui Mohamed**, plongeur au port d'Arzew-STH, qui a fait beaucoup de concessions par rapport à son travail, pour venir, ponctuellement, et pendant toute la période de mon étude, me prélever les oursins, même dans des conditions météorologique défavorables, vous avez tenu à que je respecte mon planning, comme vous disiez bien « c'est pour la Science ! »*



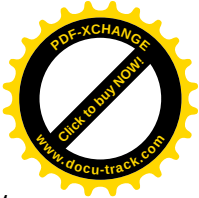
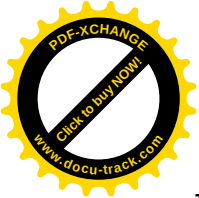
Je remercie vivement tous mes camarades de promotion, deux belles années passées avec vous au laboratoire, une période qui compte dans ma vie. J'ai appris à savourer le bonheur et le malheur de la recherche. Je vous adresse mes sincères remerciements et ma sympathie à tous.

*Une pensée particulière à **Maya, Lilia, Yasmine**, merci pour les moments de joies et de folies, les moments de travaux et du sérieux, vous avez su égayer mes deux années passées avec vous au sein du laboratoire, aucun mot ne sera capable de transmettre tout ce que je vous dois. Que ce travail soit une expression de ma plus grande affection envers vous.*

*Madame **S.Dermeche**, Docteur et Chercheur au LRSE, Merci pour votre aide, votre sympathie et vos critiques constructives, vos remarques m'ont beaucoup aidé à m'améliorer.*

*Je remercie vivement les membres de ma famille qui m'ont apporté un soutien morale inestimable, et ce durant toute ma scolarité, merci à ma grand-mère **Rezk-Allah Yamina**, à tata **Lila** et **Djil**, merci à ma chère cousine **Assia** et à mon cousin **Fayçal**, qui m'as posé un jour la question suivante : « Vous les chercheurs, vous cherchez quoi ? Et ça vous arrive de trouver ? Je te laisse le soin de lire ces quelques pages, tu trouveras surement la réponse !*

*Enfin, une pensée plus particulière et très chaleureuse pour **mes parents** qui m'ont toujours soutenus tout au long de mon parcours. Sans leur soutien permanent cette thèse n'aurait pas pu voir le jour.*



*Je dédie ce travail à mon très cher **papa**, Ce sont ton amour, ta compréhension, et ton sacrifice qui m'ont poussée à réaliser un de mes rêves qui fût l'un des tiens.*

. Avec toute mon estime et tout mon amour, je te dédie ce mémoire, il est le fruit de tes encouragements, on devrait te donner une copie de mon diplôme pour avoir tout vécu avec moi, tu as vu ce mémoire grandir page par page.

*A ma très chère **maman**, c'est ta sévérité qui était à l'origine de mon sérieux à l'école, c'est toi qui m'a appris l'alphabet et qui m'a initié la notion de la compétition, tu as veillé à que je sois toujours la meilleure de ma classe ! Merci maman pour tout ce que tu as fais et tu continue à faire pour ta fille.*

*A la meilleure sœur au monde **Sori**, malgré que tu sois plus jeune que moi de dix ans, c'est toi qui s'es toujours occupée de moi, la vie à la maison n'aurait pas pu être si joyeuse si tu n'étais pas née !*

FATIMA.

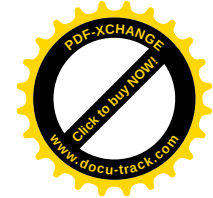
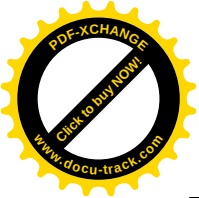


Fig. 1 : Les deux phases de la biotransformation

Fig. 2 : Structure chimique de l'Acétylcholine.

Fig.3 Transmission de l'influx nerveux.

Fig.4 : Schéma général d'un neurone

Fig. 5 : Recyclage de l'acétylcholine

Fig. 6 : Transmission synaptique cholinergique

Fig. 7 : Formule des organophosphorés..

Fig. 8 : Principaux sites d'action des insecticides

Fig. 9 : Formule des carbamates.

Fig. 10 : Les voies majeures conduisant à la détoxication et à la toxication des xénobiotiques organiques chez les animaux

Fig. 11 : Oursin *Paracentrotus lividus*

Fig.12 : Les positions de la face orale et aborale de *Paracentrotus lividus*

Fig.13 : Vue d'une dissection de la face aborale de *Paracentrotus lividus*

Fig.14 : Vue interne d'une dissection de la région orale montrant la disposition de la lanterne d'Aristote

Fig.15 : Extraction *in situ* des gamètes mâles et femelles de *Paracentrotus lividus*

Fig.16 : schéma illustrant les différentes étapes de la vie d'un oursin *Paracentrotus lividus*

Fig.17 :L'aire de répartition de l'espèce est indiquée par le trait rouge

Fig.18 : Localisation des sites d'échantillonnage le long de la côte occidentale algérienne

Fig. 19 : Fiche d'échantillonnage

Fig. 20 : Vue panoramique du site de Madagh.

Fig.21 : Vue panoramique du port d'Arzew

Fig.22 : Vue satellitaire de la zone d'échantillonnage au niveau de site de Madagh

Fig. 23 : Vue satellitaire de la zone d'échantillonnage au niveau du port d'Arzew

Fig. 24 : Synoptique illustrant les opérations de traitements des échantillons.

Fig.25 : Variation de la teneur en protéines au niveau des plaques ambulacraires des oursins *P.lividus* du port d'Arzew et du site de référence Madagh

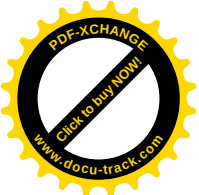


Fig.26 : Variation de la teneur en protéines au niveau des cæcums pyloriques des oursins *Paracentrotus lividus* du port d'Arzew et du site de référence Madagh

Fig.27 : Variation mensuelle de l'activité de l'ACHe (nmol/min/mg de prot) déterminée chez *Paracentrotus lividus* récolté au port d'Arzew et de Madagh

Fig.28 : Variation mensuelle de l'activité de l'ACHe (nmol/min/mg de prot) au niveau des deux sites en fonction de la profondeur de *Paracentrotus lividus*.

Fig.29 : variation mensuelle de l'activité de la GST au niveau du port d'Arzew et du site de référence Madagh.

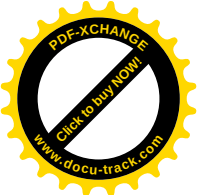
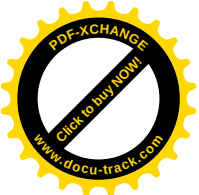


Tableau 1: Classes des micropolluants

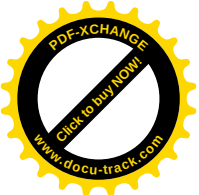
Tableau 2: Différents biomarqueurs utilisés pour le diagnostic écotoxicologue

Tableau 3: Différences observées entre les biosurveillances active et passive

Tableau 4: Quelques insecticides organophosphorés utilisés en agriculture



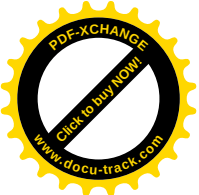
- **ACh** : Acétylcholine.
- **AChE** : Acétylcholinestérase.
- **ACo-A** : Acétyl Coenzyme A.
- **AEE** : Agence Européenne de l'Environnement.
- **AthChI** : Acétylcholinestérase Iodide.
- **ADN** : Adénosine Di-Phosphate
- **Cat** : catalase
- **DDT** : Dichlorodiphényltrichloroéthane.
- **DTNB**: 5, 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate.
- **GST**: Glutathion S-transférase
- **HAP**: Hydrocarbures Polyaromatiques.
- **INSP** : **Institut** National De Santé Publique
- **IOP** : Insecticides Organophosphorés.
- **IPCS** : international program on chemical safety
- **MES** : Matières En Suspensions.
- **OP** : Organophosphorés.
- **OPN** : Organophosphorés Neurotoxiques.
- **PAM** : Plan d'Action pour la Méditerranée.
- **PCB** : Polychlorobiphényles.
- **PNUE** : Programme des Nations Unies pour l'Environnement.
- **RINBIO** : Réseau Intégrateur Biologique.
- **RNO** : Réseau National d'Observation.
- **SNC**: Système Nerveux Central.
- **WHO**: World Health Organization.



Introduction

Partie I : Biosurveillance par l'utilisation de l'Acétylcholinestérase et de la Glutathion S-transférase

1. Les polluants et impact sur l'écosystème.....	3
2. Biosurveillance de la pollution marine.....	8
3. Les outils de la biosurveillance	9
3. 1. Les indicateurs biologiques de pollution.....	9
3.1.1. Critères de sélection des espèces sentinelles.....	10
3. 2. Les marqueurs biologiques de pollution	12
3. 3. Les bioessais.....	19
4. Acétylcholinestérase : Biomarqueur spécifique d'effets neurotoxiques.....	22
4.1. Notion générale sur la transmission cholinergique	22
4.1.1. L'acétylcholine et l'acétylcholinestérase	22
4.2. L'acétylcholinestérase comme biomarqueur de pollution.....	27
4.3. Action neurotoxique des pesticides anticholinestérasiques.....	29
4.3.1. Les organophosphorés.....	30
4.3.2. Les carbamates.....	33
5. Activité glutathion S-transférase (GST) comme biomarqueur d'écotoxicologie....	35
5.1. Stress oxydant : Induction et Effet	32
5.2. Utilisation du stress oxydant comme biomarqueur.....	32
5.3. Caractéristiques générales et fonctions de la glutathion S-transférases	33
5.3.1. Vue d'ensemble de détoxification cellulaire.....	33
5.3.2. Les réactions de biotransformation.....	34
5.4. Mise en évidence de la glutathion S-transférase chez les différents groupes zoologiques.....	35
5.5. Activité glutathion S-transférase (GST)	35
5.6. Le rôle des GST dans la réponse au stress oxydatif	37
5.7. Intérêt des biomarqueurs de stress oxydant en écotoxicologie	37



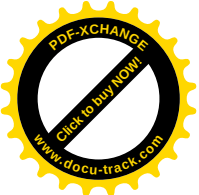
Partie II : *Paracentrotus lividus* espèce bioindicatrice de pollution

Introduction.....	38
1. Noms vernaculaire	38
2. Synonymes.....	38
3. Systématique	39
4. Biologie de l'espèce	39
4.1. Anatomie	39
4.2. Nutrition.....	41
4.3. Reproduction et cycle de vie.....	42
4.4. Respiration et système circulatoire.....	43
4.5. Système nerveux	44
5. Répartition géographique.....	44
6. Habitat	44

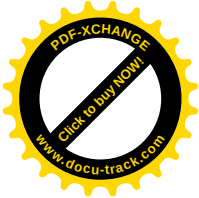
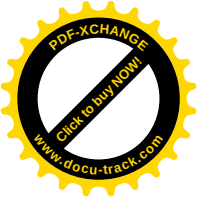
Partie III : Matériels et méthodes

1. Couverture spatiale	45
1.1 Le site de Madagh	47
1.2. Le port d'Arzew	48
2. Couverture temporelle.....	50
3. Méthodologie analytique	52
3.1. Extraction de la fraction S9	52
3.2. Dosage des protéines.....	52
3.3. Dosage de l'activité de l'AChE	53
3.3.1. Expression de l'activité spécifique de l'AChE.....	53
3.4. Dosage de l'activité de la GST	54
3.4.1. Calcul de l'activité de la GST	54
4. Traitements statistiques	55

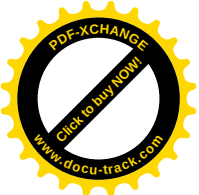
Partie IV : Résultats et discussions



1. Variation de la teneur des organes en protéines.....	56
1.1. Au niveau des plaques ambulacraires.....	56
1.2. Au niveau des cæcums pyloriques.....	57
1.3. Discussion.....	58
2. Activité de l'Acétylcholinestérase	59
2.1. Le choix de l'organe cible	59
2.2. Étude de la variation de l'activité de l'AChE	59
2.2.1. Variation mensuelle de l'activité de l'AChE au niveau du port d'Arzew et Madagh toutes profondeurs confondus.....	59
2.2.2. Variation mensuelle de l'activité de l'AChE au niveau du port d'Arzew et de Madagh en fonction des différentes profondeurs	60
A) Le choix de l'approche par profondeur	60
B) Sédentarité de <i>Paracentrotus lividus</i>	60
C) Résultats	62
3. Activité de la glutathion S-transférase (GST).....	63
3.1. Le choix de l'organe cible	63
3.2. Résultats.....	63
3.3. Discussion	64
Conclusion générale.....	66
Références bibliographiques.....	68



Introduction



INTRODUCTION

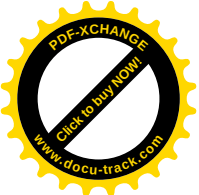
Ces dernières années, on a assisté au développement d'une approche écotoxicologique originale, spécifique aux problèmes environnementaux, appropriée pour les études de terrain et l'estimation des risques engendrés par la pollution sur la santé de l'écosystème par l'utilisation intégrée de mesures biochimiques, physiologiques et chimiques.

Jusqu'à la fin des années 1980, la surveillance de l'environnement reposait essentiellement sur un ensemble de techniques d'analyses physico-chimiques plus ou moins sensibles, menant à l'évaluation des concentrations de polluants dans l'eau, les sédiments et les organismes vivants. L'inconvénient majeur de ces méthodes est peut-être l'absence de renseignements qu'elles fournissent à propos de l'impact réel des molécules chimiques sur les organismes vivants. Le concept de biosurveillance, qui repose sur l'étude de la réponse biologique des êtres vivants aux polluants, répond justement à cette lacune de la chimie conventionnelle ; les effets biologiques des produits chimiques déversés dans le milieu naturel peuvent servir d'indicateurs de pollution (ou biomarqueurs) dans les règnes animal et végétal et permettre la mise en évidence précoce de contaminations du milieu naturel avant l'altération de la structure des organismes (LAFABRIE et *al*, 1992).

En pratique, il a donc été démontré qu'un organisme, évoluant dans des eaux polluées, est sujet à un syndrome de stress qu'il est possible d'identifier et de quantifier à l'aide d'analyses biologiques de coût relativement faible.

Certains effets biologiques ne peuvent être directement rattachés à la toxicité d'un produit chimique bien précis ; ces effets peuvent résulter, soit de la présence d'un seul type de molécule encore méconnu dans le milieu, soit de la conjonction de plusieurs xénobiotiques, qui induit dans tous les cas un état de stress général chez les organismes vivants sans qu'il soit réellement possible de déterminer la part exacte de responsabilité des substances en jeu. La caractérisation de ces effets non spécifiques par des méthodes appropriées permet une évaluation globale de la santé du milieu.

Néanmoins, les symptômes les plus recherchés sont ceux que l'on peut lier à la toxicité d'un contaminant chimique particulier ; ces effets spécifiques renseignent directement sur la nature des xénobiotiques avec lesquels les êtres vivants ont été en contact et, par suite,



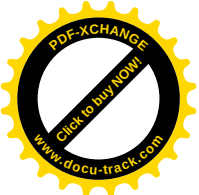
sur l'état de dégradation de l'environnement marin dont ils sont responsables. Les métaux enfin, représentent une catégorie de molécules particulière.

Certains sont purement toxiques pour les êtres vivants ; d'autres, essentiels à l'organisation et à l'entretien des fonctions biologiques, génèrent des effets toxiques sur l'organisme, passé un certain seuil de concentration. Dans les deux cas, leur accumulation à l'intérieur d'un organisme est susceptible de déclencher une réaction de défense, laquelle servira de biomarqueur pour ce type de contamination.

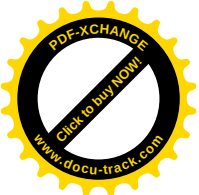
C'est dans cette optique que nous avons choisi d'effectuer une biosurveillance active du littoral oranais, par la mesure de deux biomarqueurs d'écotoxicité, l'acétylcholinestérase et la glutathion S-transférase chez un organisme sentinelle l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* prélevés au port d'Arzew et au niveau du site de référence Madagh,

La présentation de notre travail a été accomplie en suivant le plan suivant :

- Une première partie où l'on a essayé de revoir l'impact du stress environnemental sur les organismes vivants en termes de bioaccumulation et de biotransformation et les outils de la biosurveillance qui nous permettent de l'évaluer et de mesurer son importance.
- La seconde partie traite l'espèce ciblée pour ce travail, *Paracentrotus lividus* et son utilisation comme bioindicateur.
- Dans la troisième partie, le choix des sites de prélèvements et la méthodologie de travail.
- Dans la quatrième partie, nous affichons les résultats et nous les discutons par rapports aux différents sites ciblés et à travers les résultats obtenus lors des précédentes études.



Partie I: Biosurveillance par l'utilisation de l'acétylcholinestérase et la glutathion S-transférase



1. Les polluants et leur impact sur les écosystèmes littoraux et marins :

Le milieu marin est contaminé par de nombreux produits chimiques dont des éléments métalliques rejetés par l'industrie, l'agriculture et les communautés urbaines. Les zones estuariennes et côtières, sous forte influence continentale, sont les plus touchées par cette contamination. L'activité humaine n'a apporté aucun changement dans les volumes de métaux lourds. Il n'y a ni création, ni suppression. Elle a surtout changé la répartition des métaux, les formes chimiques (spéciation) et les concentrations par l'introduction de nouveaux modes de dispersion (fumées, égouts, voitures, ...). Si une partie des métaux lourds part directement dans le sol et les eaux, l'essentiel est d'abord émis dans l'atmosphère avant de rejoindre les deux autres éléments ; lithosphériques et aquatiques (MIQUEL, 2001).

Un polluant ou contaminant est un produit chimique qui existe à un niveau jugé comme étant supérieur à celui qui doit exister normalement dans n'importe quelle composante de l'environnement. Cependant, pour les produits synthétisés par l'homme, tout niveau détectable est considéré comme anormal (AH-PENG, 2003). Dans l'environnement côtier, un polluant est défini comme un agent physique, chimique ou biologique dans un hydrosystème, qui y provoque, par sa concentration dans l'eau, des perturbations préjudiciables au bon équilibre de l'écosystème et en réduit les possibilités d'usages de l'eau. On distingue: les **micropolluants** qui sont les produits actifs minéraux ou organiques susceptibles d'avoir une action toxique à des concentrations infimes (de l'ordre du $\mu\text{g/l}$ ou moins) (tableau 1), et les **macropolluants**, sont des molécules naturelles qui se trouvent dans l'environnement à des concentrations différentes de celles habituellement observées, ce qui entraîne une augmentation de la cinétique des réactions biochimiques.

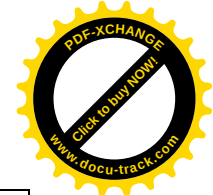
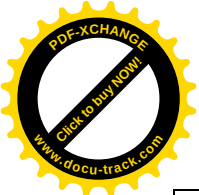
Les polluants agissent au commencement en changeant les propriétés structurales et/ou fonctionnelles des molécules essentielles dans l'activité cellulaire (NEWMAN, 1998). Leurs effets sont principalement exercés donc au niveau moléculaire et les toxiques agissent finalement par des actions chimiques avec des substances biochimiques dans les cellules (MOORE, 1985).

L'analyse chimique des contaminants accumulés n'élucide pas entièrement le potentiel de métabolisation (biotransformation) dans les tissus ; ces réactions peuvent produire des métabolites réactifs qui sont plus toxiques que le composé original. Bien que la biosurveillance soit utile, s'assurant de la distribution des contaminants dans les tissus ; une telle démarche a été critiquée, car des dommages biologiques réels ne sont pas déterminés ; il y a eu en approximativement vingt années de recherche un développement des mesures

subléthales d'un stress induit par la pollution par le biais de biomarqueurs (NICHOLSON & LAM, 2005). Les biomarqueurs peuvent offrir une information plus complète et biologiquement plus appropriée sur l'impact potentiel des contaminants sur la santé des organismes, contrairement à la mesure simple des contaminants accumulés dans le corps de l'organisme (VAN DER OOST et *al*, 1996).

Tableau 1: Classes des micropolluants (KRISHNA DAS, 2006).

Micropolluants minéraux	-métaux traces -Silices et silicates -Amiante -Fluorocarbones
Micropolluants organiques non pesticides	1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques et hétéroaromatiques (HAP) 2. Paraffines chlorées : CH_3Cl, CHCl_3 3. Aromatiques halogénés - Polychlorobiphényles (PCP) - Polychloroterphényles (PCT) - Polychloronaphtalènes (PCN) 4. Aromatiques halogénés avec oxygènes - Polychlorophénols (PCP) - Polychlorodibenzo-para dioxines (PCDD) - Polychlorodibenzofurannes (PCDF) 5. Aromatiques volatils - Benzène - Toluène - Xylène 6. Amines aromatiques (AA), Esters phtaliques, colorants, pigments, surfactants, produits pharmaceutiques...
Pesticides et biocides	1. Organo-halogénés aliphatiques 2. Acides phénoxyacétiques 3. Diphényles (DDT) 4. Cyclodiènes 5. Triazines 6. Carbamates

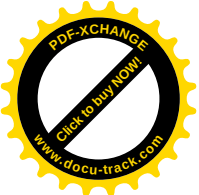


	7. Organophosphorés
	8. Organomercuriels

Pourtant, même après ces années d'étude, notre compréhension et notre connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires effectués par la toxicité des polluants demeurent tout à fait limitées (LIVINGSTONE, 2001). L'étude de ces mécanismes dans les habitats naturels spécifiques est une condition importante pour des futures applications de biosurveillance (MOORE, 2002). Ainsi, on a proposé la mesure de biomarqueurs à des niveaux plus bas d'organisation biologique en tant qu'outils sensibles de détection précoce pour la mesure d'effets biologiques dans l'évaluation de la qualité de l'environnement (CAJARAVILLE et *al.*, 2000).

L'étude des effets toxiques des produits chimiques sur les organismes vivants et leur environnement (écotoxicologie) a pour base les interactions qui existent entre la chimie environnementale et la biologie des effets. Les conditions d'expression de la toxicité dépendent du xénobiotique (teneurs, propriétés physico-chimiques, voies de pénétration, caractère cumulatif), de l'organisme considéré (aptitudes métaboliques, cibles biologiques, état physiologique : âge, sexe) et des paramètres du milieu (température, salinité, pression). La variation donc de certains marqueurs biologiques lors d'une exposition à des contaminants peut aider à la caractérisation des effets de la contamination par des polluants (BOCQUENE et *al.*, 2002). Un xénobiotique est un composé étranger à un organisme particulier qui n'intervient pas dans le métabolisme normal. Il peut être naturel ou fabriqué par l'homme (AHPENG, 2003).

L'élimination de ces composés (xénobiotiques) par les organismes vivants dépend des procédés de métabolisation et d'excrétion. Ils sont dits persistants lorsque la métabolisation ou l'excrétion est incomplète. Les causes d'élimination inefficace des xénobiotiques varient suivant les espèces et les différents groupes d'organismes (Invertébrés ou Vertébrés marins). Certains composés sont donc persistants chez certaines espèces et non chez d'autres. De nombreux hydrocarbures sont plus persistants chez les Invertébrés marins que chez les Vertébrés. D'autres hydrocarbures aromatiques halogénés comme les PCB sont persistants chez tous les animaux. L'accumulation de ces molécules chimiques et leur persistance dans les tissus lipidiques (bioaccumulation) dépendent de facteurs physiologiques (variations saisonnières, reproduction, nutrition), et de caractères environnementaux (température, hydrologie, géochimie du milieu) (RNO, 1994), et résulte d'une interaction entre facteurs



physiologiques (croissance, perte de poids, absorption, stockage), chimique (transfert de métaux, spéciation, biodisponibilité) et environnementaux (température, matière en suspension, chlorophylle) (CASAS, 2005). En d'autres termes, la distribution des xénobiotiques dans les tissus est aussi dépendante de leur concentration dans le milieu, de leur hydrophobicité, de la taille et de la structure chimique de la molécule, ainsi que des capacités métaboliques de chaque espèce (RNO, 2006). En effet, cette biodisponibilité des contaminants est liée à leur forme chimique et à leur liaison plus ou moins forte avec les particules (ANDRAL & ALZIEU, 2004)

L'action toxique d'un xénobiotique peut se résumer en trois phases :

- Phase I : phase d'exposition ;
- Phase II : phase toxicocinétique qui correspond à l'absorption et la redistribution du contaminant ;
- Phase III : phase toxicodynamique durant laquelle le xénobiotique et ses produits de biotransformation peuvent interagir avec les cibles biologiques.

La biotransformation est l'ensemble des réactions biochimiques, en général enzymatiques, capables de modifier la structure des substances exogènes ayant pénétré dans l'organisme, afin d'en favoriser l'élimination (Fig. 1). Ces réactions se déroulent en deux temps : une phase de dégradation (le plus souvent sous forme d'oxydation) et une phase d'hydratation. Ceci a pour résultat de rendre les produits exogènes solubles dans l'eau et donc d'en faciliter l'excrétion. L'existence d'un tel système de métabolisation a été démontrée chez la truite pour la première fois en 1965 (RNO, 2003).

Il existe des systèmes enzymatiques appelé « de phase I » qui interviennent dans l'oxydation du xénobiotique afin qu'il soit mieux intégré dans le métabolisme normal des composés biotiques. Il s'agit dans la plupart des cas de réaction de monooxygénation pouvant induire des composés intermédiaires plus toxiques que le produit initial.

Ces composés intermédiaires ont la capacité, dans certaines conditions, de se lier aux macromolécules du vivant notamment aux acides nucléiques de l'ADN en formant ce qu'on appelle des « adduits ». Ce processus, par les risques mutagènes qu'il peut entraîner, constitue une des étapes précoces de la cancérogenèse (BOCQUENE et *al*, 2002).

Le métabolisme oxydatif est impliqué dans la synthèse de molécules endogènes comme les hormones stéroïdes, les acides gras, les vitamines, les acides biliaires, les prostaglandines, et dans la transformation de molécules exogènes tels que les polluants organiques (RNO, 2006).

Temps I : Addition d'un groupe fonctionnel (hydrxyl, carboxyl,sulphydryl,...) à la molécules exogène



Temps II : conjugaison moléculaire exogène + molécule endogène



Produit final (substance plus hydrosoluble facilement excrétée)

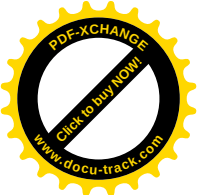
Fig. 1 : Les deux phases de la biotransformation (MALBROUK, 2005)

Les impacts des activités humaines sur la diversité biologique, du niveau génique à celui de l'écosystème, sont plus manifestes dans les zones côtières (PNUE/PAM, 2004). En effet, elles sont exposées à toute une série de menaces, parmi lesquelles la commission mondiale de l'environnement et de l'aménagement a pu en citer les causes (RNO, 2006). Les activités qui sont connues pour porter significativement atteinte à la biodiversité de l'écosystème comprennent le trafic maritime (déversements d'hydrocarbures, introduction d'espèces exogènes), les activités industrielles (effluents chimiques), les opérations de dragage et d'immersion, la pêche et la mariculture, les invasions biologiques, le tourisme, etc. (PNUE/PAM, 2004).

En Méditerranée, les principaux stressseurs que l'on a mis en évidence (AEE, 1999) et qui occasionnent des altérations de la biodiversité et, portant une dégradation de la qualité des écosystèmes, sont les suivants (PNUE/PAM, 2004):

1. l'eutrophisation résultant de l'agriculture, du développement urbain et touristique;
2. la pollution industrielle et par les hydrocarbures;
3. la pêche, l'exploitation des ressources biologiques et la mariculture;
4. les invasions biologiques par suite du trafic maritime et de l'aquaculture;
5. la perte d'habitats.
6. les eaux usées provenant des agglomérations.

L'impact de la pollution chimique/industrielle, tout comme celui de l'eutrophisation, sur la diversité biologique, sont parmi les mieux étudiés à toutes les échelles (spatiale, temporelle). Les impacts de ces stressseurs sont semblables, et ne sont donc pas faciles à



distinguer à la plupart des niveaux, à l'exception du niveau des organismes (effets biologiques).

2. Biosurveillance de la pollution marine :

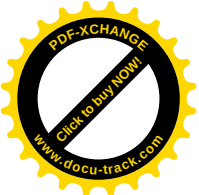
Les réponses aux grandes questions scientifiques que pose la protection de l'environnement littoral passent nécessairement par une meilleure connaissance des mécanismes de toxicité, afin d'améliorer l'évaluation prédictive des impacts. Aujourd'hui, les connaissances acquises sur le fonctionnement des écosystèmes permettent une meilleure appréciation de la capacité d'acceptation du milieu. Ceci pose la question des stratégies de surveillance de l'environnement, mais également des méthodologies permettant de connaître les tendances d'évolution à long terme des paramètres de qualité du milieu et des niveaux de contamination des populations (RNO, 2003).

La mesure directe des contaminants dans l'eau fait appel à des techniques analytiques sophistiquées et coûteuses, difficilement applicables à de grandes séries d'échantillons. Par ailleurs, la variabilité temporelle du milieu littoral ne confère que peu de représentativité à une mesure ponctuelle dans la colonne d'eau (RINBIO, 2001).

L'écotoxicologie marine est maintenant en mesure de proposer un premier élément de réponse à l'évaluation de l'effet des polluants par le développement d'indicateurs biologiques ou bioindicateurs (RNO, 2006).

La présentation d'indicateurs, la justification scientifique de leur utilisation, ainsi que la liaison entre les différents niveaux sont présentés pour les différents échelons d'organisation biologique ci-après. Malheureusement, les liens entre les niveaux biochimiques et écologiques sont aujourd'hui encore difficiles à établir formellement (PNUE/PAM, 2004).

- Au niveau génique: biomarqueurs moléculaires pour déceler les modifications génétiques induites au niveau des organismes et/ou de la population;
- Au niveau des organismes: biomarqueurs pour mesurer les effets biologiques: biochimiques à physiologiques ↔ Liaisons avec le niveau moléculaire;
- Au niveau des populations: il comprend la génétique démographique pour détecter les stress, les modifications morphologiques et les modifications de la dynamique démographique ↔ Liaisons avec les niveaux moléculaires et écosystémiques ;
- Au niveau des communautés: composition, structure et fonction communautaires – toute une série ou une combinaison d'indicateurs écologiques ↔ Liaisons avec le niveau de la population;



- Au niveau des habitats: surveillance des habitats d'espèces clés ↔ Liaisons avec les niveaux de la population et de la communauté. Ce niveau comprend la surveillance des Oiseaux et des Mammifères, ainsi que des écosystèmes intacts comme les aires spécialement protégées.

3. Les outils de la biosurveillance : biomarqueurs, bioindicateurs et bioessais :

3. 1. Les indicateurs biologiques de pollution :

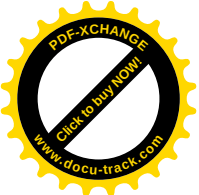
La notion d'indicateur biologique a évolué d'années en années. Au départ, le terme de bioindicateur désignait tout organisme ou système biologique qui, par sa présence ou son absence, était caractéristique d'un milieu précis ou alors révélait l'incidence d'un facteur particulier.

Ce terme désigne alors des espèces biologiques ou animales qui, du fait de leurs particularités écologiques, réagissent à un polluant par une modification nette et spécifique de leurs fonctions vitales (ULMER, 1997). Et plus précisément un indicateur biologique est un organisme ou un ensemble d'organismes qui –par référence à des variables biochimiques, cytologiques, éthologiques ou écologiques- permet de façon pratique et sûre de caractériser l'état d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées (BLAUDIN, 1986).

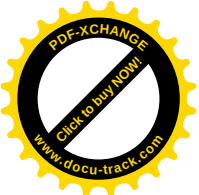
3.1.1. Critères de sélection des espèces sentinelles :

Afin de refléter l'intensité des expositions, intégrer les différents paramètres de l'environnement, et pouvoir déterminer les effets d'une exposition de faible intensité mais pendant une longue période, les organismes sentinelles prélevés dans un milieu doivent être représentatifs de ce milieu et remplir plusieurs conditions. Toutefois, dans certains cas, des individus peuvent aussi être transplantés et maintenus sur le site dans des enclos (biosurveillance active) afin de suivre l'évolution d'une contamination ou d'une décontamination, et leurs impacts sur les individus, en limitant les effets des facteurs biotiques.

Les espèces sentinelles ont été recherchées dans tous les milieux. De nombreux auteurs (Rand, 1985 ; NRC, 1991 ; Rivière, 1993 ; White, 2004 ;...) ont dressé des listes des caractéristiques à privilégier chez ces espèces, mais des différences peuvent être rencontrées, en particulier en fonction du sens accordé à la notion de sentinelles et du type d'exposition (en laboratoire ou en nature). Les caractéristiques les plus couramment citées sont discutées ci-dessous :



- **Leur sédentarité** sur la zone d'étude afin que l'état des individus puisse être directement corrélé avec le niveau de pollution du site. Des animaux se déplaçant sur de grandes distances ou ne visitant les sites étudiés qu'occasionnellement ne peuvent en effet être le reflet du niveau de contamination du lieu où ils auront été capturés. A cet égard, les animaux sessiles ou faiblement mobiles sont donc privilégiés ;
- **Leur facilité d'identification, de capture ou de récolte** tout au long de l'année, ce qui nécessite une bonne connaissance de l'écologie de l'espèce comme ses réponses adaptatives aux variations spatiotemporelles des facteurs environnementaux en zone estuarienne et côtière (température, salinité..) ou ses migrations liées à la reproduction ;
- **Une taille de la population suffisante** car l'impact de prélèvements réguliers sur la structure et la densité de la population doit être négligeable. De plus, l'importance de cette population conditionne la rapidité des prélèvements, et entre ainsi en compte dans l'estimation de la faisabilité et du coût de la surveillance ;
- **Une aire de dispersion large et continue**, ce qui permet les comparaisons entre différents sites, mais augmente également la probabilité de trouver des sites aussi peu impactés que possible par la pollution. Il est toutefois impossible de trouver une espèce totalement cosmopolite et des espèces voisines, autochtones ou allochtones, peuvent alors être utilisées.
- **Une longévité de plusieurs années et une résistance aux polluants** présents, afin que les individus soient au contact des contaminants pendant des périodes suffisantes pour que les changements des biomarqueurs atteignent un niveau mesurable. Cette persistance des individus dans le milieu permet également de suivre l'évolution des paramètres étudiés au cours du temps, et éventuellement d'apprécier la réversibilité des dommages si des mesures sont prises pour réduire le niveau de contamination. Toutefois, la majorité de ces espèces ayant une longévité très inférieure à celle de l'espèce humaine, les désordres occasionnés par les polluants s'y manifestent plus rapidement, éventuellement sans les périodes de latence observées chez les animaux longévifs ;
- **Des relations dose/effet et cause/effet** doivent pouvoir être établies. Tout d'abord l'espèce doit présenter une réponse claire (effet) à une augmentation mesurable du niveau de contaminant (dose). Les espèces sentinelles, bien que résistantes aux contaminants, doivent toutefois présenter une sensibilité suffisante à ces substances pour que des dysfonctionnements apparaissent, et que ceux-ci soient mesurables par



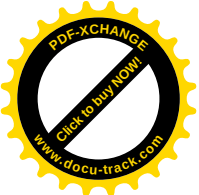
des techniques d'utilisation courante. Cette relation est souvent difficile à établir du fait de l'éloignement des sources de xénobiotiques, et des interactions avec d'autres facteurs de stress (relation cause/effet). Par ailleurs, les réponses des organismes à ces polluants doivent être précoces pour repérer la dégradation dès son apparition, afin que des dommages écologiques substantiels soient évités et que la remédiation ne devienne extrêmement problématique ;

- **La biologie de l'espèce** doit être suffisamment connue pour différencier le signal du bruit de fond. En effet, une variabilité intraspécifique des réponses biologiques utilisées comme biomarqueurs a été couramment observée, rendant difficile l'interprétation des données. De plus, il est important de pouvoir disposer en parallèles d'organismes témoins, afin de différencier les changements dus aux contaminants des fluctuations naturelles (saisonniers, interannuelles,...) du paramètre étudié. Enfin, la caractérisation des individus doit être parfaitement maîtrisée si les biomarqueurs qui seront étudiés présentent des variations en fonction du sexe, de l'âge,...

L'intérêt du grand public pour certaines espèces est également un critère parfois pris en compte pour la sélection de ces espèces sentinelles. Sont alors évoquées les notions de valeur récréatives (pêche des salmonidés, pêche sportive de l'espadon...), économiques (espèces commerciales), d'espèces protégées et d'espèces patrimoniales comme la mégafaune charismatique des dugongs, des tortues, des pinnipèdes, des cétacés ou des ours polaires,...

3. 2. Les marqueurs biologiques de pollution :

Les écosystèmes aquatiques sont l'objet de programmes de surveillance qui cherchent à quantifier, mais aussi à prévenir l'impact des pollutions. Or, les mesures chimiques ont leurs limites : elles ne renseignent pas sur les effets de mélanges de contaminants. L'idéal serait de prédire les effets biologiques (à tous niveaux d'organisation biologique) à partir d'informations sur la contamination et, réciproquement, de diagnostiquer une pollution *in situ* (concentration dans le temps et l'espace) à partir uniquement du minimum de mesures biologiques chez le minimum d'espèces. Dans cet esprit, les scientifiques ont développé de multiples méthodes de mesure de variables biologiques et écologiques qui viennent compléter les analyses chimiques. Par exemple, il est très intéressant de mesurer des marqueurs biochimiques qui détectent une réaction de défense de l'organisme vis-à-vis du polluant toxique (hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), polychlorobiphényles (PCB), métaux lourds, produits phytosanitaires...). Ce ne sont ni des dosages chimiques ni des



mesures traditionnelles de bioindication, mais ces marqueurs biologiques quantifient un niveau d'interaction toxique entre l'organisme et un polluant biodisponible et ceci de façon précoce avant que des effets irréversibles n'apparaissent (AMIARD et *al*, 1998a).

Les rapports entre l'exposition face aux contaminants chimiques et les changements de plusieurs processus biochimiques chez un organisme peuvent permettre l'utilisation de ce dernier comme marqueurs biologiques (généralement désigné sous le nom de biomarqueurs) d'exposition et des premières réponses aux contaminants chimiques. Ce concept est dérivé de l'idée qu'un effet toxique se manifesterait au niveau subcellulaire avant que ces effets ne soient apparents à des niveaux plus élevés d'organisation biologique. La mesure des réponses biochimiques et physiologiques face aux contaminants chimiques chez un organisme peut servir à améliorer l'évaluation des expositions biologiquement significatives aux produits chimiques anthropogènes toxiques, et augmente la capacité d'évaluer le risque d'effets sur la santé et la survie des populations exposées (STIEN et *al*, 1998).

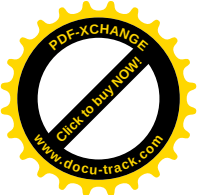
Les biomarqueurs ont été, à l'origine, développés dans le secteur médical (médecine de travail) et les sciences vétérinaires. Et là, ils sont en phase croissante dans leur utilisation sur les Invertébrés en particulier les bivalves comme biomarqueurs pour l'évaluation de la pollution marine (NICHOLSON, 1999 a, b ; 2003a).

Le biomarqueur toxicologique serait la réponse biologique (biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale) qui, dans un tissu, dans les liquides corporels ou au niveau d'un organisme dans son ensemble, donne une mesure d'exposition à un toxique et/ou d'effets produits par un ou plusieurs polluants. Les biomarqueurs sont des outils importants en toxicologie. Ils permettent d'améliorer l'évaluation du risque d'altérations cellulaires résultant d'une exposition à des xénobiotiques (WIRTH et *al.*, 2003).

À ce jour, un certain nombre d'avantages et de limitations ont été relevés dans l'utilisation des biomarqueurs. Au nombre des avantages, l'on peut mentionner les éléments suivants (PNUE/PAM, 2004):

- les événements moléculaires, biochimiques ou cellulaires ont tendance à être plus sensibles, moins variables, mieux conservés entre les espèces, et souvent plus faciles à mesurer que les indices de stress communément étudiés au niveau des organismes;
- les altérations moléculaires et biochimiques sont les premières réponses quantifiables décelables aux modifications environnementales;
- les marqueurs moléculaires et biochimiques peuvent servir à la fois d'indicateurs d'exposition et d'effets dans les organismes.

Mais il convient toutefois d'observer que:



- L'âge, le régime alimentaire, les facteurs environnementaux, les variations saisonnières et le cycle de reproduction peuvent modifier un certain nombre d'états structurels représentant la normalité et seraient susceptibles d'être déroutants lorsqu'on s'emploie à utiliser des critères morphologiques comme biomarqueurs d'effet;
- Il pourrait exister des chevauchements entre un état toxique anticipé et certains aspects de la gamme de morphologie normale;
- Il est difficile de relier les réponses biochimiques à la santé de l'organisme et à des effets adverses sur la population, le type d'information qui est souvent le résultat final de la surveillance de l'environnement. Toutefois, ce problème peut être surmonté en choisissant des biomarqueurs qui détectent des événements cellulaires et biochimiques intimement associés à la protection et à la défense de la cellule contre les agressions environnementales.

Différentes catégories de biomarqueurs ont été identifiées : des biomarqueurs d'**exposition** et de réponses (ou **d'effet**), ou des biomarqueurs de stress **général** et **spécifique** (LAFONTAINE et *al*, 2000). A cet effet, dans l'évaluation de la qualité de l'environnement, des biomarqueurs d'exposition et d'effets sont employés chez des organismes bioindicateurs choisis parmi une communauté exposée (LUND AMADO, 2006).

Par exemple, les métallothionéines et les enzymes antioxydantes, qui ont pour fonction de complexer ou de métaboliser des composés nocifs, appartiennent à la catégorie des biomarqueurs d'exposition. Ils indiquent la présence de xénobiotiques plutôt que leur toxicité (WIRTH et *al*, 2003).

Les biomarqueurs écotoxicologiques sont maintenant classés en 4 catégories (DELPEDGE, 1993) (tableau 2):

1. **Biomarqueurs d'exposition**, ils ont l'avantage de quantifier les contaminants biodisponibles ;
2. **Biomarqueurs d'effets**, ils intègrent les effets dus à de multiples stressseurs ;
3. **Biomarqueurs d'exposition et d'effets**, ils utilisent une réponse biologique normalement observée en conditions naturelles
4. **Biomarqueurs d'effets chroniques**, de nature écologique.

Les biomarqueurs d'**effets** sont indicateurs d'une réponse non spécifique au stress engendré par une exposition à de multiples agents stressseurs. Les mesures utilisées englobent tous les paramètres fonctionnels affectés par un stress.

Les biomarqueurs d'**exposition** sont définis comme tout xénobiotique, son métabolite ou produit d'interaction entre le xénobiotique et une molécule ou cellule qui sont mesurées dans les organismes ou en sous unité de l'organisme (DEPLEDGE et *al.*, 1995; LOPEZ-BAREA & PUEYO, 1998).

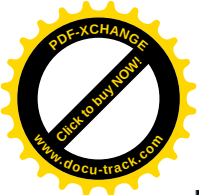
Ainsi, certains biomarqueurs vont pouvoir indiquer des dysfonctionnements physiologiques ou même des lésions chez les espèces étudiées et permettre d'obtenir des indications sur l'état de santé des écosystèmes et de compléter les études de biosurveillance (AH-PENG, 2003).

Les biomarqueurs peuvent être qualifiés selon deux critères :

- Soit **d'indices de stress généraux** traduisent une réponse de l'organisme à un ensemble de polluants sans permettre de déterminer la nature même de ces polluants.
- Soit **d'indices de stress spécifiques** traduisent une réponse de l'organisme à une famille de polluants. Il s'agit par exemple, des métallothionéines qui sont des protéines qui peuvent être induites par les métaux lourds ou de l'acétylcholinestérase inhibée par la présence de pesticides organophosphorés et de carbamates (PEAKALL, 1992).

Tableau 2: Différents biomarqueurs utilisés pour le diagnostic écotoxicologique (PEAKALL, 1992).

Type de biomarqueur	Genre de réponse biologique
Biomarqueurs d'effets	-Réserves énergétiques, biomarqueurs d'effets, intégrateurs de la condition physiologique (HUGGETT et <i>al.</i>, 1992). -Potentiel de croissance (Scope for growth): paramètre intégrateur du statut énergétique d'un organisme; (WIDDOWS, 1985). -Paramètres endocriniens: indicateurs généraux de stress (catécholamines et corticostéroïdes; mécanismes moléculaires de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique chez les poissons) (MARTINOLI, 1991). -Indices de condition: indicateurs généraux de stress, indicateurs de la santé des organismes (PELLERIN-MASSICOTTE, 1994). -Fragilité de la membrane lysosomale: indicateur général de stress, au niveau cellulaire, intégrateur de la condition physiologique (PELLERIN-MASSICOTTE, 1994).



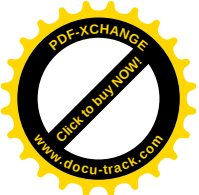
Biomarqueurs mixtes d'exposition et d'effets	-Réponses moléculaires : Synthèses protéiques et enzymatiques; les premières à être détectées et mesurées: -Métallothionéines (COUILLARD <i>et al.</i>, 1995) -Enzymes métaboliques (HUGGETT <i>et al.</i>, 1992) -Enzymes reliées à l'élimination des radicaux libres (CAT et SOD) (OLSVIK, 2005). -Modifications histopathologiques: changements structuraux au niveau des organes reliés à la contamination et à l'état de santé général des organismes et en particulier des poissons (MALLATT, 1985; HINTON, 1990)
Biomarqueurs d'effets chroniques	Paramètres écologiques: abondance, diversité, structure des communautés (DESROSIERS, 1984, 1986, 1990 ; LAGADIC, 1994).

Tableau 2 (suite) : Différents biomarqueurs utilisés pour le diagnostic écotoxicologique (PEAKALL, 1992).

Type de biomarqueur	Genre de réponse biologique
Biomarqueurs d'exposition	-Estimation de l'exposition à des substances génotoxiques; diminution de l'immunocompétence (SECOMBES et <i>al.</i>, 1989; TRAVIS, 1993). -Apparition de tumeurs, néoplasies ou maladies reliées à une immunosuppression Produits métaboliques comme biomarqueurs d'exposition : Métabolites de substances xénobiotiques (Réactions de Phases I et II) -Oxygénases à fonctions mixtes (OFM). -Acétylcholinestérase (AChE) : biomarqueur d'exposition aux organophosphorés et aux carbamates (GIAM, 1987). Modifications au niveau de l'ADN : Estimation de l'exposition à des substances génotoxiques (SIKKA et <i>al.</i>, 1989; TRAVIS, 1993).

Un critère critique pour un bon biomarqueur devrait être sa capacité de distinguer les emplacements ou les endroits avec la qualité de l'eau (LAU et *al.*, 2004). Certains auteurs (MAYER et *al.*, 1992 ; ENGEL & VAUGHAN, 1996) ont ainsi rappelé les critères pour le choix et la « calibration » d'un biomarqueur destiné à une utilisation sur le terrain et qui puisse apporter des informations relatives au risque pour les écosystèmes :

- mesure simple et sensible ;
- variabilité aux facteurs non toxiques (organisme, environnement, méthode) qui soit bien comprise et dans des limites acceptables ; valeurs témoins en sites non contaminés ;
- réponse dépendant simplement de la dose et du temps et qui permette une quantification de l'exposition ou de l'effet à partir de la mesure du biomarqueur ; capacité du biomarqueur à distinguer les situations polluées (pollution simple ou complexe) des situations non polluées ;
- signification biologique : pouvoir prédictif du biomarqueur quant à des effets à des niveaux biologiques supérieurs (reproduction...) ; éventuellement prédiction des risques pour l'homme.



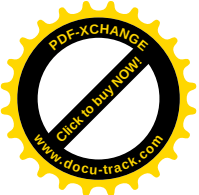
La mesure de ces biomarqueurs moléculaires a donc des avantages évidents dans la détection des impacts précoces liés aux expositions aux polluants. En raison du potentiel d'induction de la réparation cellulaire, ces marqueurs primaires peuvent ne pas refléter la concentration ambiante en toxique, et ils devraient être principalement employés comme indicateurs d'exposition (comme un signal de détection précoce), plutôt que dans l'évaluation quantitative de la pollution (NICHOLSON & LAM, 2005).

Les études entreprises pendant les dernières années dans le développement de biomarqueurs d'exposition aux polluants dans l'environnement aquatique, ont indiqué la nécessité d'intégrer les interactions de facteurs abiotiques (température, salinité, turbidité, etc...), et de facteurs biotiques (cycle de reproduction, croissance, âge, sexe, etc....) (NORTON *et al*, 2000).

Dans le cas de pollution chronique, l'action des substances toxiques peut ne pas être prédominante, mais liée à plusieurs facteurs de stress environnementaux. En combinaison avec d'autres facteurs environnementaux, les polluants peuvent contribuer à l'affaiblissement des mécanismes de défense et de régulation chez les espèces étudiées. Ainsi, les biomarqueurs d'exposition concernant les mécanismes de régulations physiologiques sont sujets à des variations qui rendent difficile la détection des effets spécifique des polluants chimiques. Une bonne compréhension du niveau basique des biomarqueurs dans des sites spécifiques (légèrement et fortement souillés), et une bonne étude des facteurs physiologiques (croissance, respiration, reproduction), peut indiquer si l'état physiologique de l'organisme est affecté (SMOLDERS *et al*, 2002).

Revenant aux biomarqueurs d'effets biologiques de pollution environnementale, qui ont été identifiés comme outils utiles pour l'évaluation de l'impact de pollution sur les organismes marins ; cela est dû à leur sensibilité, facilité relative d'application, bas coût, et spécificité (HUGGETT *et al.*, 1992 ; WALKER & LIVINGSTONE, 1992 ; WHO, 1993 ; GALLOWAY, 2002 ; BINELLI, 2006 ; FRASCO, 2006). Les biomarqueurs d'effets représentent le changement biochimique, physiologique, comportemental qui peut modifier le bien être d'un organisme (VAN DER OOST *et al*, 2003).

L'interprétation des résultats des niveaux de biomarqueurs est souvent compliquée par les variations environnementales et biologiques sur une base saisonnière qui ne sont pas liées aux variations chimiques (SHEEHAN & POWER, 1999 ; WILHELM *et al*, 2001;). Aussi, le cycle de croissance et une salinité extrêmement basse ont montré l'induction de variation de biomarqueurs (LAU *et al*, 2004).



3. 3. Les bioessais : (biosurveillance active)

La biosurveillance active est basée sur la comparaison des propriétés chimiques et/ou biologique des échantillons dans lesquels ont été rassemblés à partir d'une population et qui ont après randomisation et translocation, été exposés aux différentes conditions des emplacements à surveiller (ROMEO et *al.*, 2003). De récentes études ont montré que la transplantation des Mollusques d'un emplacement de référence (sein ou moins pollué) à un secteur pollué, peut être une stratégie pour biosurveiller les effets du changement environnemental des zones côtières ou d'estuaires (NASCI, 2002 ; ROMEO et *al.*, 2003; HONKOOP, 2003 ; BODIN, 2004 ; FRENZILLI, 2004 ; GEFFARD, 2005).

Cette technique des stations artificielles est utilisée depuis la fin des années 1970. Les objectifs sont diversifiés : suivi de rejets (industriels, station d'épuration, dragage, eaux usées urbaines), étude d'impact, détection locale de contamination, surveillance (ODZAC et *al.*, 2000 ; HONKOOP et *al.*, 2003 ; MARTEL et *al.*, 2003). Elle se heurte à un certain nombre de contraintes au premier rang, ceux de pouvoir mettre en œuvre un mouillage capable de maintenir en stabulation les échantillons et de leur garantir des conditions de survies acceptables. Différents systèmes plus ou moins élaborés ont été réalisés : de la simple ligne de mouillage sur laquelle l'échantillon est directement fixé dans un filet à la ligne de satellite permettant de stabuler plusieurs échantillons dans des paniers en plastique inerte spécialement conçus à cet effet.

Aussi, tous les programmes de surveillance utilisant des transplants à une large échelle spatiale se trouvent confronté au suivi de secteurs hétérogènes des points de vue physico-chimique et trophique. En dépit d'un protocole standardisé, la variabilité des milieux peut brouiller le signal obtenu par la mesure directe des contaminants dans la chair du biointégrateur. Par exemple, pour certains métaux, la croissance agit comme un facteur de dilution de la quantité de contaminant incorporée, l'amaigrissement comme un facteur de concentration (CASAS, 2005).

Cependant, ces techniques de *Caging* ont été fortement développées ces dernières années (DA ROS et *al.*, 2002; MOUGRAUD et *al.*, 2002; ROMEO et *al.*, 2003). Elles ont divers avantages tels que:

- l'uniformité génétique des individus de la même cohorte (limitant de ce fait les variations naturelles) et la possibilité de placer les cages de moules dans des sites où elles ne sont pas présentes naturellement (BODIN et *al.*, 2004),
- la sélection des stations d'échantillonnage indépendamment de la présence ou pas de populations naturelles et de leur distance à la côte (CASAS, 2005).

- la possibilité du choix du site, la maîtrise de la durée d'exposition des moules (intégration de la réponse) et le contrôle de la mise en place des transplants (AH-PENG, 2003).
- L'optimisation des mesures par l'utilisation d'échantillons homogènes au regard de la population d'origine, de la taille, de l'âge et de leur environnement (CASAS, 2005).
- Elle permet également de déployer stratégiquement des stations le long de gradients physiques et chimiques ou de les placer près de sources potentielles de pollution, comme le sédiment ou les zones de rejet en mer, pour en suivre l'impact

Tableau 3: Différences observées entre les biosurveillances active et passive (PEAKALL, 1992).

Biosurveillance active	Biosurveillance passive
Les temps d'exposition des transplants sont plus longs (plusieurs semaines).	Les résultats peuvent être obtenus en quelques jours.
Les résultats illustrent la pollution pendant la période d'exposition	Les résultats démontrent la pollution des années précédentes.
Coût supplémentaire relatif aux matériaux et aux temps de préparation des transplants avant la phase d'exposition.	Coûts liés aux transports des échantillons et aux analyses chimiques.
Suivi temporel possibles des caractères hydrologiques : température, salinité, O ₂ , pH...avec la fréquence souhaitée.	Prélèvement des caractères hydrologiques lors des échantillonnages.
Suivi temporel possible des concentrations en contaminants (métaux lourds dissous et particulaires, PAH, PCB...) avec la fréquence souhaitée.	Prélèvement et dosage des contaminants de retour au laboratoire après l'échantillonnage.
Présence de risque de vandalisme.	Aucun risque de vandalisme
Suivre l'impact d'une pollution ponctuelle même si l'espèce sentinelle n'y est pas implantée naturellement.	Suivre l'impact d'une pollution que si y'a présence de l'espèce cible.

4. Acétylcholinestérase : Biomarqueur spécifique d'effets neurotoxiques

4.1. Notion générale sur la transmission cholinergique :

4.1.1. L'acétylcholine et l'acétylcholinestérase :

L'acétylcholine (ACh) est l'ester acétique de la choline, corps basique azoté dérivé de l'ammonium quaternaire. On classe l'ACh parmi les composés naturels appelés médiateurs chimiques ou transmetteurs synaptiques qui réalisent la transmission de l'influx nerveux à un effecteur, neurone ou fibre musculaire (Fig. 3 et 4), assurant la contraction des muscles et produisant, au niveau des viscères, des effets dits muscariniques (dilatation des vaisseaux, ralentissement du cœur, stimulation des sécrétions glandulaires, de la motricité intestinale, etc.) ; elle exerce par ailleurs, au niveau des ganglions sympathiques un rôle dit nicotinique, inversant certains effets précédents. (ECOBICHON, 1996).

L'acétylcholine est le médiateur non seulement des terminaisons parasympathiques mais aussi de la transmission ganglionnaire et neuromusculaire, ainsi que de nombreuses synapses du système nerveux central. D'ailleurs, les racines motrices renferment des quantités élevées d'ACh et possèdent une forte activité de choline-acétylase.

Les nerfs sympathiques ou les ganglions sympathiques peuvent contenir jusqu'à 300 millimicromoles d'ACh par gramme d'organe frais.

Formule de l'acétylcholine : b-acétoxyéthyl-triméthyl-ammonium. (Fig. 2)

Elle a été préparée par voie synthétique en 1867 et peut être obtenue aisément en chauffant de la choline avec l'anhydride acétique. Elle se conserve longtemps en milieu acide (pH 3,9) mais son hydrolyse est très rapide en milieu alcalin (pH 12) et libère l'acétate et la choline. (ECOBICHON, 1996).

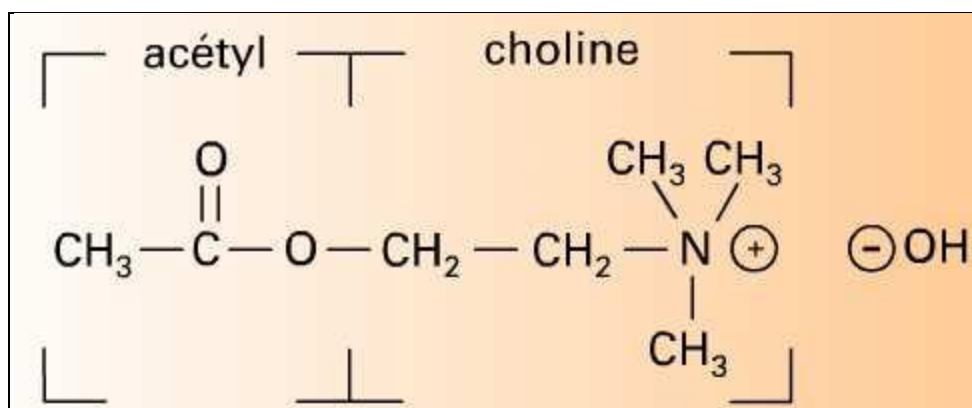


Fig. 2 : Structure chimique de l'Acétylcholine.

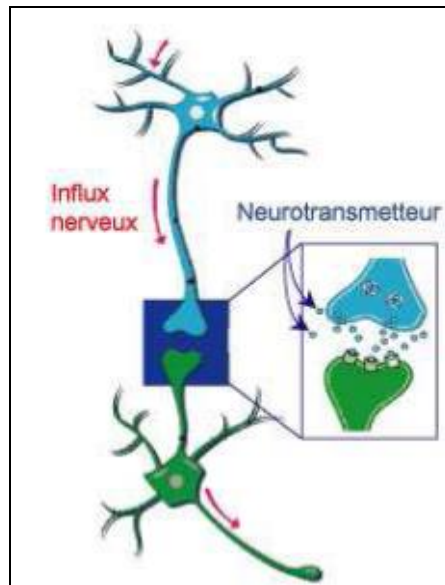


Fig.3 Transmission de l'influx nerveux (HARVEY-GIRARD, 2005).

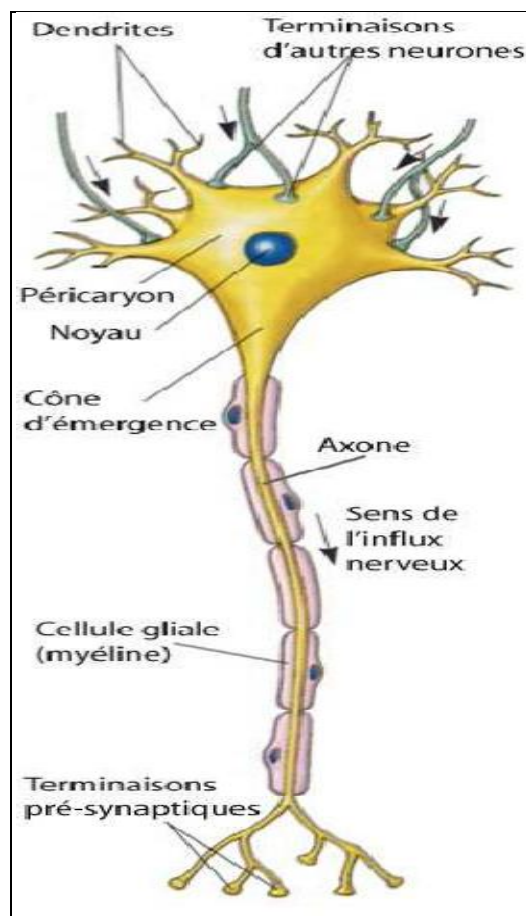
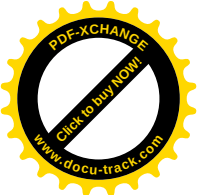


Fig.4 : Schéma général d'un neurone (HARVEY-GIRARD, 2005).

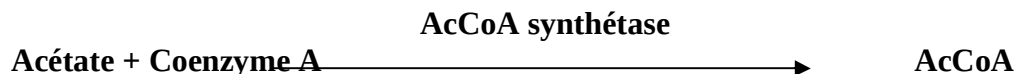


L'acétylcholine est un médiateur qui existe dans le tissu nerveux essentiellement sous forme inactive liée à une protéine, ce qui le protège contre la destruction enzymatique. Dans les terminaisons présynaptiques, l'acétylcholine est contenue dans des vésicules, à raison de 5000 à 10 000 par vésicule. Sous l'influence de l'influx nerveux, ces vésicules migrent vers la membrane et libèrent l'acétylcholine dans la fente synaptique (Fig. 5 et 6). Dès sa libération, elle subit une hydrolyse par l'acétylcholinestérase (AChE) (ECOBICHON, 1996).

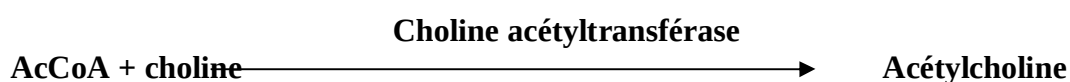
Presque simultanément la choline-acétylase assure la néosynthèse d'ACh qui est stockée sous sa forme inactive liée (Fig. 6). Ces enzymes AChEs empêchent l'accumulation aux jonctions synaptiques tout en les rendant disponibles par de nouvelles stimulations des récepteurs cholinergiques qui viennent d'être activés (INSP, 2007). L'AChE, qui dissocie spécifiquement l'ACh en acide acétique et en choline, a été trouvée dans le tissu nerveux de toutes les espèces animales examinées.

L'acétylcholine est une molécule flexible, c'est-à-dire susceptible d'adopter un certain nombre de conformations privilégiées et de stimuler plusieurs types de récepteurs. Elle est synthétisée en deux étapes :

1) D'abord formation de l'acétyl Coenzyme A, AcCoA, selon la réaction suivante catalysée par l'AcCoA synthétase, étape limitante de la synthèse.



2) Puis formation de l'acétylcholine à partir de la choline grâce à une choline acétylase ou choline acétyltransférase



Sa distribution tissulaire de l'acétylcholine est très large. Elle est présente :

- dans le système nerveux central : cerveau, moelle, nerf.
- dans le système nerveux végétatif : au niveau des relais ganglionnaires sympathiques et parasympathiques et au niveau des terminaisons parasympathiques.
- au niveau des terminaisons présynaptiques de la jonction neuromusculaire.

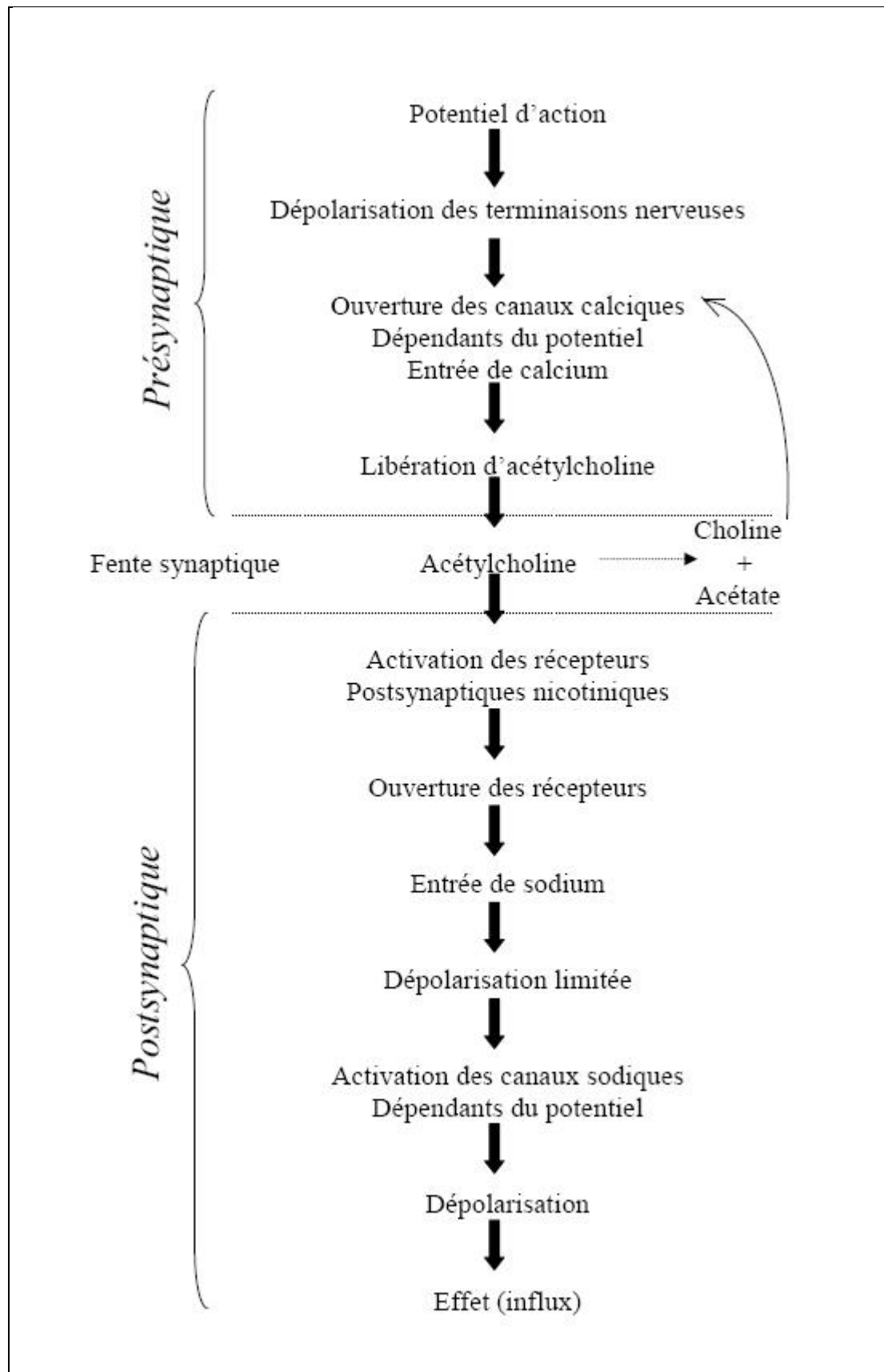


Fig. 5 : Recyclage de l'acétylcholine (PHARMACORAMA)

L'acétylcholine est une enzyme qui présente des particularités fonctionnelles étonnantes, c'est une des enzymes les plus rapides, l'acétylcholine est hydrolysée à des vitesses variant de 10^6 à 10^7 molécules à la seconde, à une vitesse limitée par les constantes de diffusion alors que son site actif est hautement structuré, permettant la spécificité pour le substrat (FOURNIER, 2006).

Son travail consiste en fait à découper la molécule d'acétylcholine en deux molécules: en acétyl et en choline (Fig. 6). L'acétyl détaché se lie alors à la coenzyme-A (agent d'acétylation de la choline) et devient acétyl coenzyme-A (ACo-A). Les molécules de ACo-A ainsi que de choline sont, par la suite, recaptées par le bouton synaptique afin d'être réutilisées. L'ACo-A est alors acheminé dans les mitochondries où est détaché l'acétyl de la coenzyme A. Les molécules d'acétyl détachées ainsi que les molécules de choline sont par la suite envoyées à la choline acétyltransférase (ChAT) qui les fixera de nouveau ensemble. Les molécules d'acétylcholine viennent d'être resynthétisées et sont prêtes à nouveau à être libérées (Fig. 6) (LAFLAMME, 2000).

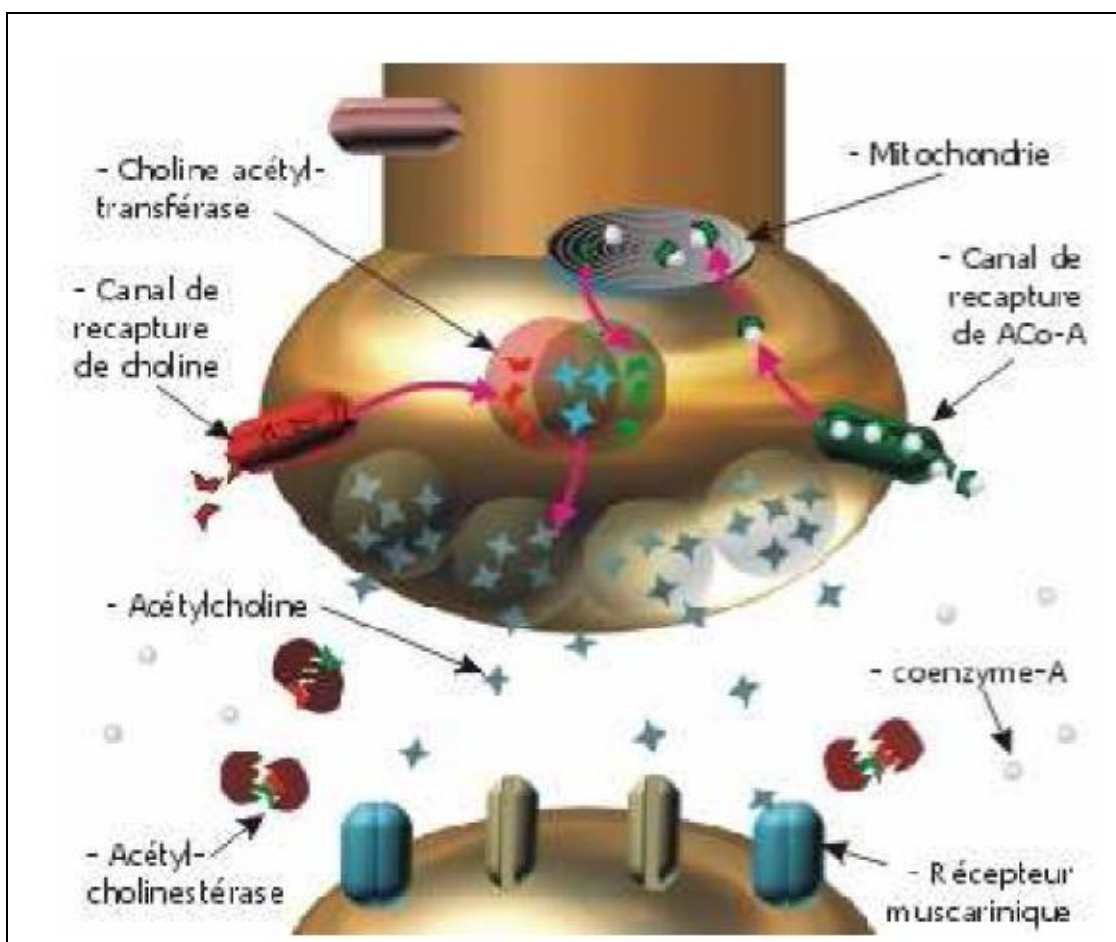
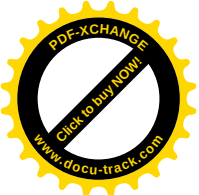


Fig. 6 : Transmission synaptique cholinergique (LAFLAMME, 2000).



4.2. L'acétylcholinestérase comme biomarqueur de pollution :

Des estérases qui hydrolysent des esters de choline à un taux plus élevé que d'autres esters ont été désigné comme étant des Cholinestérases (ChE). Il existe deux types de cholinestérase basés sur des spécificités de substrat et la susceptibilité d'inhiber. D'abord, AChE, également connu sous le nom de « cellule rouge », « vrai » ou cholinestérase de « type I », catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine de neurotransmetteur à la choline et l'acide acétique. L'enzyme existe principalement comme cellule nerveuses impliquant, la transmission synaptique cholinergique, mais est également trouvée dans une variété d'autres cellules neuronales et non neuronales. Il est sujet à une inhibition élevée de substrat (TRUDEAU & SANS CARTIER, 2000).

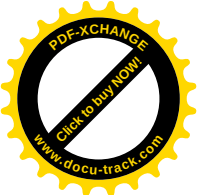
Le second enzyme est la butyrylcholinestérase de plasma, également connu sous le nom de « acétylcholine acyle hydrolase », « non spécifique », « pseudo » ou « cholinestérase de type II ». On la trouve principalement dans le plasma, et il agit sur une variété de type de choline, de phényle, nitrophényliques et d'autres types d'esters (LAWSON & BARR, 1987).

Le rôle de l'AChE dans la transition cholinergique est de régler la transmission nerveuse en réduisant la concentration de l'émetteur neural Acétylcholine (ACh) à travers son hydrolyse par AChE-catalysée, en choline et acide acétique dans l'espace synaptique des synapses cholinergiques et des jonctions neuromusculaire (BOCQUENE et *al.* 1990 ; GALGANI & BOCQUENE, 1990 ; GALGANI et *al.* 1992, ESCARTIN & PORTE, 1997, NARBONNE et *al.* 1999, MORA et *al.* 1999 ; GALGANI & BOCQUENE, 2000).

L'activité de l'AChE est inhibée par la présence de pesticides tels que les organophosphorés et les carbamates et quelques métaux lourds chez la moule (MORA et *al.* 1999), ainsi que par la présence d'hydrocarbures (PAYNE et *al.* 1996, KOPECKA et *al.* 2004), et pour cela l'activité de l'acétylcholinestérase peut être employé pour détecter ces molécules en eau de mer (GALGANI & BOCQUENE, 1989).

Quand l'AChE est inactivée par des esters d'organophosphates ou de carbamates, la concentration d'ACh dans la jonction demeure haute en comparaison avec les organismes non exposés à ces polluants (BOCQUENE et *al.* 1990 ; GALGANI & BOCQUENE, 1990 ; GALGANI et *al.* 1992 ; ESCARTIN & PORTE 1997 ; MORA et *al.* 1999 ; NARBONNE et *al.* 1999 ; GALGANI & BOCQUENE, 2000).

Cette inhibition mène à l'affaiblissement physiologique grave chez les organismes marins (DAUBERSCHMIDT et *al.* 1997 ; MCHENERY & *al.* 1997 ; OZMEN et *al.* 1998).



L'AChE est donc un biomarqueur enzymatique de neurotoxicité (MORA et *al.*, 1999). On pense que les niveaux d'activité de l'AChE peuvent être des indicateurs utiles des réponses biologiques chez les organismes (les moules et les poissons) exposés à la pollution par les polluants organiques spécifiques (organophosphates et des carbamates) (BOCQUENE & GALGANI, 1998).

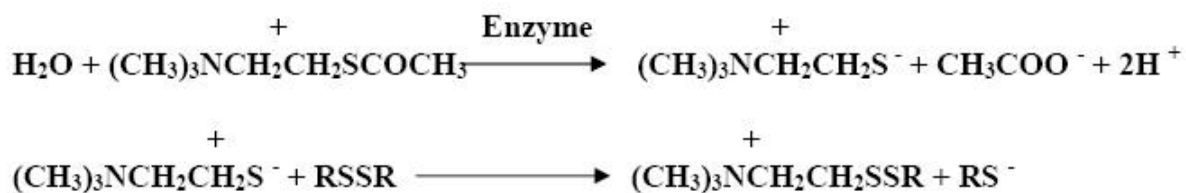
Afin d'accéder à l'AChE comme mesure de l'influence des contaminants appropriés (spécifique) au biota, certaines conditions devraient être réunies. Le secteur d'étude devrait être situé dans les estuaires et les zones côtières, où la contamination est plus prononcée et qui est due au ruissellement (KIRBY et *al.* 2000).

Chez les Invertébrés marins, la plupart des activités enzymatiques varient avec la température de l'environnement. En réalité, les niveaux d'activités enzymatiques ne dépendent pas directement de la température du milieu, mais de l'activité physiologique de l'animal qui est étroitement corrélée aux saisons et à la température de l'eau. C'est un élément essentiel à l'interprétation des données des marqueurs biologiques ; c'est le cas assez particulier de l'activité des cholinestérases qui montre des activités très faibles en hiver et au début du printemps. La mesure des niveaux de cholinestérases est habituellement appliquée à la recherche d'effets neurotoxiques spécifiques de certaines classes de pesticides (BOCQUENE & GALGANI, 1998).

Cependant, PAYNE et *al.* (1996) ont montré que les huiles usagées peuvent se comporter comme des inhibiteurs de cholinestérases, cette enzyme a été citée dans des études récentes comme cible potentielle des hydrocarbures, ainsi l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) peut refléter non seulement une atteinte neurotoxique, mais en plus une perturbation de l'état physiologique global de l'organisme. En d'autres termes, dans des conditions d'exposition à une pollution de type hydrocarbure, le suivi des cholinestérases est plutôt considéré comme un élément marqueur de l'état physiologique global du bivalve plutôt que d'une atteinte neurotoxique spécifique dans le cas d'une exposition à des pesticides PAYNE et *al.* (1996).

L'effet neurotoxique qui découlent de son exposition aux contaminants, en particulier les pesticides organophosphorés et carbamates, sont détectables par la mesure de l'inhibition de l'acétylcholinestérase (BOCQUENE et *al.*, 2002).

Le cholinestérase hydrolyse l'acétylcholinestérase iodide (ATh ChI) en thiocholine et acétate. Thiocholine réagit avec l'acide dithiodinitrobenzoic (DTNB) pour former l'acide thionitrobenzoic qui est mesuré spectrophotométriquement à 450 nm. Le taux qui est formé représente l'activité de ChE (ELLMAN, 1961) ; la réaction est la suivante :



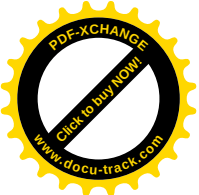
Cette méthode spectrophotométrique a été décrite, pour la détermination de l'activité de l'acétylcholinestérase à partir d'extrait de tissus, d'homogénats, de cellules en suspension... etc. l'activité est mesurée en suivant l'augmentation de la couleur jaune produite quand l'anion Thio produit par l'hydrolyse enzymatique du substrat (acétylthiocholine) réagit avec le DTNB (ELLMAN et *al*, 1961).

L'ensemble des données des études faites par STIEN et *al*. (1998) travaux de ROMEO et *al*. (2003) ont confirmé cela. Ces auteurs rapportent que la salinité a eu un plus grand effet sur l'activité de l'AChE que la température (DAMIENS et *al*, 2004). Par contre chez les poissons, HOGAN (1970), BOCQUENE & GALGANI (1998), rapportent l'influence de la température vis-à-vis de l'activité de l'AChE, avec un abaissement des activités de l'AChE mettant en parallèle la diminution de la température. Il est important à savoir que GALGANI et *al*. (1992), n'ont rapporté aucune influence du sexe au niveau de l'activité de l'AChE, et KIRBY et *al*. (2000), ont également observé ce dispositif et ont confirmé les travaux antérieurs de GALGANI et *al*. (1992).

4.3. Action neurotoxique des pesticides anticholinestérasiques :

Des inhibiteurs ont été mis au point soit pour détruire les Insectes, soit pour être utilisés comme agent de guerre chimique, soit pour soigner certaines maladies telles que la maladie d'Alzheimer (FOURNIER, 2007). Depuis plusieurs décennies, des pesticides sont utilisés afin d'augmenter la production agricole ainsi que pour éradiquer des maladies tropicales. Au fil des ans, plusieurs effets toxiques menaçant la santé ont été identifiés, et aujourd'hui, il est reconnu que l'exposition peut endommager plusieurs systèmes biologiques chez l'homme (PASSOS, 2006).

Les pesticides sont des produits chimiques utilisés en agriculture pour détruire des ravageurs, les plantes adventices et les agents phytopathogènes (OMS, 1991 in PASSOS, 2006). Ces substances affectent directement le système de neurotransmission synaptique de l'acétylcholine (PASSOS, 2006). Les pesticides organophosphorés et carbamates agissent en tant que neurotoxines en empêchant l'AChE, l'enzyme qui inactive le neurotransmetteur



(l'acétylcholine), ceci crée une accumulation de l'ACh, qui cause le dysfonctionnement du système nerveux chez les organismes vivants (O'BRIEN, 1990).

4.3.1. Les organophosphorés :

Depuis le retrait des insecticides organochlorés, les insecticides organophosphorés sont actuellement les plus répandus. Ce sont des dérivés esters, des amides ou des dérivés thiols des acides phosphoriques, phosphoniques, phosphorothioiques qui possède une structure chimique générale assez similaire (TEMPLE & SMITH, 1996).

Plus d'une centaine d'OP sont connus et leur degré de toxicité varie de modérément à hautement toxique selon la matière active qui les compose (IPCS, 1986). Quoiqu'on leur connaisse de multiples usages insecticides, rodenticides, nématocides, gaz de guerre, traitement de la myasthénie gravis et du glaucome chez l'humain, additifs dans certains produits sont principalement utilisées comme insecticides sur les plantes, et contre les poux, les mites et la malaria chez l'humain et les animaux (INSP, 2007).

Les organophosphorés empoisonnent essentiellement les Insectes et les Mammifères par la phosphorylation de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) dans les jonctions neuromusculaires. Il en résulte une perte d'AChE qui sur stimule l'organe effecteur par l'excès d'acétylcholine (l'ACh est la substance neurotransmettrice dans les jonctions neuromusculaires). L'enzyme joue un rôle critique dans le système nerveux central (SNC) ainsi que dans le contrôle normal de la transmission de l'impulsion nerveuse des fibres nerveuses aux cellules des muscles lisses et squelettiques, aux cellules glandulaires et aux ganglions végétatifs. Les symptômes et les signes de l'intoxication ne se manifestent que lorsque la phosphorylation a neutralisé une proportion critique de la masse de l'enzyme tissulaire. A dose suffisante, la perte de la fonction de l'enzyme permet l'accumulation d'ACh périphérique et centrale dans les synapses cholinergiques du neurotransmetteur (effets muscariniques), les synapses neuromusculaires squelettiques et les ganglions végétatifs (effets nicotiniques). Dans les synapses nerveuses cholinergiques des cellules musculaires et glandulaires molles, la forte concentration d'ACh provoque respectivement la contraction et la sécrétion musculaire. Dans les synapses musculaires squelettiques, l'ACh excessif peut être un excitant (provoquant la convulsion musculaire), mais peut aussi affaiblir ou paralyser la cellule en dépolarisant sa plaque motrice. Une forte proportion des liaisons des radicaux phosphates des OP aux sites actifs des AChE devient irréversible dans les 24h à 48h. La transmission synaptique de toutes les fibres nerveuses qui libèrent de l'ACh est affectée par la présence des OP (INSP, 2007). Les OP sont peu solubles dans l'eau, peu volatile, mais très liposoluble (TEMPLE & SMITH, 1996).

Ils se fixent aux cholinestérases : acétylcholinestérases du système nerveux central, des muscles et des globules rouges et pseudocholinestérases du système nerveux central et plasmatiques, s'opposant à l'hydrolyse physiologique de l'acétylcholine. L'action des NOP sur le système nerveux central ne se limite pas à l'inhibition de l'acétylcholinestérase centrale, mais aussi au déséquilibre du système GABA-ergique et activation des récepteurs de type N-méthyl-Daspartate (SAISSY & RUTTIMANN, 1999).

Les organophosphorés (OP) sont des toxiques létaux, à action systémique prédominante, dont le mécanisme d'action principal est de bloquer la dégradation de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques par inhibition irréversible des cholinestérases (BUFFAT et *al*, 1989 ; SIDDELL & BORAK, 1992).

Ils sont classés en quatre familles principales. Tous sont dégradés par hydrolyse avec formation de dérivés hydrosolubles non toxiques. En raison de leur absence d'accumulation dans l'organisme, les OP sont utilisés à large échelle depuis 1935 comme insecticides (IOP) en remplacement des organochlorés (BISMUTH, 1993).

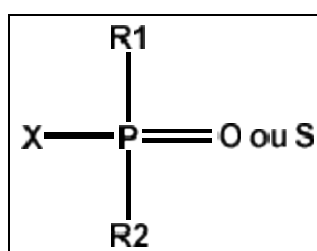


Fig. 7 : Formule des organophosphorés.

Tableau 4: Quelques insecticides organophosphorés utilisés en agriculture (SAISSY & RUTTIMANN, 1999).

Exemple	Toxicité	Utilisation
Malathion	Faible	Insecticide de contact à large spectre
Dichlorvos	Modérée	Insecticide de contact
Chlorfenvinphos	Importante	Insecticide de contact

Les organophosphorés (OP) utilisés comme insecticides (IOP) sont responsables d'une mortalité élevée par intoxication. Par ailleurs, les neurotoxiques organophosphorés (NOP) sont les éléments essentiels de l'arsenal chimique militaire moderne déjà utilisés à des fins terroristes (SAISSY & RUTTIMANN, 1999).

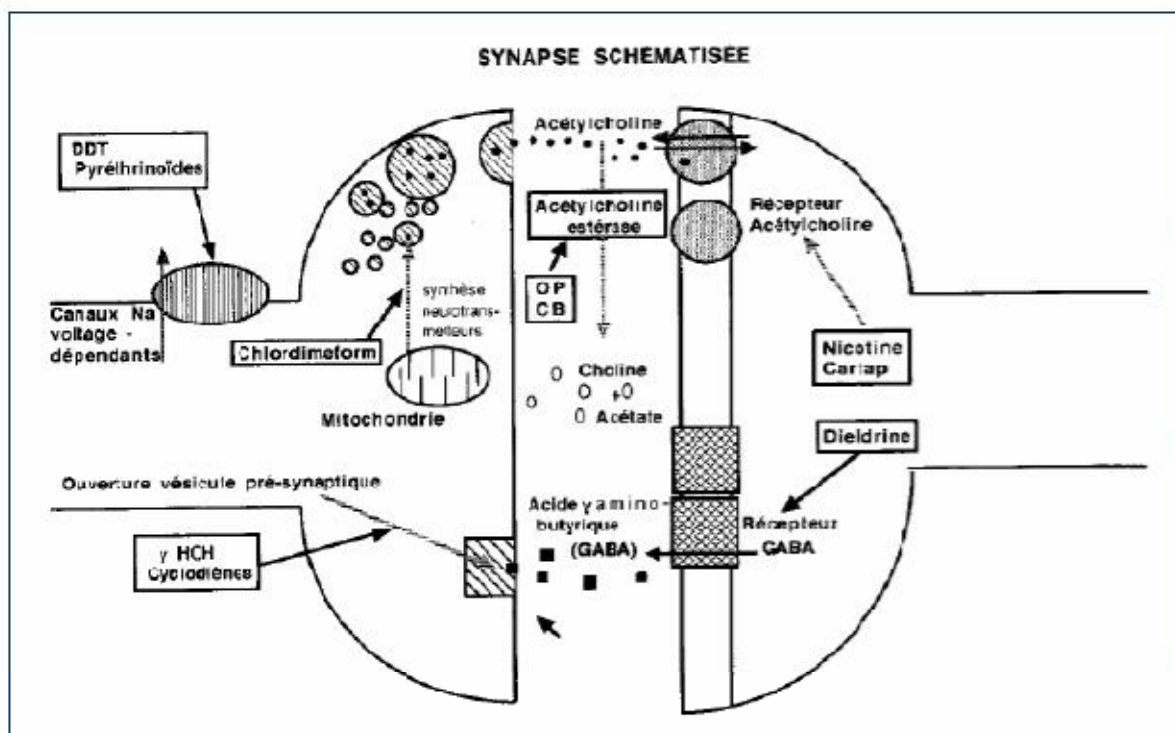


Fig. 8 : Principaux sites d'action des insecticides actuellement utilisés sur des protéines-cibles (AMICHOT et *al.*, 1998).

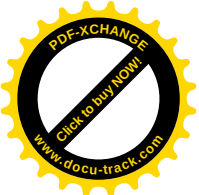
➤ Action sur la synapse cholinergique : inhibition des cholinestérases

Les OP, très lipophiles, franchissent aisément toutes les barrières biologiques et se fixent de façon covalente aux cholinestérases que ce soit les acétylcholinestérases du système nerveux central, des muscles et des globules rouges ou les pseudocholinestérases du système nerveux central et plasmatiques. Même si une faible quantité franchit la barrière hématoencéphalique, elle suffit pour inhiber en quelques secondes pratiquement toute l'activité cholinestérasique (BLANCHET et *al.*, 1991).

Il s'agit d'une véritable lésion biochimique puisque les OP viennent occuper en le phosphorylant le site estérasique de l'enzyme, s'opposant ainsi à l'hydrolyse physiologique de l'acétylcholine en choline et en acide acétique. Soixante-quinze grammes d'acétylcholine sont normalement hydrolysables en une heure par 1 mg d'enzyme (BISMUTH, 1993).

La déphosphorylation de l'enzyme inhibée par l'OP est très lente. Dans un deuxième temps, la phosphorylation devient irréversible par déalkylation, c'est le phénomène d'*aging* ou vieillissement de l'enzyme qui, d'une part, n'est plus fonctionnelle et qui, d'autre part, n'est pas réactivable (FLEISHER & HARRIS, 1965).

Dans ce cas, c'est la synthèse de nouveaux cholinestérases qui permettra le retour à une activité fonctionnelle normale. Cette difficulté, voire impossibilité de réactivation des



cholinestérases différencie les intoxications par OP de celles par les carbamates au cours desquelles les cholinestérases sont spontanément et rapidement réactivées (SAISSY & RUTTIMANN, 1999).

Biologiquement, les organophosphorés sont neurotoxiques aux humains et aux animaux en général, par l'intermédiaire de 3 actions distincts : (1) la neurotoxicité cholinergique, (2) neurotoxicité retardée induite par les esterorganophosphores (OPIDN), et (3) la neurotoxicité chronique induite par l'esterorganophosphore (OPICN) (ABOU-DONIA, 2003).

4.3.2. Les carbamates :

Les insecticides carbamates sont dérivés du N-méthylcarbamate et partagent parfois la grande solubilité des OP. Ces insecticides ne doivent cependant pas être confondus avec les fongicides et les herbicides carbamates qui ne sont pas des inhibiteurs des cholinestérases (INSP, 2007).

Le carbofuran est un pesticide qui appartient à la famille chimique des carbamates. Formule chimique du carbofuran : 2,3-dihydro-2,2-diméthylbenzofuran-7-yl méthylcarbamate. D'usage courant en agriculture, il est fréquemment détecté dans les eaux superficielles (TROTTER *et al*, 1991; BUSHWAY *et al*, 1992 ; GUIHO, 1995). Il agit par contact et par ingestion. Il se comporte comme un poison aigu (PASSOS, 2006). Ce composé présente une toxicité élevée pour les Poissons (TROTTER *et al*, 1991).

D'usage principal comme pesticide et nématicide et n'est pas phytotoxique. De formule chimique $C_{12}H_{15}NO_3$ et de masse moléculaire de 221,3, le carbofuran ne s'accumule pas.

C'est un inhibiteur direct et réversible des cholinestérases par carbamylation du site estérasique de l'enzyme. Les effets toxiques sont dus à l'accumulation d'acétylcholine au niveau des synapses nerveuses et des jonctions neuromusculaires, phénomène susceptible de provoquer des perturbations comportementales affectant plus particulièrement la locomotion et l'équilibre (ZINKL *et al.*, 1991 ; SAGLIO *et al.*, 1996). L'enzyme carbamylée se réactive spontanément et rapidement. Le carbofuran et ses esters métaboliques sont actifs (FAO/WHO, 1996).

Les carbamates diffèrent des OP par le fait qu'ils sont des inhibiteurs réversibles des AChE : l'activité enzymatique tend à revenir à la normale en moins de 24h post exposition (INSP, 2007).

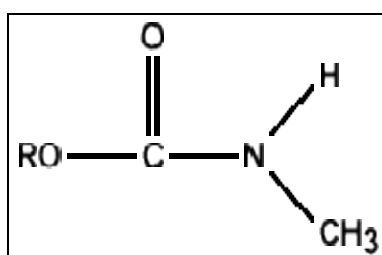
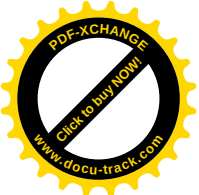


Fig. 9 : Formule des carbamates.

L'effet des OP et des carbamates sur les organismes est immédiat, destructeur et quasiment indétectable dès le lendemain (BERTRAND, 2002 ; BOCQUENE, 2002). Par ailleurs, les effets de l'association d'organophosphorés et de carbamates sont souvent de type synergique : l'effet neurotoxique de l'association des deux types de molécules est plus fort que la simple addition des effets de chaque molécule. La spécificité du mode d'action des organophosphorés et des carbamates a permis d'envisager l'utilisation de leur cible biologique (AChE) comme un marqueur des effets liés à l'exposition à ces molécules (BOCQUENE, 2002).

Des observations précédentes (SAGLIO et al, 1996) ont révélé des perturbations comportementales en réponse à des expositions à court terme à ce carbamate chez *Carassius auratus* (Cyprinidae). Plus récemment, (BRETAUD et al, 2001), nous avons montré que des expositions de courte durée au carbofuran pouvaient également induire une inhibition significative de l'activité de l'AChE au niveau du cerveau et du muscle chez cette espèce. Ces résultats suggèrent que les perturbations comportementales induites par l'exposition au carbofuran pourraient être étroitement liées à l'action de ce pesticide sur la transmission cholinergique.



5. Activité glutathion S-transférase (GST) comme biomarqueur d'écotoxicologie :

5.1 Stress oxydant : Induction et Effet :

L'étude du stress oxydant est récente. Elle a conduit à celle des mécanismes de production d'oxyradicaux ainsi que d'anions superoxyde et peroxyde d'hydrogène. Les réactions conduisant à cette production, ont été observées au niveau du réticulum endoplasmique du foie chez les poissons et aussi au niveau des lysosomes de la glande digestive chez les mollusques bivalves (Cosson et *al.*, 1998).

Le stress oxydant est susceptible d'être provoqué par des polluants, des variations environnementales ainsi que des facteurs endogènes notamment des taux élevés en acide gras polyinsaturés et teneurs élevées en oxygène. Cependant beaucoup d'organismes semblent dotés de systèmes antioxydants qui se mettent en activité lors d'un stress oxydant. Plusieurs travaux ont montré que des activités antioxydantes sont induites par des polluants organiques (HAP, PCB...) ou des métaux lourds. La lipoperoxydation n'exclut pas l'induction de ces activités mais elle traduit leur inefficacité à faire face au stress (Cossu et *al.*, 1997).

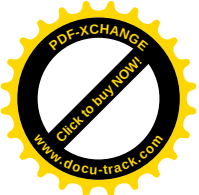
Ce stress a aussi des effets mutagènes et de lipoperoxydation. Selon plusieurs auteurs sa génotoxicité varie suivant le groupe taxonomique et elle est plus importante chez le bar (poisson) que chez la moule. De plus, la lipoperoxydation serait moins importante chez les poissons que chez les mammifères.

5.2. Utilisation du stress oxydant comme biomarqueur :

Le stress oxydant n'est pas toujours lié à la pollution. Il peut être le résultat de facteurs physiologiques (reproduction...) ou environnementaux (climat...)

Il se traduit par l'activation de systèmes antioxydants. Lorsque l'induction des enzymes antioxydantes est suffisante, elle permet l'adaptation des individus et le retour à la normale alors que leur inhibition est souvent associée à des effets de toxicité (Cossu et *al.*, 1997).

L'utilisation de ce biomarqueur nécessite donc une parfaite connaissance de l'ensemble des activités des enzymes antioxydantes ainsi que celle des écosystèmes pour pouvoir interpréter les variations à juste titre.



5.3. Caractéristiques générales et fonctions de la glutathion S-transférases :

5.3.1. Vue d'ensemble de détoxification cellulaire :

Les organismes vivants sont en permanence exposés à des espèces exogènes et endogènes de produits chimiques toxiques, qui peuvent provoquer des effets indésirables, parfois mortelle. La capacité des organismes vivants pour survivre le risque posé par ces composés représente une adaptation biologique fondamentale pour la survie. Différentes stratégies ont été adoptées par les cellules pour lutter contre l'effet de composés toxiques et leurs métabolites. Les mécanismes de défense sont le plus souvent, généraux, plutôt que spécifiques à un produit chimique donné ou d'un organisme en particulier. Parmi les mécanismes de défense, la biotransformation catalytique a évolué comme un mode essentiel de la protection contre les espèces chimiques toxiques (SHEEHAN *et al.*, 2001).

Les cellules possèdent un grand ensemble d'enzymes capables de transformer un large spectre de structures chimiques et de fonctionnalités différentes. La détoxification enzymatique des xénobiotiques a été classé en trois phases distinctes, qui agissent de manière étroitement intégré. Les enzymes des phases I et II catalysent la conversion d'un xénobiotiques lipophile, non-polaire, en un métabolite plus soluble dans l'eau et donc moins toxique, qui peut ensuite être éliminées plus facilement de la cellule. La phase I de détoxification est principalement le résultat de l'action par le système du cytochrome P450 et des oxydases à fonction mixte (ISHIKAWA *et al.*, 1997). Ces protéines sont responsables d'une large gamme de réactions, dont l'oxydation semble être la plus importante (GUENGERICH, 2001).

Les enzymes de la Phase II catalysent la conjugaison des xénobiotiques activés en un substrat endogène soluble dans l'eau, tels que le glutathion réduit (GSH). Quantitativement, la conjugaison en GSH, qui est catalysée par la glutathion S-transférases (GST) est la principale réaction de la phase II de la biotransformation des xénobiotiques (SHEEHAN *et al.*, 2001).

Les composés plus hydrosolubles, résultant des deux phases précédentes, sont éliminés des cellules dans la phase III de la détoxification. Chez les organismes eucaryotes, ils sont activement éliminé ou compartimenté dans la vacuole par des pompes GS-X ATP-dépendantes. En effet, comme le fragment « glutathionylated » (c'est-à-dire conjugué au glutathion) est hydrophile, le conjugué ne peut pas simplement revenir par simple diffusion dans la cellule, d'où l'efficacité de ce système (ISHIKAWA *et al.*, 1997; ERNST *et al.*, 2005).

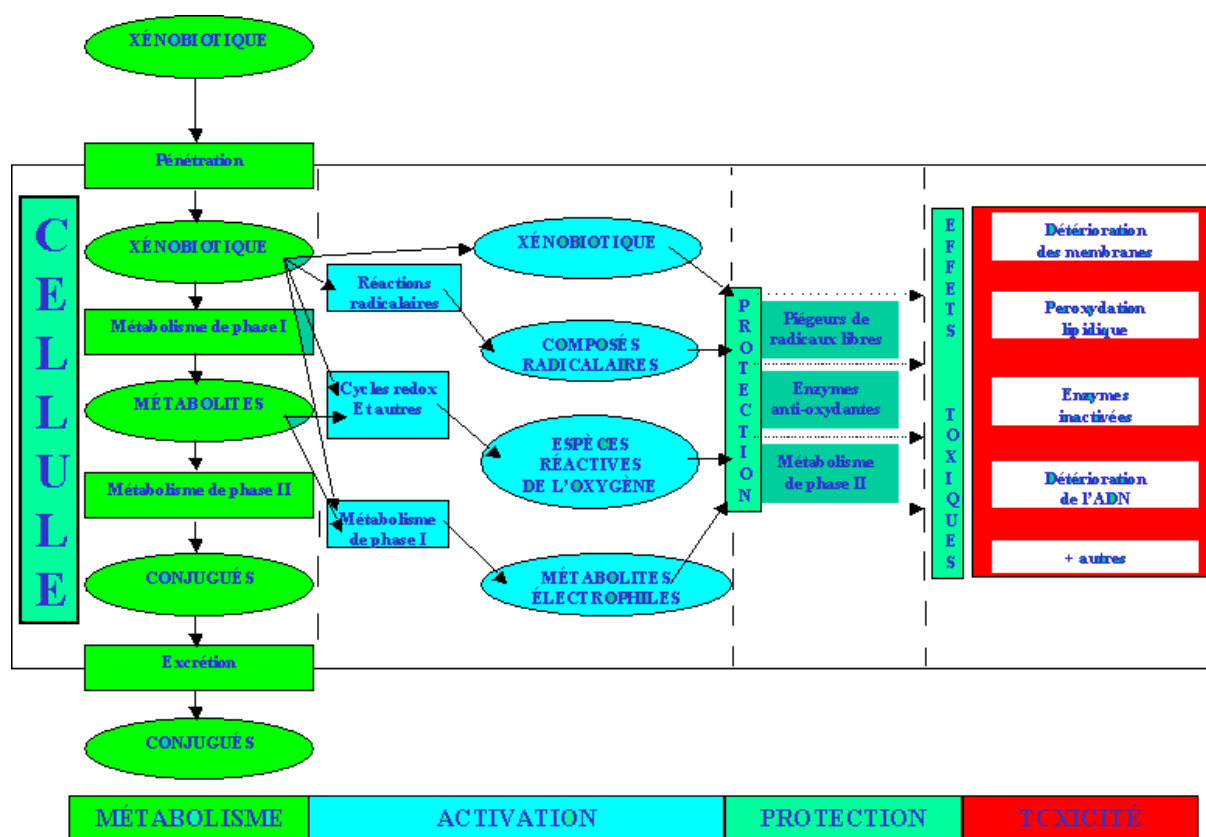


Fig. 10 : Les voies majeures conduisant à la détoxification et à la toxication des xénobiotiques organiques chez les animaux (LAGADIC *et al*, 1997).

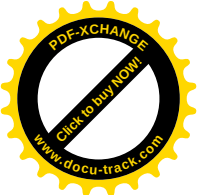
5.3.2. Les réactions de biotransformation :

Certaines substances **xénobiotiques** possèdent un caractère lipophile. Cette lipophilie leur confère la double capacité de franchir aisément l'ensemble des membranes cellulaires (épithélium intestinal, paroi vasculaire, membrane des cellules des organes cibles, épithélium des tubules rénaux,...) et d'être éventuellement stockées dans les structures lipidiques. En revanche, ces substances exogènes hydrophobes sont difficilement éliminées de l'organisme car les voies d'élimination (biliaire, rénale,...) utilisent un milieu aqueux (SHEEHAN *et al.*, 2001).

Dans la quasi-totalité des cellules, il existe des systèmes enzymatiques prenant en charge le métabolisme (généralement oxydatif) de multiples composés liposolubles endogènes (hormones, acides gras, cholestérol, vitamines,...). Cette fonction enzymatique porte le nom de **biotransformation**.

Ces systèmes enzymatiques prennent également en charge les xénobiotiques dans le but d'augmenter leur hydrosolubilité afin de faciliter leur excrétion dans les fluides biologiques (urine, bile, sueur,...).

Deux types de réactions interagissent dans les mécanismes de la biotransformation



Les réactions dites de **phase I**, localisées essentiellement au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, ont pour but de fixer un groupement fonctionnel à la molécule initiale. Le métabolite produit, rendu plus hydrosoluble, peut alors être pris en charge par les réactions de **phase II**. Ces dernières conjuguent le substrat fonctionnalisé à une petite molécule endogène (acide glucuronique, glutathion, sulfate, groupement méthyl,...).

La fonction de biotransformation correspond à une fonction biologique de défense de l'organisme et à ce titre elle est bénéfique. On parle ainsi de **détoxication**. Cependant, au cours des étapes de phases I et II, il peut se former des métabolites plus réactifs que la molécule initiale et potentiellement toxique pour la cellule. On désigne ce phénomène sous le terme de **toxication**.

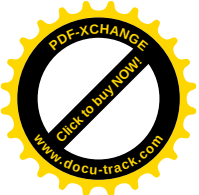
Ces métabolites actifs sont des électrophiles puissants qui vont pouvoir interagir avec les macromolécules cellulaires produisant ainsi des nécroses dans le cas des protéines et des lipides, ou des mutations éventuelles dans le cas d'interactions avec les acides nucléiques. Ces mutations peuvent être responsables de la phase d'initiation de la cancérisation.

5.4. Mise en évidence de la glutathion S-transférase chez les différents groupes zoologiques :

Les GST ont été mises en évidence dans la plupart des êtres vivants tels que la levure (FOLEY & SHEEHAN, 1998), les Mollusques (FITZPATRICK & SHEEHAN, 1993; FITZPATRICK *et al*, 1995a; BLANCHETTE & SINGH, 1999), les vers de terre (STENERSEN *et al*, 1979, BORGERAAS *et al*, 1996), les Crustacés (KEERAN & LEE, 1987; LEBLANC & COCHRANE, 1987), les Insectes (STENERSEN *et al*, 1987; PRAPANTHADARA *et al.*, 1996), les poissons (GEORGE & YOUNG, 1988; MARTINEZ-LARA *et al*, 1997; PEREZ-LOPEZ *et al*, 2000), les Mammifères (HABIG *et al*, 1974); KAMISAKA *et al*, 1975; ROUIMI *et al.*, 1996; BOLTON & AHOKAS, 1997) et les plantes (PASCAL *et al*, 1998; HONG *et al*, 1999).

5.5. Activité glutathion S-transférase (GST) :

Les glutathion S-transférases représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques, impliquées dans des opérations diverses de transports et de biosynthèses intracellulaires (GEORGE, 1990). Mais la fonction des GST la plus étudiée en ce qui concerne la prévention de la pollution dans l'environnement demeure leur activité de catalyse des réactions de conjugaison entre un peptide, le glutathion, et des molécules



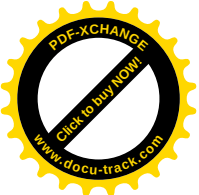
réactives comportant des sites électrophiles, capables de réagir dangereusement avec des macromolécules comme les acides nucléiques (ARN, ADN). La catalyse de cette conjugaison du glutathion avec certains substrats représente une étape dans la formation de composés qui seront moins toxiques et plus hydrosolubles que les molécules de départ (CHATTERJEE & BHATTACHARYA, 1984).

La mesure de l'activité des GST consiste à fournir à l'enzyme un substrat (en général du chlorodinitrobenzène, qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST) et du glutathion. La réaction catalysée de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une molécule nouvelle, qui absorbe la lumière à 340 nm de longueur d'onde. Il est possible de quantifier cette absorption au moyen d'un spectrophotomètre et la valeur de densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formée, elle-même liée à l'intensité de l'activité GST (HABIG *et al.*, 1974).

Une grande variété de composés chimiques induit les GST, dont certains inducteurs des cytochromes P450 tels que les hydrocarbures polyaromatiques et les PCB. Dans l'état actuel de nos connaissances sur les poissons toutefois, toutes les isoenzymes de la famille des GST n'ont pas encore été individualisées (comme c'est le cas pour les cytochromes P450) et leur activité spécifique demeure mal connue. Leur utilisation comme bioindicateur de pollution caractéristique d'un type de polluant dans l'environnement reste encore à définir et se rapproche encore aujourd'hui plus de celle d'un indicateur non-spécifique, témoin de l'état de santé global des organismes qui peuplent les écosystèmes marins.

Ce sont donc des enzymes de la phase II du métabolisme des xénobiotiques. Pendant cette phase II ou phase de conjugaison, les métabolites des xénobiotiques, déjà rendus moins hydrophobes par les réactions d'oxydation ou d'hydroxylation de la phase I, sont transformés en substances encore plus hydrosolubles. Ils sont donc d'autant plus facilement excrétés. La phase de conjugaison concerne aussi bien des molécules endogènes que des xénobiotiques comme les PCB, les HAP et les pesticides. L'efficacité des GST est due au fait qu'un grand nombre de composés exogènes et endogènes ont les caractéristiques requises pour constituer un substrat approprié.

Ces enzymes sont généralement solubles (cytosoliques) et présentes sous plusieurs isoformes, dont certaines sont inductibles par les contaminants qu'elles rendent moins



toxiques. Cette particularité en a fait une activité intéressante en tant que marqueur biochimique.

5.6. Le rôle des GST dans la réponse au stress oxydatif :

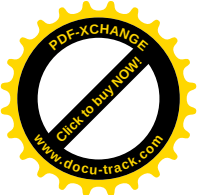
Les GST détoxifient une variété de xénobiotiques électrophiles par leur conjugaison au GSH réduit. Comme les xénobiotiques sont la principale source de stress oxydatif, il n'est pas surprenant que les GST jouent aussi un autre rôle important et indirect dans la défense antioxydante, en éliminant les substances toxiques et la prévention de leurs effets délétères ultérieurs. Ainsi, GST peuvent offrir une protection contre les xénobiotiques électrophiles, les métaux toxiques et les médicaments, non seulement par la conjugaison de GSH, mais aussi en allégeant le stress oxydatif et en agissant contre la peroxydation lipidique qui est souvent associé à l'exposition à des xénobiotiques (ZHAO *et al.*, 1999; HUBATSCH *et al.*, 1998; VEAL *et al.*, 2002; GARCERA *et al.*, 2006; BAI *et al.*, 2004).

5.7. Intérêt des biomarqueurs de stress oxydant en écotoxicologie :

L'intérêt majeur des paramètres antioxydants en tant que biomarqueurs réside dans le caractère aspécifique de leur réponse, ce qui constitue un avantage dans le contexte de la contamination multiple des écosystèmes. La réponse des systèmes antioxydants aux polluants se traduit en général dans une première phase par une augmentation de l'activité des enzymes impliquées. Ce phénomène traduit l'adaptation des individus à un nouvel environnement. L'induction d'activité est en général transitoire, relativement modérée et aspécifique. Elle présente un certain nombre de caractéristique :

- Un retour des activités à leur niveau initial a été observé sans que les conditions d'exposition aient été modifiées. Les travaux de SOLE *et al* (1995) sur des bivalves étudiés *in situ* de janvier à juin et ceux de LIVINGSTONE *et al.* (1993) sur des poissons exposés en laboratoire à des sédiments contaminés par des HAP et des PSB pendant 144 jours illustrent bien le caractère biphasique de ces réponses.
- Elle n'intéresse pas systématiquement tous les paramètres antioxydant. L'induction d'un paramètre peut d'ailleurs résulter d'un phénomène de compensation permettant de pallier le déficit d'autres antioxydants.
- Elle peut résulter des phénomènes physiologiques comme la reproduction, ou de facteurs climatiques et environnementaux sans rapport avec la pollution.

L'activation des systèmes antioxydants peut suffire dans un premier temps à limiter la production de substances réactives et à empêcher les effets de cytotoxicité. Mais ce n'est pas toujours le cas.



Partie II : L'oursin
Paracentrotus lividus
espèce bioindicatrice
de pollution marine

Introduction :

L'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816), espèce de mers épicontinentales, à large répartition géographique, connu dans l'Atlantique depuis l'Irlande jusqu'aux Açores, Canaries, et au Maroc, mais aussi dans toute la Méditerranée (REGIS, 1987).

Les oursins sont des membres du large groupe des Invertébrés marins, et appartiennent au phylum des Echinodermes (animaux recouverts d'épines) qui inclue aussi les étoiles de mer, les concombres de mer, les lis de mer, et les ophiures (KATO & SCHROETER, 1985).



Photo Chergui 2010, port d'Arzew

Fig. 11 : Oursin commun *Paracentrotus lividus*

1. Noms vernaculaire :

Oursin-pierre ; Oursin violet ; Châtaigne de mer

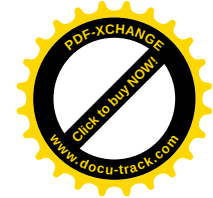
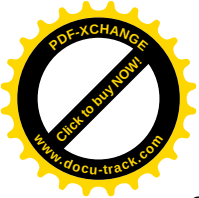
2. Synonymes

L'oursin comestible *Paracentrotus lividus* a eu des noms scientifiques différents au cours des temps mais qui ne sont plus valides, à savoir :

Echinus lividus (Lamarck, 1816)

Echinus saxatilis (Tiedemann, 1815)

Echinus vulgaris (Blainville, 1825)



Strongylocentrus lividus (Agassiz, 1872)

Toxopneuste lividus (Agassiz & Desor, 1846)

Toxopneuste concavus (Agassiz & Desor, 1846)

Toxopneuste complanatus (Agassiz & Desor, 1846)

3. Systématique :

Embranchement	Echinodermata = Echinodermes
Classe	Echinoidea = Echinides
Sous classe	Regularia = Oursins réguliers
Ordre	Echinoida = Echinoides
Famille	Echinidae = Echinidés
Genre	<i>Paracentrotus</i>
espèce	<i>lividus</i>

4. Biologie de l'espèce :

4.1. Anatomie :

Ils présentent une symétrie rayonnée pentaradiée qui peut éventuellement accompagner une symétrie bilatérale. Les larves présentent d'abord une symétrie bilatérale qui s'altère ensuite: le côté gauche évoluera en face orale et le côté droit, En face aborale. *Paracentrotus lividus* est un oursin qui peut atteindre 7 cm de diamètre. Ses piquants de 3 cm, longs, épais et lisses, sont de couleur violette, verte ou brune. La châtaigne de mer est une espèce comestible qui vit sur les pierres, les algues coralligènes et les rochers, et qui se couvre souvent d'algues et de débris de coquilles. De couleur variant du vert au violet et même au rouge. Il est impossible extérieurement de distinguer les sexes. Le corps est globuleux, aplati ventro-dorsalement et couvert de piquants. La face ventrale ou orale qui porte la bouche est appliquée contre le rocher. Le pôle supérieur correspondant à la face dorsale ou aborale porte l'anus qui est opposé à la bouche. Le test ou carapace à symétrie rayonnée de type 5 (symétrie pentaradiée) est formé de plaques calcaires soudées recouvertes par une peau hérissée de piquants (GROSJEAN, 2001).

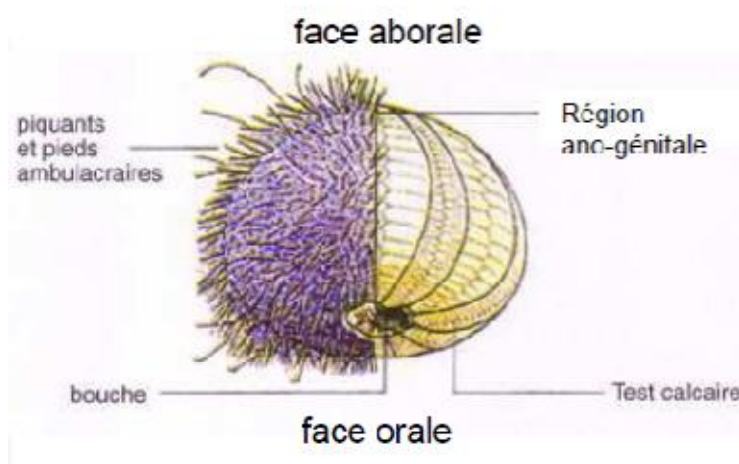


Fig.12 : Les positions de la face orale et aborale de *Paracentrotus lividus*

Zones ambulacraires et interambulacraires : les plaques ambulacraires sont principalement composées et possèdent 4 ou 5 ou 6 paires de pores disposées en arc de cercle. Les plaques ambulacraires et interambulacraires ont plusieurs tubercules primaires.

Le périprocte : il se localise sur la face aborale à l'opposé de la bouche. Il est rond, et recouvert de plus de 5 plaques. L'ouverture anale se situe au centre légèrement excentrée par rapport au périprocte.

L'appareil apical : il entoure le périprocte et se situe au milieu de la face aborale. Il est formé de 4 plaques génitales (hors madréporite), et de cinq petites plaques ocellaires. Les pores génitaux sont au nombre de 5, situés sur les plaques génitales. La plaque madréporique porte plus de 21 pores.

Le péristome : il est étroit. La membrane péristomienne est partiellement recouverte de plaque. Les dix encoches péristomiennes sont marquées. Au centre du péristome, l'appareil masticateur est présent ; les dents sont carénées et leurs épiphyses jointes.

Les tubercules et piquants : les tubercules sont répartis sur tout le corps. Ils sont non perforés et lisses. Chaque plaque ambulacraire possède un tubercule primaire. Les tubercules secondaires sont plus petits que les tubercules primaires. De plus, les tubercules primaires ambulacraires sont de la même taille que les interambulacraires. Les piquants, lisses, sont aplatis avec une couche de cortex bien développée.

Les pédicellaires : ils sont présents, globifères ou tridentés ou ophicéphales ou trifoliés avec 1 glandes localisés à l'intérieur des valves ou à l'extérieur des valves.

Les sphéridies : sont au nombre de plus de 5 et localisée(s) sur la suture perradiale

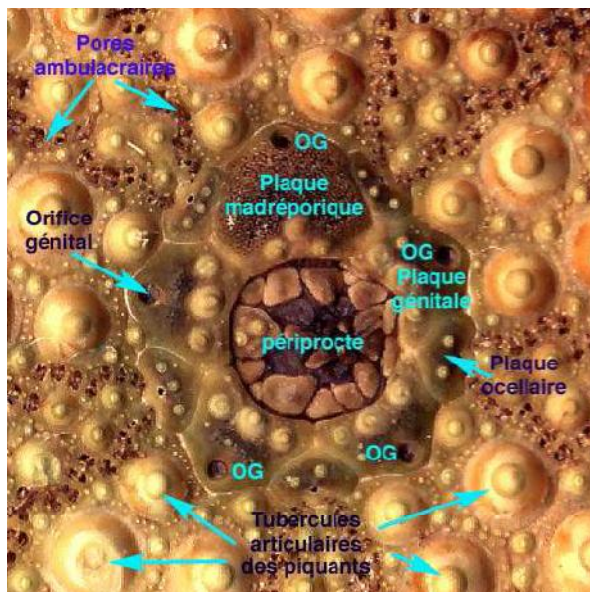


Fig.13 : Vue d'une dissection de la face aborale de *Paracentrotus lividus* (Fischer et al, 1987).

4.2. Nutrition :

Le régime alimentaire de *P. lividus* se révèle très variable et suivant la région occupée. De nombreux auteurs le considèrent comme relativement éclectique dans le choix de sa nourriture. Dans les régions pauvres en macrophytes dressées *P. lividus* se comporte comme « un racleur généraliste », la croissance rapide et continue de ses dents est de 1 à 1.5 mm/semaine (MÄRKEL, 1969) et le contraint à un broutage presque incessant pour les user. Il est capable de ronger n'importe quoi y compris la roche, devenant dans certaines régions calcaires, un agent d'érosion non négligeable (SCHNEIDER & TORUN-SKI, 1983 ; VERLAQUE & Nedelec, 1983b).

D'après REGIS (1978 ; 1986), l'oursin commun possède la faculté d'absorber, à travers le test et les piquants, les matières organiques dissoutes et particulières (sestonophagie) ; et les cadavres de poissons rejetés à la mer par les pêcheurs et gisant sur le fond (VERLAQUE, 1987).

L'oursin est un consommateur macrophage herbivore brouteur qui possède une armature buccale puissante (5 mâchoires et 5 dents constituant la lanterne d'Aristote) : il se

nourrit surtout d'algues, de posidonies, cependant la prise de nourriture animale n'est pas exclue (éponges) (NEDELEC, 1982 ; VERLAQUE, 1987).

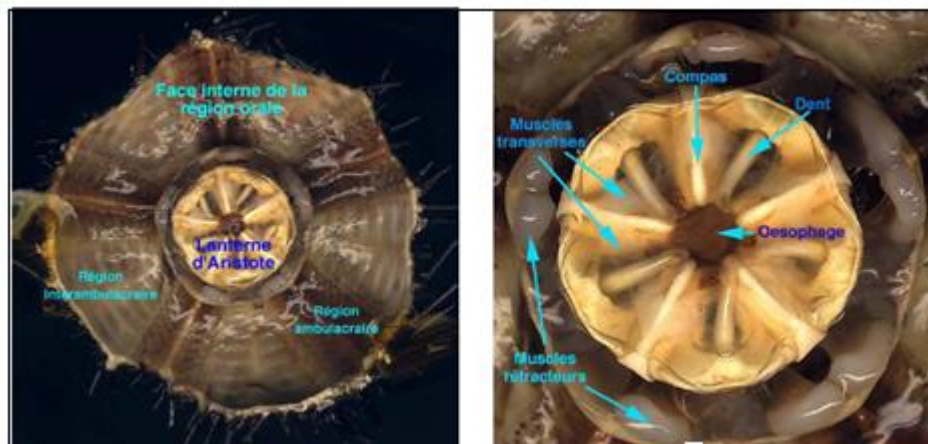


Fig.14 : Vue interne d'une dissection de la région orale montrant la disposition de la lanterne d'Aristote

4.3. Reproduction et cycle de vie :

L'oursin est un ovipare à sexes séparés, la libération des cellules mâles et des cellules femelles a lieu dans l'eau; la fécondation (union des gamètes) est donc externe. Chez tous les Echinodermes, l'œuf petit, pauvre en vitellus (réserves) se segmente, donne une larve ciliée nageuse et pélagique à symétrie bilatérale la *dipleurula*, excepté chez les Crinoïdes et certaines Holothuries (larve en tonnelet). Chez l'oursin la larve *pluteus*, après métamorphose donne un jeune oursin qui vit sur le fond. La reproduction s'effectue toute l'année mais elle présente des pics selon les régions. Les mâles possèdent 5 glandes génitales jaunâtres qui sécrètent une laitance blanche, alors que les femelles ont une laitance rougeâtre (RIDDET et *al*, 1992).

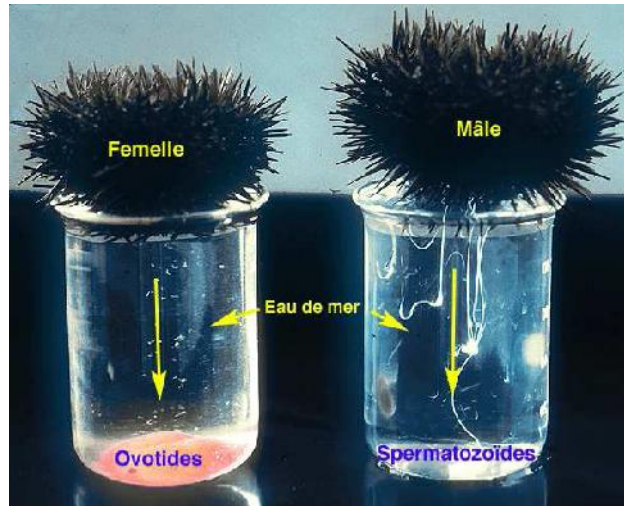


Fig.15 : Extraction *in situ* des gamètes mâles et femelles de *Paracentrotus lividus* (Grasse et al 1970)

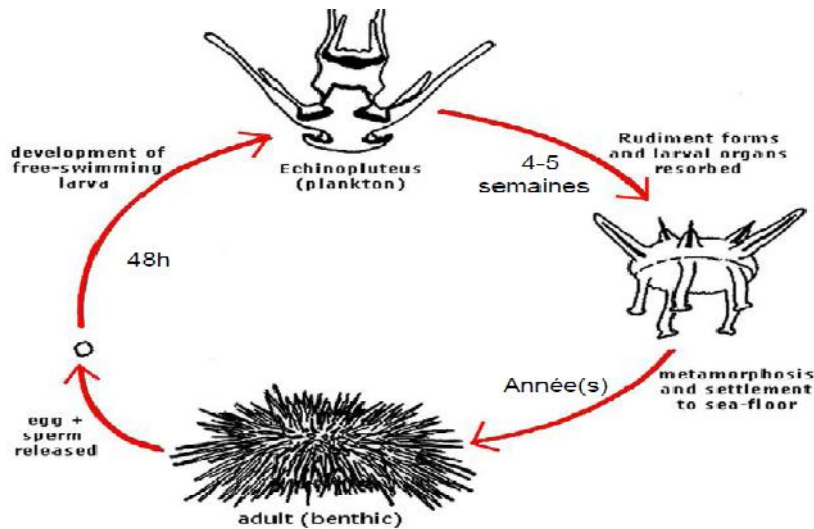


Fig.16 : Différentes étapes de la vie d'un oursin *Paracentrotus lividus* (GRASSE et al 1970)

4.4. Respiration et système circulatoire :

La respiration s'effectue sur toute la surface essentiellement au niveau de certains podia, en plus de dix « branchies » sur le cercle de fibres conjonctives et de muscles insérés sur les auricules (cinq paires de muscles adducteurs et abducteurs et cinq paires de muscles de compas) et pieds ambulacraires péribuccal. La respiration s'effectue par toute la peau, les pieds ambulacraires et 5 petites branchies situées autour de la bouche, le liquide circulant est, comme chez tous les Echinodermes, l'hémolymphe (FISCHER et al, 1987)

4.5. Système nerveux :

Le système nerveux est formé de cinq nerfs radiaires juxtaposés aux canaux radiaires du système aquifère. Ces nerfs dérivent des canaux péri-œsophagiens.

5. Répartition géographique :

Méditerranée, Adriatique, Atlantique depuis les Açores, les Canaries, les côtes du Maroc jusqu'au sud de l'Irlande, l'ouest de l'Ecosse et les Hébrides, Manche, nord de la Bretagne jusqu'au cap Fréhel (REGIS, 1987).

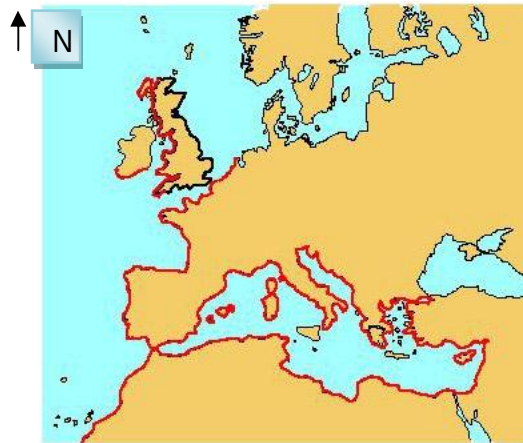
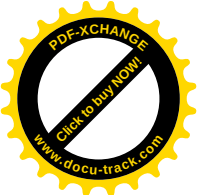


Fig.17 :L'aire de répartition de l'espèce est indiquée par le trait rouge (SOUALILI, 2008).

6. Habitat :

Espèce qui vit sur les roches et les pierres recouvertes d'algues, sur les prairies à Posidonies et sur les fonds sableux ou coralligènes. *Paracentrotus lividus* peut creuser les rochers ou utiliser les crevasses pour se fixer. Doté de ventouses puissantes, *Paracentrotus lividus* est capable de résister aux assauts du déferlement en s'ancrant solidement à son support (VERLAQUE, 1984).



Partie III: Matériels et méthodes

1. Couverture spatiale :

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à deux sites localisés au niveau de la côte nord occidentale algérienne, il s'agit du port pétrochimique d'Arzew caractérisé par un trafic maritime intense et l'activité pétrochimique la plus importante du pays ; et le site touristique de Madagh, considéré, jusqu'à présent, comme une zone relativement non impactée vu son éloignement de la métropole oranaise d'environ 40 Km, et où l'action anthropique directe est peu marquée.

Lors des campagnes d'échantillonnage, nous avons relevé certaines notes et paramètres physico-chimiques, dans une fiche d'échantillonnage détaillée dans la page suivante (fig.19).



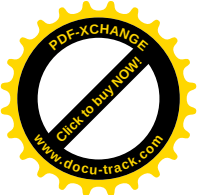


Fig.18 : Localisation des sites d'échantillonnage le long de la côte occidentale Algérienne



Réseau de Surveillance Environnementale
Département de Biologie - Faculté des Sciences
Université d'Oran



Référence station	Site	Code
-------------------	------	------

Coordonnées	Latitude	Longitude
-------------	----------	-----------

Etat du temps	Ensoleillé	peu nuageux	très nuageux	pluvieux
---------------	------------	-------------	--------------	----------

	Type de nuage	Précipitations			
	Direction du vent	Vitesse du vent			
Etat de la mer	Très calme.	Calme	peu agitée.	agitée	très agitée

Références de l'échantillon	Nature : eau	Espèce
-----------------------------	--------------	--------

Date du prélèvement	Heure du prélèvement
Profondeur	Nature du substrat

Informations complémentaires :

Opérateurs :

Fig. 19 : Fiche d'échantillonnage

1.1 Le site de Madagh (site de référence) :

Situé à l'ouest de la ville d'Oran, à environs 40 Km, de coordonnées géographiques : (Latitude Nord : 35°38'30.30"N, longitude Ouest : 1° 3'29.90"O). (Fig. 5) Ce site a déjà été utilisé comme site de référence dans des études antérieures de biosurveillance au niveau de notre laboratoire.

La plage de Madagh se trouve dans une baie protégée à ses extrémités par deux petits caps limitant l'action des vents et donc de l'hydrodynamisme local (Fig. 20.), de ce fait, la moindre introduction de substance xénobiotique pourrait bouleverser l'équilibre vulnérable de ce site.

Ce dernier étant considéré comme site relativement non impacté par rapport au port d'Arzew du fait de son éloignement des régions urbanisées, seules quelques petits villages se trouvent à proximité de cette plage, les activités humaines dans le domaine se limitent à la pêche artisanale, quelques parcelles de terre cultivées, sans oublier l'activité touristique durant la saison estivale ; aucune preuve de pollution évidente n'a encore été trouvée.



Fig. 20 : Vue panoramique du site de Madagh.

1.2. Le port d'Arzew :

Le port d'Arzew situé sur la partie nord-ouest du golfe portant le même nom, de coordonnées géographiques (latitude Nord : 35°51'10.60"N, longitude Ouest 0°17'45.99"O) (Fig. 6) c'est un site caractérisé par un trafic maritime intense, des rejets urbains de la ville d'Arzew ainsi que les villages adjacents, c'est un port mixte : Commercial, pêche ainsi qu'un grand port pétrochimique, (Fig.21).

Pour notre étude nous avons réalisé des échantillonnages sur la partie appartenant à la compagnie des hydrocarbures, nous nous sommes intéressés à la jetée réservée au chargement du pétrole et de ses dérivés.

Cette jetée est longue de 1400 m et abrite trois postes de chargement qui sont respectivement le P1 ayant un tirant d'eau de 9 m, le P2 ayant un tirant d'eau de 13 m et le P3 avec un tirant d'eau de 22 m.



Fig.21 : Vue panoramique du port d'Arzew

*** Site d'échantillonnage**

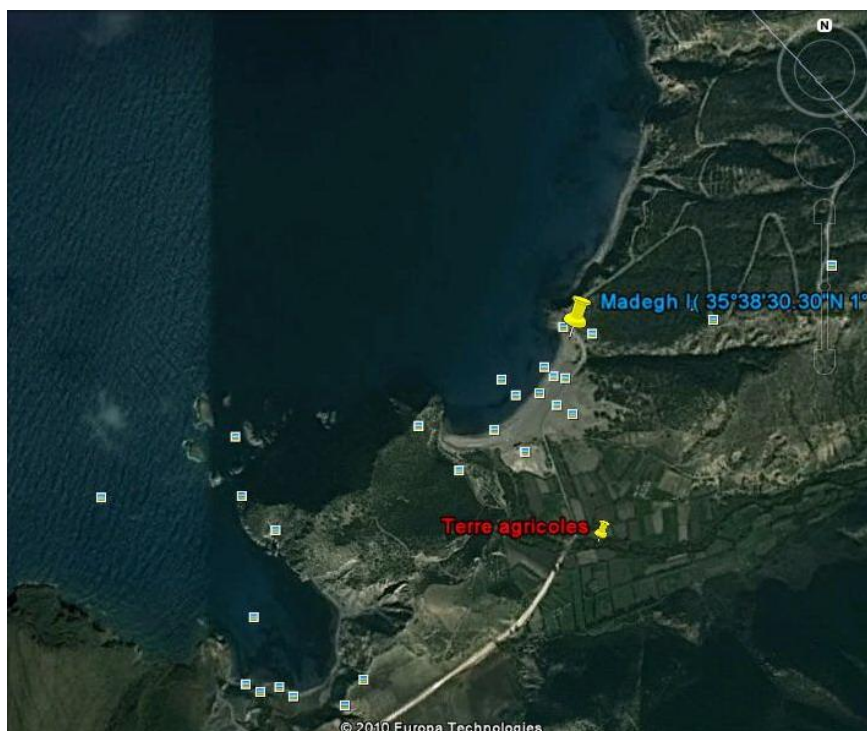
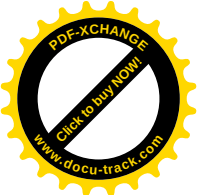


Fig.22 : Vue satellitaire de la zone d'échantillonnage au niveau de site de Madagh



Fig. 23 : Vue satellitaire de la zone d'échantillonnage au niveau du port d'Arzew



2. Couverture temporelle :

Les campagnes d'échantillonnages recouvrent les quatre saisons, et se sont déroulées de février à septembre 2010 au niveau du port d'Arzew, Les prélèvements étaient hebdomadaires et effectués de la manière suivante : la première semaine de chaque mois, les oursins étaient récoltés entre 0 à 5 mètres ; lors de la deuxième semaine, ils étaient prélevés entre 5 à 10 mètres, et enfin pendant la troisième semaine, les spécimens étaient ceux d'au-delà des 10 mètres, allant parfois entre 15 à 17 mètres (selon la disponibilité du matériel biologique et en restant toujours dans le domaine portuaire). Ainsi, au bout d'un mois, on couvraient les trois profondeurs.

A Madagh, nous avons réalisé trois campagnes d'échantillonnage, la première au mois de février, la deuxième au mois de juillet et la dernière au mois de septembre. Pour ce site de référence, on a procédé d'une manière peu différente, en prélevant des échantillons des trois profondeurs citées précédemment, pendant la même sortie de travail (faute de l'éloignement du site et de la disponibilité de l'opérateur).

Tous les spécimens ainsi récoltés sont transportés rapidement dans une glacière étanche et hermétique remplie d'eau de mer et, une fois au laboratoire, ils sont transférés dans un aquarium relié à une pompe à air et rempli d'eau de mer de la même profondeur où l'échantillonnage a été effectué, pour une phase de stabulation dans le but de minimiser le stress dû au prélèvement et au transport.

Pour garantir l'homogénéité des lots d'oursins *P. lividus*, une taille de 35mm (diamètre sans les piquants) correspondant à des adultes de 4 ans minimum (REGIS, 1978).



Prélèvement des échantillons



Transport des spécimens



Mise en stabulation des oursins



Prélèvement des organes



Extraction de la fraction S9

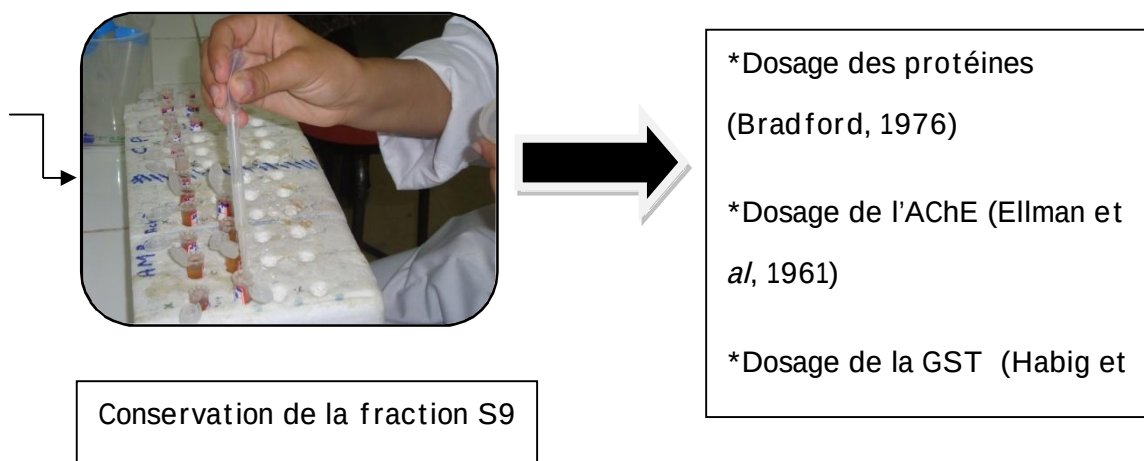


Fig. 24 : Synoptique illustrant les opérations de traitements des échantillons.

3. Méthodologie analytique :

3.1. Extraction de la fraction S9 :

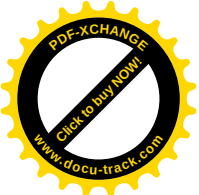
- *Pour le dosage de l'activité de l'AcHé* : les plaques ambulacraires sont broyées à l'aide d'un mortier dans du tampon Tris/HCl à 0.1 M et à un pH=8 ; dont le rapport de suspension est de 1 : 4 (poids du tissu : volume de tampon ajouté ; g : ml).
- *Pour le dosage de l'activité de la GST* : les cæcums pyloriques sont broyées à l'aide d'un homogénéisateur Ultraturax, dans du tampon phosphate à 100 mM et pH=6.5 ; dont le rapport de suspension est de 1 : 5 (poids du tissu : volume de tampon ajouté ; g : ml).

L'homogénat obtenu, il est centrifugé à 9000g pendant 20 minutes à une température de 4° C. le surnageant obtenu issu de la centrifugation appelé fraction S9 contient les enzymes solubilisées, il est stocké à -20°C avant le dosage enzymatique.

3.2. Dosage des protéines :

L'activité spécifique d'une enzyme est toujours exprimée par rapport à une quantité de protéines. Pour cette raison, il nous a fallu doser la quantité de protéines au niveau des différents échantillons. L'activité de l'AcHé et de la GST est exprimée en nano moles de substrat hydrolysés par minute et par milligrammes de protéines (nmol/ min/ mg prot).

Fort recommandée dans les différentes études de biosurveillance pour la détermination de la concentration en protéines au niveau des différents échantillons, nous avons utilisé la



technique de BRADFORD (1976) basée sur la coloration bleue développée lors de la fixation du bleu de Coomassie sur les groupements cationiques des protéines. Nous avons réalisé avec le sérum d'albumine bovine SBA, utilisée comme protéine standard, une courbe étalon à six points de concentrations croissantes (0 ; 0.25 ; 0.5 ; 1 ; 1.4 ; 2 mg SBA/ ml).

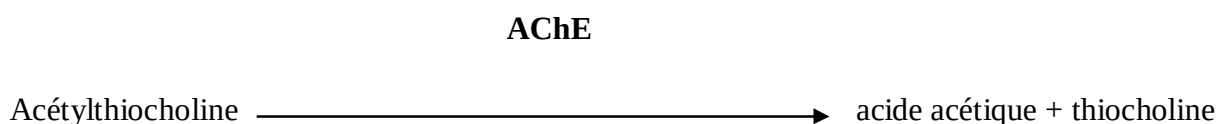
Pour le dosage des protéines au niveau des différents organes, les étapes suivantes sont réalisées :

- 0.1 ml d'échantillon est ajouté à 3 ml du réactif de Bradford pour un volume final de 3.1 ml
- Après une incubation de 5 à 15 minutes, ce mélange est transféré dans des cuves à spectrophotomètre.
- La lecture de l'absorbance se fait à $\lambda = 595$ nm.

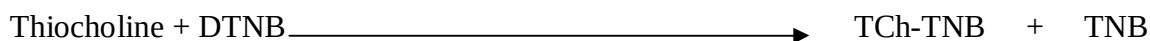
3.3. Dosage de l'activité de l'AChE :

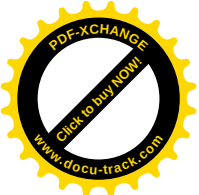
La détermination de l'activité de l'acétylcholinestérase a été réalisée en utilisant la méthode d'ELLMAN et al. (1961). Cette méthode mesure le produit de l'hydrolyse d'un substrat synthétique (analogue du substrat naturel), l'acétylthiocholine (ACTC) suivant la cinétique :

L'acétylcholine est hydrolysée par l'acétylcholinestérase, produisant de la thiocholine et de l'acide acétique.



La thiocholine libérée est révélée en utilisant le réactif d'Ellmann ou le DTNB (acide 5.5'-dithio-bis-2-(nitrobenzoïque) pour former, un produit annexe, la 4-thiocholine-5-thio-2-nitrobenzoate (TCh-TNB) et le produit final mesuré par son absorption à 412 nm est le 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB), résultant de l'attaque du DTNB par la thiocholine.





La fixation de l'ion dithiobisnitrobenzoate (DTNB) sur les groupements thiols (-SH) de la thiocholine provoque l'apparition d'une coloration jaune dont l'intensité est fonction de l'activité de l'AChE (BOCQENE & GALGANI, 2004).

La cinétique est suivie pendant 20 minutes ; elle se déclenche à 25°C en suivant les étapes suivantes :

- 50 µl de l'échantillon à doser sont ajoutés à 850 µl de tampon Tris à 0.1M ; pH=8.
- 50 µl du DTNB à 1.875mM sont ajoutés au mélange.
- Après une incubation de 5 à 10 minutes, l'introduction de 50 µl du substrat acétylthiocholine iodide (ACTC) à 8,25mM déclenche la réaction enzymatique.

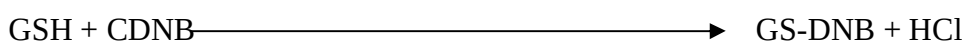
3.3.1. Expression de l'activité spécifique de l'AChE :

Sachant qu'une 1 Δ DO/min/mg correspond à l'hydrolyse de 75 nanomoles d'acétylthiocholine (BOCQENE & GALGANI, 2004), l'activité spécifique de l'AChE est exprimée en nanomoles de substrat hydrolysées rapportée à la teneur des protéines brutes (mg/ml) dans l'extrait de l'échantillon d'organe.

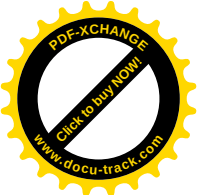
3.4. Dosage de l'activité de la GST :

La détermination de l'activité de la GST a été déterminée en utilisant la méthode de HABIG et *al*, (1974). Cette méthode mesure le produit de l'hydrolyse d'un substrat modèle peu spécifique des différentes isozymes de GST, le chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) et le glutathion réduit (GSH), ce produit de conjugaison est le 1-glutathion-2,4-dinitrobenzène (GS-DNB)

GST



La cinétique de la réaction est suivie durant 30secondes à 340 nm et à 37°C suivant les étapes suivantes :



- 10 μ l de l'échantillon sont ajouté à 850 μ l de tampon phosphate à 100 mM ; pH =6,5
- 100 μ l de GSH 100 mM sont ajouté au mélange précédent.
- Introduction de 50 μ l du substrat CDNB à 20mM

La vitesse initiale est proportionnelle à la quantité d'enzymes introduite dans la cuve. Un blanc de réactifs est mesuré avant les échantillons, il permet d'évaluer la vitesse de la réaction spontanée, qui n'est pas négligeable.

3.4.1. Calcul de l'activité de la GST :

a) Calcul de l'activité volumique :

On peut calculer l'activité volumique de l'enzyme responsable de cette réaction (GST) grâce à la formule suivante : $AV = (DO/min * 100 * 1) / \epsilon$

Facteur 100 pour tenir compte de la dilution 10 μ l dans 1000 et ϵ étant le coefficient d'extinction moléculaire du CDNB = $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

1 représente la longueur de la cuve en cm, le résultat est obtenu en $\mu\text{mol/min/ml}$

b) Calcul de l'activité spécifique :

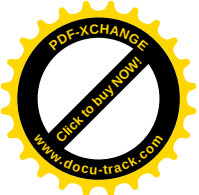
Enfin pour obtenir l'activité spécifique de l'enzyme il suffit de rapporter son activité volumique à la concentration de protéines de l'échantillon : $AS = (AV * 1000) / \text{prot}$

Où prot. Représente la concentration en protéine de l'échantillon en mg/ml, on multiplie par le facteur 1000 pour avoir le résultat en nmol/min/mg de protéine.

4. Traitements statistiques :

Les variations de l'activité de l'AChE et de la GST au niveau des organes cibles de l'oursin *Paracentrotus lividus* et au niveau des différentes profondeurs ont été statistiquement comparées par l'analyse de variance à sens unique ANOVA (test de Duncan). La différence est significative à seuil de probabilité (p) inférieur à 5% ($p < 0,05$).

Les analyses statistiques sont effectuées grâce au logiciel Microsoft STATISTICA (v 6.0).



Partie IV: Résultats et discussion

1. Variation de la teneur des organes en protéines :

1.1. Au niveau des plaques ambulacraires :

L'étude des variations des concentrations en protéines au niveau des plaques ambulacraires des oursins, révèle une grande similitude entre les spécimens du port d'Arzew et ceux de Madagh, avec une cohérence en fonction de la période d'échantillonnage ; on note que les valeurs maximales enregistrées sont ceux du mois de février 2010 avec respectivement $4,89 \pm 0,056$ mg/ml, et $4,88 \pm 0,054$ mg/ml au port d'Arzew et à Madagh ; tandis que la plus faible est relevée chez les oursins du port d'Arzew au mois de mai $2,43 \pm 0,15$ mg/ml.

Notons qu'une concentration de $2,98 \pm 0,037$ est enregistrée au niveau des échantillons du port d'Arzew et une valeur de $2,92 \pm 0,048$ mg/ml au niveau de Madagh pour le mois de juillet.

On remarque une légère augmentation de ce paramètre à partir du mois de septembre que ce soit au niveau du port ou chez les spécimens du site référentiel avec des valeurs respectives de $3,20 \pm 0,12$ et $3,58 \pm 0,10$ mg/ml

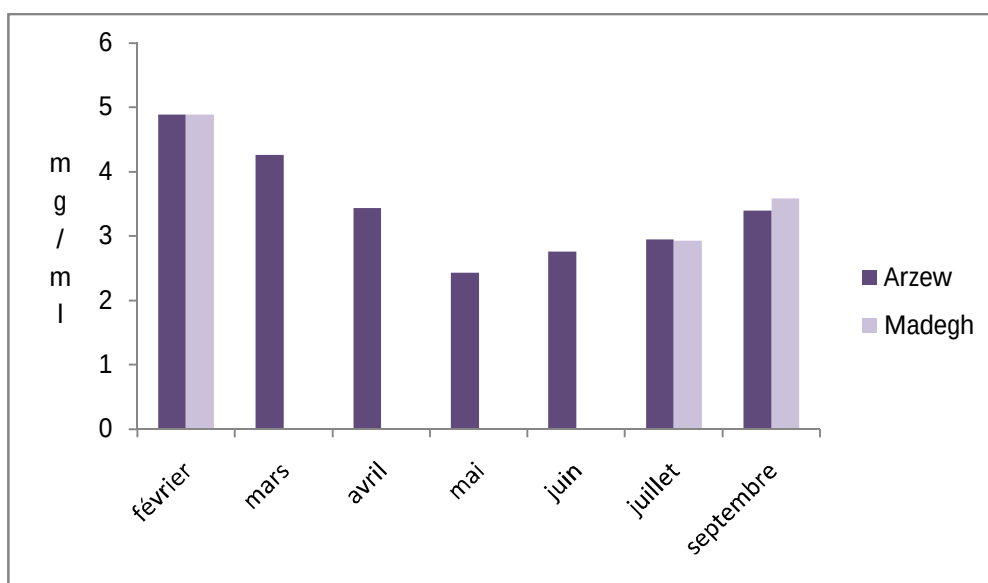


Fig.25 : Variation de la teneur en protéines au niveau des plaques ambulacraires des oursins *Paracentrotus lividus* du port d'Arzew et du site de référence Madagh

1.2. Au niveau des cæcums pyloriques :

La première constatation à noter est que les valeurs enregistrées au niveau des cæcums pyloriques sont plus grandes que celles relevées au niveau des plaques ambulacraires quelle que soit la période et le site d'échantillonnage.

La valeur maximale est de $5,41 \pm 0,27$ mg/ml enregistrée au mois d'avril au niveau du port d'Arzew, suivi par les valeurs enregistrées au mois de février avec $5,22 \pm 0,22$ mg/ml et $5,03 \pm 0,20$ mg/ml chez les oursins du port d'Arzew et de Madagh respectivement.

On remarque une diminution à partir du mois de mai $3,47 \pm 0,03$ mg/ml relevé au niveau du port d'Arzew qui atteint sa plus basse valeur au mois de juin avec $2,68 \pm 0,33$ mg/ml toujours au même site et garde cette allure pendant le mois de juillet avec des valeurs respectives de $2,75 \pm 0,04$ mg/ml et $2,82 \pm 0,17$ mg/ml au port d'Arzew et à Madagh.

Même constat que pour les concentrations en protéines au niveau des plaques ambulacraires, on observe ici aussi une augmentation à partir de mois de septembre au niveau des deux sites d'échantillonnage avec des concentrations de $3,71 \pm 0,37$ mg/ml et $3,70 \pm 0,18$ mg/ml à Arzew et Madagh respectivement.

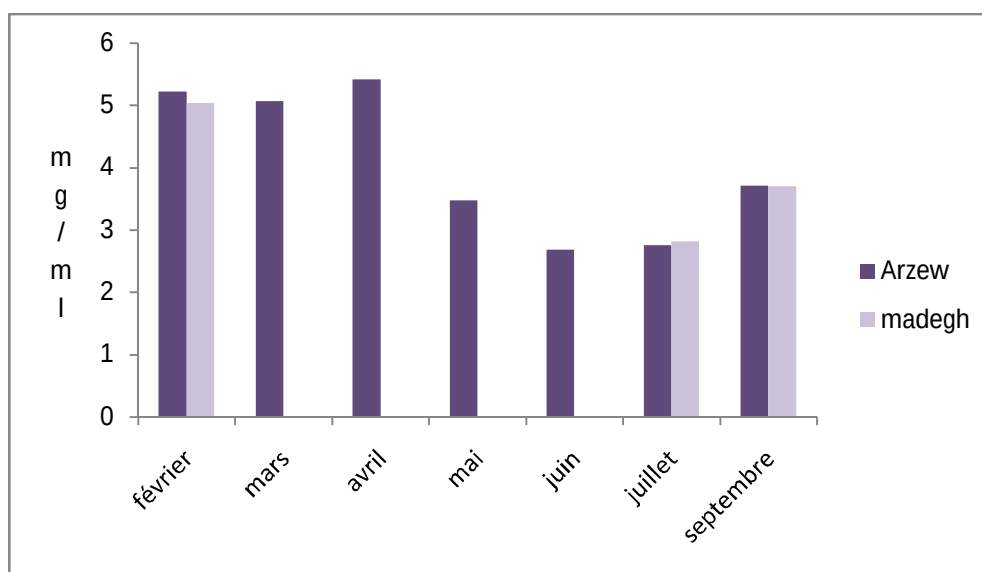
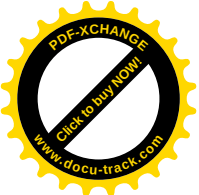


Fig. 26 : Variation de la teneur en protéines au niveau des cæcums pyloriques des oursins *Paracentrotus lividus* du port d'Arzew et du site de référence Madagh



1.3. Discussion :

La réponse biologique des organismes à un stress donné y compris l'activité enzymatique peut être influencée par différents paramètres, comme la disponibilité de la nourriture, les fluctuations saisonnières et le cycle reproductif (DEPLEDGE & LUNDBYE, 1996), (NASCI et al, 2002). A ce sujet, une étude préalable de l'état physiologique de l'organisme en question ainsi que la détermination des variations saisonnières s'avère indispensable dans les études de biosurveillance (RINGHOOD et al, 2002).

Le dosage des protéines est un indicateur général du cycle repos-ponte (LEE, 1989 ; MOHAN & KALYANI, 1989), en effet, les protéines sont accumulées et stockées et atteignent de manière générale, leurs niveaux les plus hauts pendant la période de repos en préparation de la phase de ponte, période à laquelle les concentrations atteignent les plus bas niveaux, pour augmenter juste après.

L'étude de la variation des teneurs en protéines au niveau des plaques ambulacraires et des cæcums pyloriques chez les oursins du port d'Arzew et ceux de Madagh, sur une période de cinq mois, qui a touché toutes les saisons, révèlent que les valeurs maximales ont été atteintes au mois de février qui correspond à la saison froide, et diminuent pendant les mois de mai et juin qui correspondent au printemps où la température s'adoucit légèrement, pour atteindre les valeurs minimales au mois de juillet qui coïncide avec la saison estivale, et affiche une augmentation à partir du mois de septembre.

D'après BYRNE (1990), le développement des organes reproducteurs de *Paracentrotus lividus* est influencé principalement par la profondeur, la photopériode et la température hivernale; la qualité et l'abondance de la nourriture (CRAPP & WILLIS, 1975 ; REGIS, 1979 ; SAN MARTIN, 1990).

Le déclenchement de l'émission des gamètes dans le milieu est déterminé par la température de l'eau. En Méditerranée, FENAUX (1968) signale que les températures des mois les plus froids de l'hiver exercent un rôle inhibiteur dans le déclenchement des émissions des gamètes.

L'étude de l'indice gonadique montre qu'il y'a une succession de pontes, pendant l'année, liées probablement aux variations de la température de l'eau, mais sont surtout regroupées au printemps et fin été dans la région d'Alger (SEMROUD & KADA, 1987)

Ce constat nous permet de déduire, d'après nos résultats, que les oursins du port d'Arzew ainsi que ceux de Madagh se reproduisent entre le mois d'avril et juillet, avec un pic en mai pour le premier site, et en juin pour le deuxième.

Il ressort aussi de l'étude de ce paramètre, que chez *Paracentrotus lividus*, le cæcum pylorique est l'organe le plus adapté pour une telle approche physiologique par rapport à la plaque ambulacraire.

2. Activité de l'Acétylcholinestérase :

2.1. Le choix de l'organe cible :

Les travaux de CUNHA et *al.* (2005), en ciblant plusieurs organes (fluide cœlomique, membrane cœlomique, canaux radiaires, muscles de la lanterne d'Aristote, ambulacres et complexe intestinal) de *Paracentrotus lividus*, ont révélé que l'organe le mieux adapté à l'étude de la variation de l'activité de l'ACHé, était la plaque ambulacraire en raison de sa résistance aux opérations d'échantillonnage et de son contact direct avec le milieu de vie, en outre de sa fonction sensorielle, son rôle dans le déplacement, la respiration voir même dans l'excrétion.

2.2. Étude de la variation de l'activité de l'ACHé :

2.2.1. Variation mensuelle de l'activité de l'ACHé au niveau du port d'Arzew et Madegh toutes profondeurs confondus :

Les résultats relatifs à l'activité mensuelle de l'ACHé au niveau des deux sites d'échantillonnage, illustrés dans la figure 3, montrent des variations spatio-temporelles notables selon le mois et le lieu de prélèvement.

A ce titre, on note que les valeurs maximales sont enregistrées pendant la saison chaude alors que les minimales pendant la saison froide, et ce, quelque soit le site.

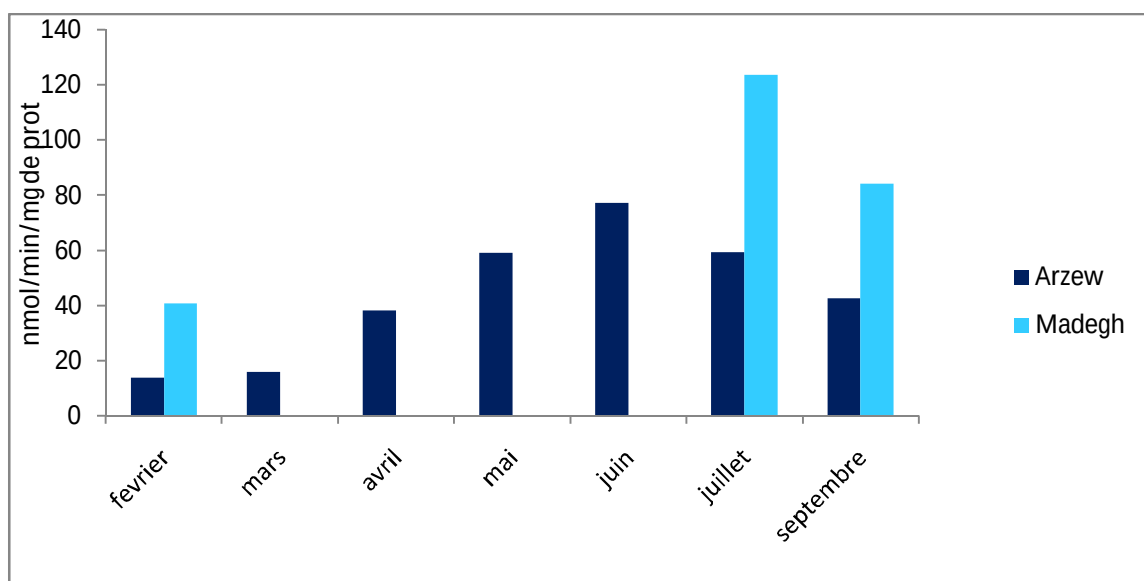
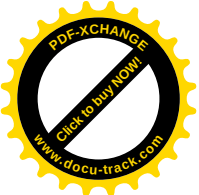


Fig. 27 : Variation mensuelle de l'activité de l'ACHé (nmol/min/mg de prot) déterminée chez *Paracentrotus lividus* récolté au port d'Arzew et de Madag



En effet, les valeurs maximales sont enregistrées au niveau du site de référence, variant de $40,89 \pm 13,20$ nmol/min/mg prot au mois de février à $123,534 \pm 26,29$ nmol/min/mg prot au mois de juillet, tandis que les valeurs minimales sont relevées au site portuaire d'Arzew, oscillant de $13,47 \pm 9,83$ nmol/min/mg prot au mois de février à $77,258 \pm 30,10$ nmol/min/mg prot au mois de juin.

L'approche mensuelle comparative de l'activité de l'AChE au niveau des deux sites de cette biosurveillance utilisant l'oursin commun comme bioindicateur fait ressortir les constats suivant :

Une différence mensuelle significative ($p < 0.05$) au sein du même site, entre les mois de février-mars et ceux de mai-juillet, avec des relevés de $13,87 \pm 9,83$ nmol/min/mg prot et $16,049 \pm 11,26$ nmol/min/mg prot, au port d'Arzew, pour les deux premiers mois coïncidant avec la saison hivernale et $59,11 \pm 28,40$ nmol/min/mg prot à $59,445 \pm 11,97$ nmol/min/mg prot pendant les mois correspondant à la saison estivale.

Cependant, il existe une différence hautement significative ($p < 0.01$) entre les deux zones pendant les mois de février et de juillet, on note respectivement, une activité de $13,87 \pm 9,83$ nmol/min/mg prot à Arzew et $123,534 \pm 26,29$ nmol/min/mg prot à Madagh.

Ces résultats sont en parfaite cohérence avec les résultats obtenus par CUNHA et *al.* (2005), en mesurant l'activité de cette enzyme chez *Paracentrotus lividus*, prélevé à Cabo do Mundo, situé à environ 4 Km du plus grand port du Nord du Portugal, site exposé régulièrement au contaminant industriels de la raffinerie avoisinante, et ont obtenu les valeurs suivantes : $25,036 \pm 4,5$ nmol/min/mg prot pendant l'hiver et $80,34 \pm 13,3$ nmol/min/mg prot pendant l'été à Vila Chã considéré comme site de référence dans cette étude.

Nos résultats, ne cohérent pas par contre, avec ceux obtenus en 2006 par TALEB et *al.*, au niveau du site de Madagh, où on relevait, chez le même organisme, au niveau de la plaque ambulacraire, au mois de février, la valeur de $104,70 \pm 4.67$ nmol/min/mg prot.

2.2.2. Variation mensuelle de l'activité de l'AChE au niveau du port d'Arzew et de Madagh en fonction des différentes profondeurs :

A) Le choix de l'approche par profondeur :

Lors de notre visite sur le terrain, nous avons été mis au courant des différents tirants d'eau et des différents courants locaux existant au niveau du port d'Arzew, nous avons vu l'utilité de doser l'activité de cette enzyme à différentes profondeur, pour voir s'il existait une corrélation entre ce paramètre et l'activité enzymatique de *Paracentrotus lividus* vivant à différentes profondeurs et soumis par conséquent à différents courant.

B) Sédentarité de *Paracentrotus lividus* :

Cet oursin se déplace peu, la distance journalière qu'il parcourt n'excède pas 2,2 m (FENAUX HW_DO., 1987 ; HEREU, 2005), les suivis réalisés sur 24 heures montrent une activité essentiellement nocturne, avec des pics d'activité plus ou moins marqués en fonction des individus. Il existe une moyenne de déplacement de 49 cm, et peut y avoir des dérivées journalières entre 0 et 240 cm sur les 24 heures. (DANCE, 1985).

Cependant une « migration » vers les zones profondes se produit lors des grosses tempêtes. Très vite après celles-ci, les oursins retournent sur leur zone de départ (REGIS HW_DO., 1986 ; GUETTAF et SAN MARTIN, 1995).

Paracentrotus lividus, est une espèce benthique, semi-sédentaire, qui parcourt de très faibles distances dans un espace temporel assez grand, ce qui laisse supposer qu'étant à l'abri des grandes tempêtes, et se trouvant dans un biotope où la nourriture est disponible, le cas du port d'Arzew, cette espèce tend à demeurer pratiquement au même emplacement, ce qui nous a permis de négliger la probabilité que les spécimens récoltés à différentes profondeurs, viennent d'un autre endroit que celui de leur prélèvement.

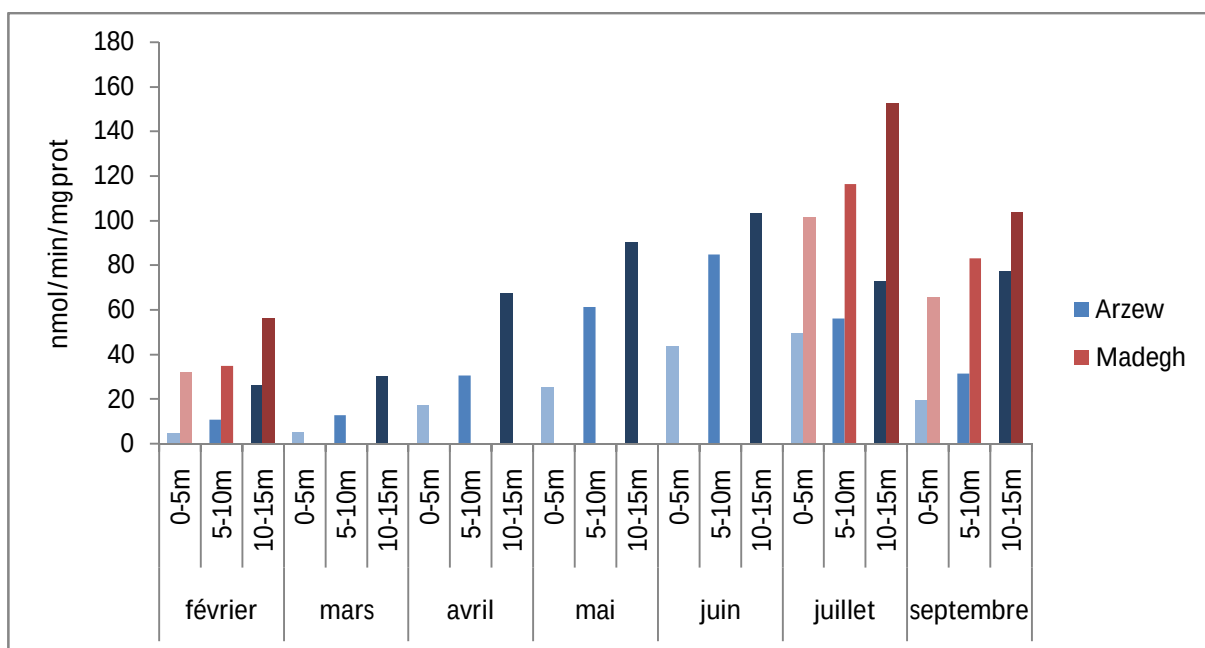
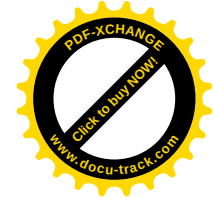
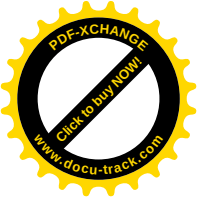


Fig. 28 : Variation mensuelle de l'activité de l'AChE (nmol/min/mg de prot) au niveau des deux sites en fonction de la profondeur de *Paracentrotus lividus*.



C) Résultats :

L'étude de l'activité mensuelle de l'AChE au niveau du port d'Arzew et au niveau du site de référence de Madagh, illustrée dans la figure 4, fait ressortir les résultats suivants :

Les concentrations obtenues chez les spécimens récoltés entre la profondeur de 0-5 m sont plus faibles que celle obtenues entre 5-10 m et ceux d'au-delà des 10 m sont nettement plus grandes que celles d'avant, quelque soit le mois et le site d'échantillonnage.

En effet, les valeurs relevées chez *Paracentrotus lividus* vivant au port d'Arzew entre 0 et 5 m, varient entre $4,77 \pm 1,04$ nmol/min/mg prot au mois de février à $49,45$ nmol/min/mg prot au mois de juillet, affichant ainsi une différence significative ($p < 0.05$) entre les valeurs enregistrées chez les spécimens vivant entre 5 à 10 m qui varient de $10,85 \pm 2,18$ nmol/min/mg prot au mois de février et $84,84 \pm 28,72$ nmol/min/mg prot au mois de juin.

On note une différence hautement significative ($p < 0.01$) entre les concentrations trouvées chez *Paracentrotus lividus* de 0-5m et ceux de 10-15m, ces dernières oscillant de $26 \pm 0,48$ nmol/min/mg prot au mois de février à $103,26 \pm 1,47$ nmol/min/mg prot au mois de juin pour le site d'Arzew.

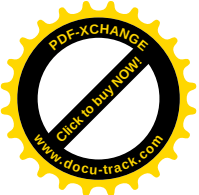
L'étude comparative de l'activité de l'AChE entre le site de référence de Madagh et le site portuaire d'Arzew, révèle des différences très significatives en comparant entre les différents mois d'échantillonnage et en fonction des différentes profondeurs.

D) Discussion :

Il est clair que les différences notées entre les deux sites de notre étude, sont dues à plusieurs facteurs, notamment, la nature de l'activité au niveau du port d'Arzew, il contient avec celui de Bethioua, l'activité maritime la plus intense du pays, les raffineries et les complexes GNL les plus grands et les plus actifs. N'oublions pas que nous avons choisi de récolter nos oursins au niveau des différents postes de chargement de pétrole et ses dérivés pour maximiser l'effet d'une éventuelle pollution, pour que si toutes fois il existerait des fluctuations entre les différentes profondeurs, cet effet sera le maximum que si l'on avait fait cette approche ailleurs, dans un site où les polluants auraient pu être dilués.

Ajouté à cela, l'éloignement de notre site de référence de toute agglomération et l'activité humaine presque inexistante en dehors de la saison estivale, où ce site connaît de une pression touristique intense, et durant toute l'année ce secteur côtier connaît une petite activité se limitant à la pêche artisanale, l'effet direct d'une pollution n'a jamais été observé, ce qui fait de Madagh un site relativement préservé par rapport au port d'Arzew.

Quant aux fluctuations enregistrées entre les différentes profondeurs, elles sont dues probablement aux courants locaux qui varient selon que l'on soit au premier point



d'échantillonnage correspondant au premier poste de chargement où le tirant d'eau maximal est de 9m et où l'intensité du courant est de 0,4 nœud et est de direction sud-est, d'allure rectiligne, ou que l'on soit au deuxième point de prélèvement qui correspond au deuxième poste de chargement où nous avons un tirant d'eau allant jusqu'à 13m et où l'intensité du courant est de 0,35 nœuds, toujours de même direction et de même allure, ou encore si l'on est au troisième point d'échantillonnage situé au troisième poste de chargement avec une profondeur atteignant les 22m et un courant de 0,4 nœuds mais, cette fois-ci en tourbillon vu la morphologie en cul-de-sac de ce poste, le courant là est le plus actif et l'eau à cet endroit est plus turbide ou moins stagnante, et donc elle se change à une fréquence plus élevée qu'au niveau des deux premiers endroits, ce qui explique les taux très significativement plus élevés ($p < 0.01$) de l'activité de l'ACHé enregistrés à ce niveau, en comparaison par rapport aux deux premiers points d'échantillonnage et entre lesquels une différence significative des concentrations de l'ACHé a été relevé ($p < 0.05$).

3. Activité de la glutathion S-transférase (GST) :

3.1. Le choix de l'organe cible :

L'activité de la GST a été mesurée selon la technique adaptée de HABIG et coll. au niveau de différents organes de l'oursin *Paracentrotus lividus*, à savoir : fluide et la membrane cœlomique, canaux radiaires, muscles de la lanterne d'Aristote, ambulacres et complexe intestinal avec ses différents composants (l'intestin proximal, médial et distal), cette mesure a révélé que l'activité de la GST n'est pas détecté à part dans le complexe intestinale, et on a relevé les plus grandes valeurs au niveau de la portion antérieure de l'intestin appelée également le cæcum pylorique. (CUNHA et *al*, 2005).

3.2. Résultats :

L'étude de la variation mensuelle de l'activité de la glutathion S- transférase illustrée dans la figure 5, montre que les valeurs maximales sont enregistrées au niveau de la station référentielle de Madagh, quel que soit le mois de l'échantillonnage et que les valeurs les plus basses sont relevées au niveau du port d'Arzew, on note qu'au niveau de Madagh les valeurs se situent entre $106,16 \pm 4,65$ nmol/min/mg prot au mois de février et $265,86 \pm 8,29$ nmol/min/mg prot au mois de septembre .

Les concentrations les plus faibles sont enregistrées au port d'Arzew et varient de $60,77 \pm 1,89$ nmol/min/mg prot au mois de février et $164,86 \pm 22,95$ nmol/min/mg prot enregistrée au mois de septembre.

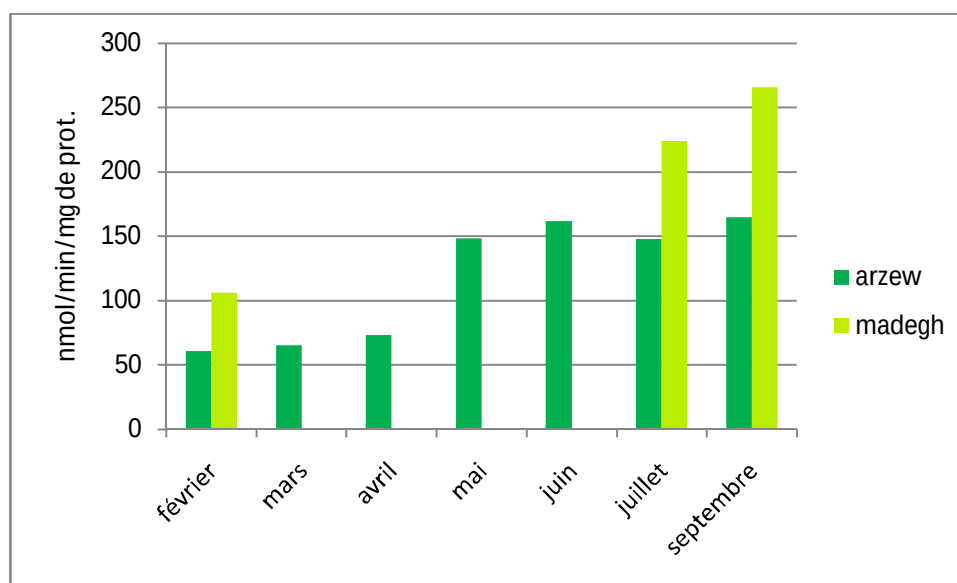


Fig. 29 : Variation mensuelle de l'activité de la GST au niveau du port d'Arzew et du site de référence Madagh.

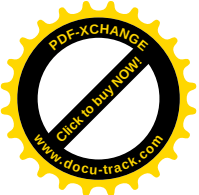
Le traitement statistique a révélé une inhibition très significative ($p < 0,01$) de cette enzyme au niveau des cæcums pyloriques des oursins du port d'Arzew par rapport à ceux de Madagh, quel que soit le mois du prélèvement.

On remarque que les taux les plus importants de l'activité de la GST sont relevés pendant les deux saisons estivale et automnale, pour le site de références; tandis que les plus faibles valeurs sont enregistrées durant la saison hivernale, pour ce même site.

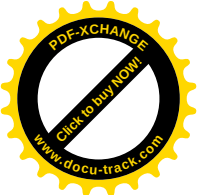
L'étude statistique de l'activité de la GST au niveau du port d'Arzew, montre qu'il existe une différence non significative ($p > 0,05$) entre l'hiver jusqu'à la fin du printemps (février-mars-avril) et entre les mois allant de (mai-juin-juillet) et affichent une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité de la GST pendant le mois de septembre.

3.3. Discussion :

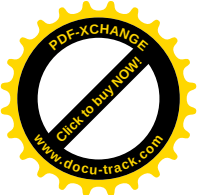
La variation saisonnière de l'activité de la GST obtenue lors de notre étude, est en accord avec celle réalisé par (CUNHA et al, 2005), où on relevé des valeurs variant d'un minimum de $79,2 \pm 18,0$ nmol/min/mg prot à Boa Nova (situé à 2 Km du port de Leixões et à coté d'une raffinerie pétrolière) durant l'hiver et un maximum de $279,0 \pm 48,0$ enregistré au niveau de Vila Chã pendant l'automne.



Les plus grandes activités de cette enzyme selon cette étude portugaise réalisée sur la même espèce *Paracentrotus lividus*, sont observées pendant l'été et l'automne et les plus faibles pendant l'hiver et le printemps.



Conclusion générale



L'utilisation exponentielle de substances polluantes par l'homme, leur présence dans l'environnement et leurs effets sur les écosystèmes et les ressources et, à terme, sur la santé humaine, constitue l'un des problèmes les plus préoccupant du XXI^{ème} siècle.

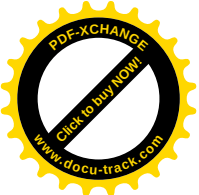
L'approche écotoxicologique de la contamination des systèmes naturels dans les programmes de biosurveillance se heurte en permanence à la complexité des mécanismes mis en jeu, due à la diversité des modalités et des caractéristiques de la contamination et des facteurs écologiques, abiotiques et biotiques,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

Les biomarqueurs sont des méthodes applicables pour l'évaluation du risque environnemental, en effet l'étude de la réponse biologique des organismes vivants aux polluants chimiques présents dans l'environnement marin représente un nouvel outil qui n'est pas destiné à dupliquer ou remplacer la surveillance chimique, mais qui doit être intégré dans les programmes de surveillances de l'environnement. Complémentaires des analyses physico-chimiques, les biomarqueurs peuvent jouer le rôle de systèmes d'alarme précoces d'une contamination dont les effets sont encore réversibles.

Notre choix du matériel biologique s'est porté sur l'oursin commun *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) souvent utilisé dans des programmes de *biomonitoring*. Afin de réaliser le présent travail, une longue campagne d'échantillonnage fut réalisée couvrant toutes les saisons de l'année allant de Février à Septembre 2010, au niveau du port pétrolier d'Arzew et le site référentiel de Madagh à trois profondeurs différentes (0-5m ; 5-10m ; 10-15m).

Notre étude est située à l'interface de deux classes de biomarqueurs : les biomarqueurs d'exposition et les biomarqueurs d'effet. La mesure de l'inhibition enzymatique de l'acétylcholinestérase, fut réalisé par spectrophotométrie cinétique selon la méthode Ellman *et al.*, 1961, et l'activité de la GST à été déterminée par la méthode de HABIG *et al.*, 1974 ; deux méthodes recommandées par les différents réseaux de surveillance environnementale internationale.

Les résultats relatifs à l'activité mensuelle de l'AChE au niveau des deux sites d'échantillonnage montrent des variations spatio-temporelles notables selon le mois et le lieu de prélèvement. A ce titre on note que les valeurs maximales sont enregistrées pendant la saison chaude alors que les minimales pendant la saison froide, et ce, quelque soit le site.



L'étude comparative de l'activité de l'**AChE** entre le site de référence de Madagh et le site portuaire d'Arzew, révèle des différences très significatives en comparant entre les différents mois d'échantillonnage et en fonction des différentes profondeurs.

L'étude de la variation mensuelle de l'activité de la **glutathion S-transférase** montre que les valeurs maximales sont enregistrées au niveau de Madagh en septembre et que les valeurs minimales sont relevées au niveau du port d'Arzew au mois de février.

Dans l'état actuel de nos connaissances, il est certain que l'emploi des biomarqueurs dans la surveillance de l'environnement est encore limité à certains types de pollutions bien précis. Mais si nous admettons qu'un effet toxique est toujours lié à une expression biochimique, physiologique ou anatomique chez les êtres vivants, nous pouvons espérer développer dans le futur d'autres indicateurs biologiques et élargir ainsi le spectre des contaminations décelées.

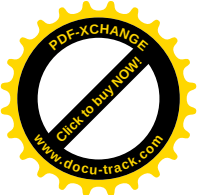
Il serait intéressant, également de comparer les réponses biologiques en fonction des données chimiques de la contamination au niveau des différents sites impactés étudiés. En effet, des corrélations devraient être établies entre les niveaux d'impact par le biais de biomarqueurs et les concentrations mesurées en polluants chimiques induisant ces biomarqueurs en eau de mer ou dans les sédiments.

Pour cela, il nous faudrait agir dans l'immédiat sur les points suivants :

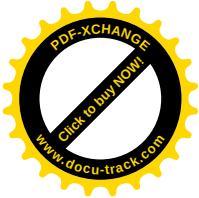
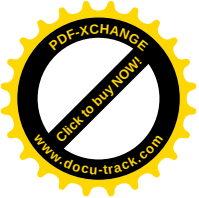
-faire de la biosurveillance environnementale par le biais de biomarqueurs, une pratique courante le long des côtes algériennes, ceci permettraient à long terme l'obtention d'une base de données fiables, acquises en suivant des méthodes normalisées et qui pourra servir de référence aux surveillances futures.

-développer une synergie entre l'étude de modèles biologiques sur les organismes, la qualité de l'environnement et la protection de la santé humaine. Contribuer à l'intégration de l'évaluation de la qualité de l'environnement comme facteur de contrôle de la qualité de la santé humaine.

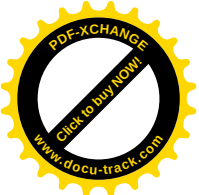
-doter le pays de réseaux de surveillance couvrant la totalité du territoire afin de surveiller la qualité du milieu marin, et par la suite élaborer une politique environnementale basée sur l'objectif d'un développement durable.



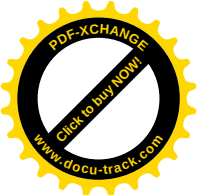
- la mise en œuvre de campagnes de biosurveillance à l'échelle du littoral national, en utilisant la technique des transplants sur la base d'un protocole expérimental standardisé, pour le suivi et l'évaluation des apports de contaminants à la colonne d'eau et leurs éventuels impacts sur l'écosystème marin.



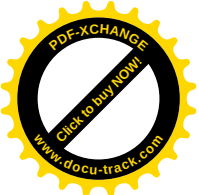
Références bibliographiques



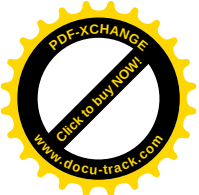
- **AEE** (1999). Agence européenne de l'environnement
- **AH-PENG, C.** (2003). Mise au point d'un outil diagnostique basé sur l'utilisation de la mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* Hedw. en culture pour l'estimation de la qualité des cours d'eau. Diplôme de recherches technologiques. Université de Lille II, p. 187.
- **AMIARD, J.C., CAQUET, T. & LAGADIC, L.** (1998a). Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F., eds, *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, Lavoisier, Paris, p. XXI-XXXI.
- **AMICHOT, M., BRUN, A., CUANY, A., DE SOUZA, G., LE MOUEL, T., BRIDE, J.M., BABAUT, M., SALAUN, J.P., RAHMANI, R. & BERGE, J.B.** (1998) Induction of cytochrome P450 activities in *Drosophila melanogaster* strains susceptible or resistant to insecticides. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 121, p. 311–319
- **ANDRAL, B. & ALZIEU, C.** (2004). Emploi d'une méthode de transplantation de mollusques pour l'évaluation de l'impact des immersions des sédiments drogues. IFREMER. Centre de Toulon. La Seyne sur mer.
- **BAI M, ZHOU JM & PERRETT S** (2004). The yeast prion protein Ure2 shows glutathione peroxidase activity in both native and fibrillar forms. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 50025-50030.
- **BERTRAND, P.** (2002). Chef de Service du Service de Protection des Végétaux, DAF Martinique.- Communication personnelle le : 12 /03/2002.
- **BINELLI, A., RICCIARDI, F., RIVA, C., PROVINI, A.** (2006). New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *ELSEVER. Chemosphere* 62, p. 510–519.
- **BISMUTH, C.** (1993). Armes chimiques, description et risques toxiques. Réanim Urgence ; 2, p. 625-33.
- **BLANCHETTE, G., CARPENTIER, P., LALLEMENT, G.** (1991). Vulnérabilité du système nerveux central vis-vis des neurotoxiques organophosphorés. Méd Amées; 19, p. 403-7.



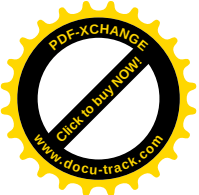
- **BLANCHETTE & SINGH.** (1999) cité par **AARAB NADIA** dans *les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de doc.PhD université de Bordeaux I, 2004. paragraphe 2, page 28*
- **BLANDIN, P.** (1986). Bioindicateur et diagnostic des systèmes écologiques. Bulletin d'Ecologie, T. 17(4), p. 1-309.
- **BOCQUENE, G., GALGANI, F. & TRUQUET, P.** (1990). Characterization and assay for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. Marine Environmental Research 30, p. 75–89.
- **BOCQUENE, G., CHANTEREAU, S., BEAUSIR, E., RAFFIN, B.** (2002). MONERIKA : suivi des effets biologiques du pétrole de l'ERIKA sur la moule (*Mytilus edulis*) des zones contaminées. Projet N° 7 ; Rapport de contrat IFREMER-MEDD-ENERIS, p. 28.
- **BODIN, N., BURGEOT, T., STANISIERE, J.Y, BOCQUENE, G., MENARD, D., MINIER, C., BOUTET, I., AMAT, A., CHEREL, Y., BUDZINSKI, H.** (2004). Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. ELSEVIER. Comparative biochemistry and physiology, Part C 138, p. 411-427.
- **BOLTON & AMOKAS.** (1997), Role of Quinones in Toxicology. *Chemical Research in Toxicology* 13: 135-160.
- **BORGERAAS.** (1996) cité par **AARAB NADIA** dans *les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de doc.PhD université de Bordeaux I, 2004. paragraphe 2, page 28*
- **BRADFORD, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- **BUFFAT, J. J., BONSIGNOUR, J. P., RICORDEL, I., DIRAISON, Y.** (1989). Toxicité des " gaz " de combat. In : JEPUI, éd. La réanimation respiratoire préhospitalière. Paris : Arnette, p. 67-91.
- **BUSHWAY, R.J., HURST, H.L., PERKINS, L.B., TIAN, L., CABANILLAS, C.G., YOUNG, B.E.S., FERGUSON, B.S. & JENNINGS, H.S.** (1992).-Atrazine, alachlor, and carbofuran contamination of well water in central Maine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 49, p. 1-9.



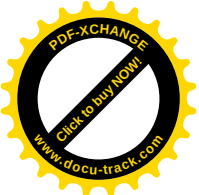
- **BYRNE, M.** (1990): Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus*, from an exposed intertidal and sheltered subtidal habitat on the West coast of Ireland. *Mar Biol*, 104: 275-289.
- **CAJARAVILLE, M.P., BEBIANNO, M.J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C., VIARENGO, A.** (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, p. 201–212.
- **CASAS, S.** (2005). modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, en milieu méditerranéen. Thèse de doctorat, p. 314.
- **CHUNA, I., GARCIA, LM. GUILHERMINOAC, L.** (2005). Sea-urchin *Paracentrotus lividus*, glutathione S-transferases and cholinesterase activities as biomarkers of environmental contamination. the royal society of chemistry, 2005, pages: 288 – 294.
- **COSSON, D., ABARNOU A., ANDRAL, B., BOUGRIER S., BUESTEL, D., CLAISSE, D., HATT, P. J. & STANISIERE J. Y.** (1998). De l'usage de la méthode des transplants de moule pour le suivi de la contamination chimique 283 le long des cotes méditerranéennes françaises. Compte rendu et recommandations de l'atelier RINBIO. Rapport DEL/PC, RA708, Ifremer, p. 76.
- **COSSU C., DOYOTTE A., JACQUIN M.C., BABUT M., EXINGER A., VASSEUR P.,** (1997). Glutathion reductase, selenium-dependent glutathion peroxidase, glutathion levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 38, 122-131.
- **COUILLARD, Y., CAMPBELL, P.G.C., TESSIER, A., PELLERIN-MASSICOTTE, J. & AUCLAIR, J.-C.** Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I: Temporal changes in metallothionein and metals (Cd, Cu and Zn) concentrations in soft tissues. *Can J Fish Aquat Sci*, 52, 690-702
- **CRAPP, G.B. & WILLIS, M.E.** (1975): Age determination in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck), with notes on the reproductive cycle. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.*, 2 : 157-178.



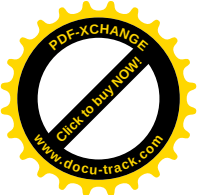
- **DA ROS, L., MENEGHETTI, F., NASCI, C.** (2002). Field application of lysosomale destabilization indices in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: biomonitoring and transplantation in the lagoon of Venice (north– east Italy). *Mar. Environ. Res.* 54, p. 817– 822.
- **DAMIENS, G., HIS, E., GNASSIA-BARELLI, M., QUINIOU, F. & ROMEO, M.** (2004). *ELSEVIER. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 138 (2), p. 121-128. Evaluation of biomarkers in oyster's larvae in natural and polluted conditions.
- **DANCE C.** (1985) -Contribution à l'étude des Echinoides réguliers du parc national de Port-Cros : Déplacement de *Paracentrotus lividus*. Prédation de *Paracentrotus lividus* par *Marthasterias glacialis*. Relation taille poids chez *Sphaerechinus granularis*. *Mem.D.E.A.E.Ecol.Medi*, Uni.Aix-Marseille II, France., 1-80.
- **DAUBERSCHMIDT, C., DIETRICH, D. R., SCHLATTER, C.** (1997). Organophosphates in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*: subacute exposure, body burdens and organ concentrations. *Archives of Environmental Contamination and Technology* 33, p. 42–46.
- **DEPLEDGE, M.H.** (1993). Ecotoxicology: a science or a management tool. *Ambio* 22, p. 51–52.
- **DEPLEDGE, M. H., AAGAARD, A., GYORKO, P.** (1995). Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin* 31, p. 19–27.
- **DESROSIERS, G., BRETHES, J.-C. & LONG, B.** (1984). L'effet d'un glissement de terrain sur une communauté benthique médiolittorale du nord du golfe Saint-Laurent. *Oceanologica Acta*, 7, p. 251--258.
- **DESROSIERS, G., D. BELLAN-SANTINI, & BRETHES, J.-C.** (1986). Organisation trophique de quatre peuplements de substrats rocheux selon un gradient de pollution industrielle (Golfe de Fos, France. *Mar. Biol.* 91, p. 107-120.
- **DESROSIERS, G., BELLAN-SANTINI, D., BRÊTHES, J.-C. & WILLSIE, A.** (1990). Variability in trophic dominance of crustaceans along a gradient of urban and industrial contamination. *Mar. Biol.* 105, p. 137-143.
- **ECOBICHON, D. J.** (1996). Toxic effects of pesticides; *In: CASARETT & DOULL'S Toxicology: the Basic Science of poisson*, Ed. Andur, M. O., Doull, J., Kleassen, C. D. Chap. 22, p. 643-689.



- **ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDREAS, V., FEATHERSTONE, R.M.** (1961). A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochemistry & Pharmacology* 7, p. 88–95.
- **ENGEL, D.W. & VAUGHAN, D.S.** (1996) Biomarkers, natural variability, and risk assessment: can they coexist? *Human and Ecological Risk Assessment* 2, p. 257-262
- **ERNST R, KLEMM R, SCHMITT L, KUCHLER K & HELMUT.** (2005). Yeast ATP-Binding Cassette Transporters: Cellular Cleaning Pumps. *Methods in Enzymology* 400: 460-484.
- **ESCARTIN, E. & PORTE, C.** (1997). The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, p. 2090– 2095.
- **FAO/WHO** (1996). Pesticide Residues in Food – 1996, Rapport N°140 (extrait du document UNEP/FAO/PIC/ICRC3/17.Add1, informations concernant la DL50 du carbofuran, p. 35).
- **FENAUX, L.,** (1968) : Maturation des gonades et cycle saisonnier des larves chez *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* et *Psammechinus microtuberculatus* (Echinides) à Villefranche-sur –mer. *Vie.Milieu*, Fr., A 19 (1) : 1-52
- **FENAUX.L., ETIENNE.M., ET QUELART. G,** (1987), Suivi écologique de l'évolution d'un peuplement de *Paracentrotus lividus* dans la baie de Villefranche – sur-mer, France, In : Boudouresque C-H.ed., *Colloque International sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*, GIS Posidonie publ. Marseille, Fr.,:187-197.
- **FISHER, W., BAUCHOT, M. L. & SCHNEIDER, M.** (1987). Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Vol 1. Végétaux et Invertébrés. Publication FAO et commission de communautés européennes. Rome, FAO, Vol. 1, p. 760.
- **FITZPATRICK, PG., LIVINGSTONE DR, LEMAIRE P, MATTHEWS A, PETERS LD., PORTE C.** (1995) Assessment of the impact og organic pollutants on goby (*Zosterisessor Ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice lagoon, Italy: biochemical studies. *Mar Environ Res*, 39, 235-240.
- **FITZPATRICK, PG., SHEEHAN D,** (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.

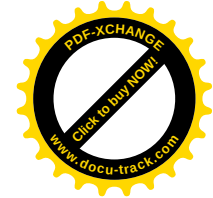
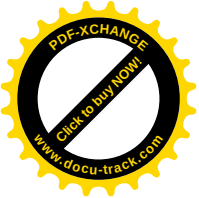


- **FLEISHER, J. H. & HARRIS, L. W.** (1965). Dalkylation as a mechanism for aging of cholinesterase after poisoning with pinacolyl methylphosphonofluoridate. *Biochem pharmacol*; 14, p. 641-50.
- **FOLEY, VM & SHEEHAN D, MEADE G & DOWD CA** (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* 360: 1-16.
- **FOURNIER, D.** (2006-2007). Etude fonctionnelle de l'acétylcholinestérase. Equipe : Biotechnologie des proteines/ Laboratoire : IPBS, Toulouse.
- **FRASCO, M. F., FOURNIER, D., CARVALHO, F., GUILHERMINO, L.** (2006). Cholinesterase from the common prawn (*Palaemon serratus*) eyes: Catalytic properties and sensitivity to organophosphate and carbamate compounds *Aquatic Toxicology* 77, p. 412–421
- **FRENZILLI, G., BOCCHETTI, R., PAGLIARECCI, M., NIGRO, M., ANNARUMMA, F., SCARCELLI, V., FATTORINI, D., REGOLI, F.** (2004). Time-course evaluation of ROSmediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *ELSEVER. Marine Environmental Research* 58, p. 609–613.
- **GALGANI, F. & BOCQUENÉ, G.** (1989). A method for routine detection of organophosphates and carbamates in sea water. *Environmental Technology Letters* 10, p. 311-322.
- **GALGANI, F. & BOCQUENÉ, G.** (1990). *In vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 45, p. 243–249.
- **GALGANI, F., BOCQUENÉ, G. & CADIOU, Y.** (1992). *Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea*, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91, p. 77–82.
- **GALGANI, F. & BOCQUENÉ, G.** (2000). *Molecular biomarkers of exposure of marine organisms to organophosphorus pesticides and carbamates*, [in:] *Use of biomarkers for environmental quality assessment*, L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard & F. Ramade (eds.), Sci. Publ., Inc., Enfield USA, Plymouth UK, p. 113–134.
- **GALLOWAY, T. S., MILLWARD, N., BROWNE, M. A., DEPLEDGE, M. H.** (2002). Rapid assessment of organophosphorous / carbamate exposure in the bivalve

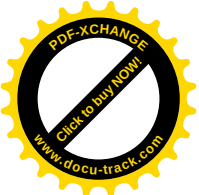


mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. ELSEVER. Aquatic Toxicology 61, p. 169–180.

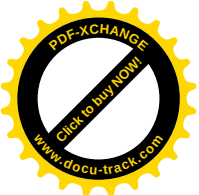
- **GARCERA A, BARRETO L, PIEDRAFITA L, TAMARIT J & HERRERO E** (2006) Saccharomyces cerevisiae cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. *Biochemical Journal* **398**: 187-196.
- **GEFFARD, A., AMIARD-TRIQUET, C., AMIARD, J. C.** (2005). Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? ELSEVER. Ecotoxicology and Environmental Safety 61, p. 209–220.
- **GEORGE S. G.** (1990). Correlation of metal accumulation in mussels with the mechanisms of uptake, metabolism and detoxification: a review. *Thalassia Jugoslavica* 16 (2-4): 347-365.
- **GEORGE S. G & YOUNG.** (1988). The effect of salinity on the uptake of cadmium by the common mussel, *Mytilus edulis* (L.). Physiology and behaviour of marine organisms. D. S. McLusky et A. J. Bary. Oxford, Pergamon Press: 189-193
- **GIAM, C.S. & L.E. RAY, EDS** (1987). Pollutant studies in marine animals. Boca Raton, Fla, CRC Press, p. 187.
- **GRASSE, P. P., POISSON, R. A. & TUZET, O.** (1961). Zoologie. Invertébrés I. Précis de sciences biologiques. Masson et Cie Editeurs, p. 919.
- **GROSJEAN. F., 2001** -Growth model of the reared sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) *Thèse PhD*. U.L.B., Belgique.
- **GUIHO, M.** (1995). Les réseaux de surveillance: résultats, évolution. In: Qualité des Eaux et Produits phytosanitaires: Du Diagnostic à l'Action (Bretagne Eau Pure, ed.), p. 19-30. Rennes.
- **HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, B.** (1974). Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249 (22), p. 7130-7139.
- **HARVEY, E.B., GIRARD,** (2005) –KCL method. *Biol.Bull.Mar .Biol.Lab.Woods.Hole* 79: 363.
- **HINTON, D.E. & LAURÉN, D.J.** (1990). Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *Am. Fish. Soc. Symp.* 8, p. 51-66.



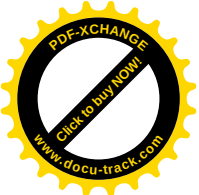
- **HOGAN, J. W.** (1970). *Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills*, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 5 (4), p. 347–353.
- **HONG.** (1999) cité par **AARAB NADIA** dans *les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de doc.PhD université de Bordeaux I, 2004. paragraphe 2, page 28*
- **HONKOOP, P.J.C., BAYNE, B.L., UNDERWOOD, A.J., SVENSSON, S.** (2003). Appropriate experimental design for transplanting mussels (*Mytilus* sp.) in analyses of environmental stress: an example in Sydney Harbour (Australia). ELSEVER. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 297, p. 253– 268.
- **HUBATSCH I, RIDDERSTROM M & MANNERVIK B** (1998) Human glutathione transferase A4-4: an Alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochemical Journal* 330: 175-179.
- **HUGGETT, R. J., KIMERLE, R. A., MEHRLE, J. R., BERGMAN, E. D. S.** (1992). *Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*, SETAC Spec. Publ. Ser., Lewis Publ., Boca Raton, p. 5–17.
- **IFREMER** (Septembre 2003). Les nouvelles de l'Ifremer. N°50, p. 4.
- **INSP** (Mars 2007). Institut National de Santé Publique du Québec. Atteinte de système consécutive à une exposition aux insecticides organophosphorés ou carbamates. Document à l'appui à la définition nosologique. Institut national de Santé publique. N° 634, p. 42.
- **IPCS** (1986). International Program on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 63: organophosphorus Insecticides: A General Introduction. World health Organization (WHO), Geneva, p. 181
- **ISHIKAWA T, LIZS. LUYP & REA PA** (1997) The GS-X pumps in plant, yeast, and animal cells: Structure, function, and gene expression. *Bioscience Reports* 17: 189-207.
- **KAMISAKA.** (1975) cité par **AARAB NADIA** dans *les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de doc.PhD université de Bordeaux I, 2004. paragraphe 2, page 28*



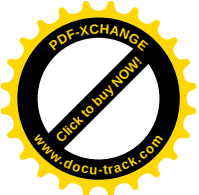
- **KATO, S ET SCHROETER, S.C.** (1985). Biology of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanis*, and its fishery in California. *Marine Fisheries Review* 47, 1-20.
- **KEERAN & LEE** (1987) cité par **AARAB NADIA** dans *les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain*. Thèse de doc. PhD université de Bordeaux I, 2004. paragraphe 2, page 28
- **KIRBY, M. F., MORRIS, S., HURST, M., KIRBY, S. J., NEALL, P., TYLOR, T., FAGG, A.** (2000). *The use of cholinesterase activity in flounder (Platichthys flesus) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in the UK estuaries*, Mar. Pollut. Bull., 40 (9), p. 780–791.
- **KOPECKA, J., RYBAKOWAS, A., BARSIENTE, J., PEMPKOWIAK, J.** (2004). AChE levels in mussels and fish collected off Lithuania and Poland (southern Baltic), by *Institute of Oceanology PAS*. *OCEANOLOGIA*, 46 (3), p. 405–418.
- **KRISHNA DAS.** (2006). *Ecotoxicologie Marine et Biochimie de la pollution*. Programme de cours 2006-2007. Université de Liège.
- **LAFABRIE M., NARBONNE J.F & GALGANI F.** (1992). Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin. *Anal. Mag.*, v. 20, n° 6: 27-33.
- **LAFLAMME D.** (2000). Bêta amyloïde : un neuromodulateur négatif. L'art de neuromoduler. <http://www.csrs.qc.ca/MitchellMontcalm/proj/NEUROMOD/index.htm>
- **LAFONTAINE Y, GAGNE F, BLAISE C, COSTAN G, GAGNON P, CHAN HM.** (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology*. (50)1-2, p. 51-71.
- **LAGADIC, L., CAQUET, T. & RAMADE, F.** (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology*, 3, p. 193-208.
- **LAU, P.S., WONG, H.L., GARRIGUES, PH.** (2004). Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in eastern oceanic and western estuarine waters of Hong Kong. *ELSEVIER. Continental Shelf Research* 24, p. 1969-1987.
- **LAWSON A. A. & BARR R. D.** (1987). Acetylcholinesterase in red blood cells. *American Journal of Hematology*, 26, p. 101-112.



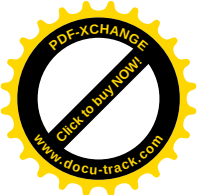
- **LEBLANC, GA & COCHRANE.** (1987). The endocrinology of invertebrates. In: de Fur PL, Crane M, Ingersoll C, Tattersfield L, eds. Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing and assessment. Pensacola, FL, SETAC Press, p. 23-106
- **LEE J.G, ROBERTS S. B. ET MOREL F.M.M.** (2000) Cadmium: a nutrient for the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnology and Oceanography*, 40, 1056-1063.
- **LIVINGSTONE, D.R.** (1991). Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: Gilles, R. (Ed.), Advance in Comparative and Environmental Physiology, vol. 7. Springer, Berlin, p. 45–185.
- **LIVINGSTONE, D. R.** (1993). Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 57, p. 195–211.
- **LIVINGSTONE, D. R.** (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42 (8), p. 656–666.
- **LOPEZ-BAREA, J. & PUEYO, C.** (1998). Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutation Research* 399, p. 3–15
- **LUND AMADO, L., RICARDO, B., ROBALDO, B., GERACITANO, B. L., JOSÉ, MONSERRAT M., BIANCHINI A.** (2006). Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. *ELSEVER. Marine Pollution Bulletin* 52, p. 207-213.
- **MALBROUK, C.** (2005). Les biomarqueurs d'exposition de phase I et II. Application à la surveillance de l'environnement. Chercheurs aux Facultés Universitaires N.D de la Paix-Namur.
- **MALLAT, J.** (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, p. 630-648.
- **MARTEL, P., KOVACS, T., VOSS, R. & MEGRAW, S.** (2003). "Evaluation of caged freshwater mussels as an alternative method for environmental effects monitoring (EEM) studies." *Environ. Pollut* **124** (3), p. 471- 483.



- **MARTINEZ-LARA.** (1997) Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *The Science of the Total Environment*, Suppl 1, 109-16.
- **MARTINOLI, M. G., WILLIAMS, L.M., KAH, O., TITCHENER, L.T. & PELLETIER, G.** (1991). Distribution of central melatonin binding sites in the goldfish brain (*Carassius auratus*). *Mol. Cell. Neuroscience* 2(1), p. 78-85.
- **MÄRKEL, K.** (1969) Morphologie der Seeigelzähne. II. Die gebielten Zähne der Echinacea (Echinodermata, Echinoidea). *J.Morph.Tiere*, 66: 1 -50.
- **MAYER, F.L., VERSTEEG, D.J., MAC KEE, M.J., FOLMAR, L.C., GRANEY, R.L., MAC CUMIE, D.C. & RATTNER, B.A.** (1992) Physiological and nonspecific biomarkers. In Huggett R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M. et Bergman H.L., eds, *Biomarkers : biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*, Lewis Publishers, Chelsea, p. 5-86.
- **MC HENERY, L. J. G., LINELY ADAMS, G. E., MOORE, D. C., RODGER, G. K., DAVIES, I. M.** (1997). Experimental and field studies of effects of dichlorvos exposure on acetylcholinesterase activity in the gills of the mussel *Mytilus edulis* L. *Aquatic Toxicology* 38, p. 125–143
- **MIQUEL, M. G.** (2001). les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. Assemblée nationale n° 2979. 6 avril 2001 et Sénat n° 261. 5 avril 2001, p. 365.
- **MIOHAN & KALYANI.** (1989)
- **MOORE M. N.** (1985). Cellular responses to pollutants. *Marine Pollution Bulletin*; 16, p. 9–134.
- **MOORE, M. N.** (2002). Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.* 59, p. 1–15.
- **MORA, P., FOURNIER, D., NARBONNE, J. F.** (1999). Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* LmK. and *Mytilus edulis* from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Muller. *Comp. Biochem Physiol C122*, p. 353–361.
- **MOUGRAUD, Y., MARTINEZ, E., GEFFARD, A., ANDRAL, B., STANISIERE, J. Y., AMIARD, J. C.** (2002). Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. *Biomarkers* 7, p. 479– 490.

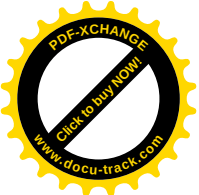


- **NARBONNE, J. F. DAUBEZE, M., CLERANDAU, C., GARRIGUES, P.** (1999). Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts, *Biomarkers*, 4 (6), p. 415–424.
- **NASCI, C., NESTO, N., R. A. MONTEDURO., L. DA ROS.** (2002) *Mar. Environ. Res.*, 54, 811–816.
- **NEDELEC., H.** (1982) : Ethologie alimentaire de *Paracentrotus lividus* dans la baie de Galeria (Corse) et son impact sur les peuplements de phytobenthoniques. *Thèse.Ph.d.Univ.Pierre et Marie Curie., Univ.Aix-Marseille II.*, pp175.
- **NEWMAN, M.C.** (1998). *Fundamentals of Ecotoxicology*. Ann Arbor Press, Chelsea, USA.
- **NICHOLSON, S.** (1999a). Cytological and physiological biomarkers in *Perna viridis* (Linnaeus) (Bivalvia: Mytilidae). PhD thesis. The University of Hong Kong.
- **NICHOLSON, S.** (1999b). Cardiac and lysosomal responses to periodic copper in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: *Mytilidae*). *Marine Pollution Bulletin* 38, p. 1157– 62.
- **NICHOLSON, S.** (2003a). The mytilide mussel *Perna viridis* (*Mytilidae*: Bivalvia) as a pollution monitor in Hong Kong. In: Shin PKS, editor. *Turning the tides*. Hong Kong: Marine Biological Association of Hong Kong, p. 201–28.
- **NICHOLSON, S. & LAM, P. K. S.** (2005). Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (*Mytilidae*: Bivalvia). ELSEVER. *Environment International* 31, p. 121-132.
- **NORTON, B. S., CORMIER, S. M., SMITH, M. & JONES, R. C.** (2000). Can biological assessments discriminate among types of stress? A case study from the eastern cornbelt plains ecoregion. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, p. 1113–1119.
- **NRC.** (1991) -Recommended dietary allowances, National Academy of Science/National Research Council, Washington
- **O'BRIEN, M.** (1990). "Are pesticides taking away the ability of our children to learn?" *Journal of Pesticide Reform*, Vol. 10, No. 4, winter 1990 - 1991, p. 4-8.
- **ODZAC, N., ZVONARIC, T., KLJAKOVIC, GASPIC, Z., HORVAT, M. & BARIC, A.** (2000). "Biomonitoring of mercury in the Kastela Bay using transplanted mussels." *The Science of the Total Environment* 261, p. 61-68.
- **OLSVIK, P.A., KRISTENSEN, T., WAAGBØ, R., ROSSELAND, B.O., TOLLEFSEN, K. E., BAEVERFJORD, G., BERNTSEN, M.H.G.** (2005). RNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative

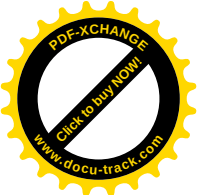


stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. ELSEVER. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 141, p. 314 – 323.

- **OMS.** (1991) organisation mondiale de la santé, world health organization, International Programme on chemical
- **OZMEN, M., SENER, S., METE, A., KUCUKBAY, H.** (1998). In vitro and in vivo acetylcholinesterase-inhibiting effect of new classes of organophosphorus compounds. Environmental Toxicology and Chemistry 18, p. 241–246.
- **PASCAL.** (1998) cité par **AARAB NADIA** dans *les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de doc.PhD université de Bordeaux I, 2004. paragraphe 2, page 28*
- **PASSOS, C. J. S.** (2006). Exposition humaine aux pesticides : un facteur de risque pour le suicide au Brésil, Vertigo – La revue en sciences de l'environnement, Vol7 n°1, p. 18.
- **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., 32 (2), p. 225–231.
- **PEAKALL, D.** (1992). Animal Biomarkers as Pollution Indicators. Chapman & Hall, London, UK.
- **PELLERIN-MASSICOTTE, J.** (1994). Potentiel d'utilisation de paramètres écologiques à l'intérieur d'une démarche d'évaluation écotoxicologique. Rapport interne présenté au MENVIQ, p.46.
- **PEREZ-LOPEZ.** (2000) cité par **AARAB NADIA** dans *les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de doc.PhD université de Bordeaux I, 2004. paragraphe 2, page 28*
- **PHARMACORAMA.** www.pharmacorama.com
- **PNUE/PAM** (2004). Programme des nations unies pour l'environnement. Plan d'action pour la méditerranée PAM, MED POL. Lignes directrices pour l'élaboration d'indicateurs d'état écologique et de réduction de stress. No. 154 de la série de rapport techniques de PAM.



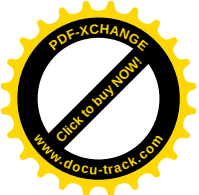
- **PRAPANTHADARA.** (1996) cité par **AARAB NADIA** dans *les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de doc.PhD université de Bordeaux I, 2004. paragraphe 2, page 28*
- **RAND, S.R. PETROCELLI.** (1985), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Edited by G.M. hemisphere New York. 164-176.
- **REGIS.M.B.** (1978). Croissance de deux échinoïdes du golfe de Marseille (*Paracentrotus lividus* Lamarck) et *Arbacia lixula*(L.). Aspect écologique de la microstructure du squelette et de l'évolution des indices physiologiques. *Thèse Doct.Etat,Fac.,Sci.Tec.St.Jérôme, Marseille.Fr.* : -221.
- **REGIS.M.B.** (1979). Analyse des fluctuations des indices physiologiques chez deux échinoïdes (*Paracentrotus lividus* Lamarck) et *Arbacia lixula*(L.),du golfe de Marseille *Tethys*,9 (2) :167-181.
- **REGIS, M.B.** (1986) Microstructure adaptative des radioles de *Paracentrotus lividus* (*Echinodermata, Echinoidea*) en milieu eutrophisé par des eaux usées. *Mar. Biol-Deutsch.* 90, 2 : 271-278.
- **RIDDET, J.M., PLATEL, R., ET MENIER, F.J** (1992). *Des protozoaires aux Echinodermes*, éditeur des préparations grandes écoles médecine. Edition Marketing, Paris : 216pp.
- **RINBIO** (2001). Réseau Intégrateurs Biologiques, novembre Evaluation de la qualité des eaux basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules en Méditerranée résultats de la campagne 2000. Ifremer, direction de l'environnement et de l'aménagement littoral.
- **RIVIERE, JL.** (1993) Effects of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the river Rhône. *The Science of the Total Environment*, **73**, 189-201.
- **RNO**, Edition (1994). Travaux du Réseau National d'Observation de la Qualité du Milieu Marin. Surveillance environnementale, IFREMER.
- **RNO**, Edition (2003). Travaux du Réseau National d'Observation de la Qualité du Milieu Marin. Surveillance environnementale, IFREMER.
- **RNO**, Edition (2006). Surveillance du milieu marin. Travaux du réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin. Ifremer



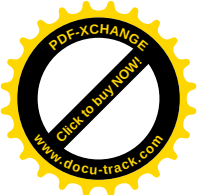
- **ROMEO, M., HOARAU, P., GARELLO, G., GNASSIA-BARELLI, M., GIRARD, J. P.** (2003). Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environ. Pollut.* 122, p. 369–378.
- **ROUIMI.** (1996) cité par **AARAB NADIA** dans *les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de doc.PhD université de Bordeaux I, 2004. paragraphe 2, page 28*
- **SAGLIO, P., TRIJASSE, S. & AZAM, D.** (1996). Behavioral effects of waterborne carbofuran in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 31, p. 232 -238.
- **SAISSY, J. M. & RUTTIMANN, M.** (1999). Intoxication par les organophosphorés.

Consensus d'actualisation SFAR-Département d'anesthésie-réanimation, HIA Bégin,
Medecine d'urgence.

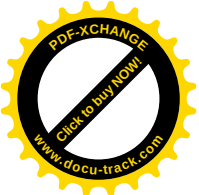
- **SAN MARTIN, G.A,** (1990) : Suivi d'une opération de transplantation de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Lmk) (Echinodermatea : echinidea) dans la région marseillaise. *Contrat N°87 3430066 IFREMER/GIS Posidonie*, Fr., 16p.
- **SCHNEIDER, J & TORUN-SKI, H,** (1983) -Biokarst on limonestone coasts, Morphogenesis and sediment production. *Mar. Ecol., Deutsch*, 4, 1: 45-63.
- **SECOMBES, et al.** (1989). Immunocompetence as a measure of the biological effects of sewage sludge pollution in fish. *Comp. Bioch. Phys.* 100C (1/2), p. 133-136.
- **SEMROUD, R & KADA, H.** (1987) : Contribution à l'étude de l'oursin *Paracentrotus lividus*(Lamarck) dans la région d'Alger (Algérie) : indice de réplétion et indice gonadique .In *Boudouresque Ch-F.ed., Colloque international sur Paracentrotus lividus, et les oursins comestibles, GIS Posidonie publ.*, Marseille,Fr. : 117-114.
- **SHEEHAN, D. & POWER, A.** (1999). Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology* 123C, p. 193–199
- **SHEEHAN, D, MEADE G, FOLEY VM & DOWD CA** (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* **360**: 1-16.
- **SIDELL, F. R. & BORAK, J.** (1992). Chemical warfare agent: nerves agents. *Ann Emerg Med*; 21: 865- 71. Bismuth C. Les oximes. In: Baud FJ, Barriot P, Riou B, éd. *Les antidotes*. Paris: Masson, p. 227-46.



- **SIKKA, et al.** (1989). Metabolism of benzo[a]pyrene and persistence of DNA adducts in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Bioch. Phys.* 100C (1/2), p. 25-28.
- **SMOLDERS, R., BERVOETS, L., DE BOECK, G., BURST, R.** (2002). Integrated condition indices a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 21, p. 87-93.
- **SOLE, C. PORTE, X. BIOSCA, C. MITCHELMORE, J. CHIPMAN, D. LIVINGSTONE, J., ALBAIGE S.** (1995). *Comp. Biochem. Physiol., Part C*, 1995, 113(2), 257-265.
- **SOUALILI, D.L.** (2008) : Les populations naturelles d'oursins : un outil évaluateur de l'état de santé de la d'Alger. *Thèse.Doct.Océan.Univ.U.S.T.H.B.* pp 147+annexes.
- **STENERSEN.** (1979) cité par **AARAB NADIA** dans *les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de doc.PhD université de Bordeaux I, 2004. paragraphe 2, page 28.*
- **STENERSEN.** (1987) cité par **AARAB NADIA** dans *les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de doc.PhD université de Bordeaux I, 2004. paragraphe 2, page 28.*
- **STIEN, X., PERCIC, P., GNASSIA-BARELLI, M., ROMÉO, M., LAFAURIE, M.** (1998). Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *ELSEVER. Environmental Pollution* 99, p. 339- 345.
- **TALEB, M. Z., MEGA, N., BOURAGBA-BENAZZA, M., BOUTIBA, Z. & SENOUCI, M.** (2006). Use of ESA satellite imagery and in situ data for water quality bio-monitoring in the Algerian western coastal zone. *ESA Tiger Workshop, Cape-Town (South Africa) 20-21 November 2006.*
- **TEMPLE, W. & SMITH, N. A.** (1996). Insecticides In: *Human toxicology*, J. Descotes (ED). Elsever. Chap. 20, p. 541-550.
- **TRAVIS, C.C.** (1993). Use of biomarkers in assessing health and environmental impacts of chemical pollutants. *NATO ASI Series. Series A: Life Sciences.* New York Plenum Press, p. 284.
- **TROTTER, D.M., KENT, R.A. & WONG, P.** (1991). -Aquatic fate and effect of carbofurane. *Critic. Rev. Environ. Contr.*, 21, p. 137-176.



- **TRUDEAU, S. & SANS CARTIER, G.** (2000). Cholinesterase Activity in Wildlife Exposed to Pesticides. National Wildlife Research Centre 2000 Canadian Wildlife Service Environmental Conservation Branch. Technical Report Series Number 338.
- **ULMER, L.** (1997). Werden die Alpen zur Seniorenresidenz? [Bevölkerungsveränderungen]. Diplomarbeit Geogr. Institut Univ. Zürich. VIII, 152 S. Fig., Tab., Karten. [u.a. Surselva GR], p. 2574.
- **VAN DER OOST, R., GOKSØYR, A., CELANDER, M., HEIDA, H. & VERMEULEN, N. P. E.** (1996). Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquat. Toxicol.* 36, p. 189-222.
- **VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. E.** (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, p. 57–149
- **VEAL EA, TOONE WM, JONES N & MORGAN BA** (2002). Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry* 277: 35523-35531.
- **VERLAQUE.M.** (1984). Biologie des juvéniles de l'oursin herbivore *Paracentrotus lividus* (Lmk): sélectivité du broutage et impact de l'espèce sur les communautés algales de substrat rocheux en Corse (Méditerranée, France). *Bot.mar.* 27(9) : 401-424.
- **VERLAQUE M,** (1987) -Contribution à l'étude du phytobenthos d'un écosystème photophile thermique marin en Méditerranée occidentale. Etude structurale et dynamique du phytobenthos et analyse des relations faune-flore. *Thèse Doct.Univ.Aix.Marseille II*, Marseille, France, 1-136.
- **VERLAQUE., M., NEDELEC., H.** (1983b) : Note préliminaire sur les relations biotiques de *Paracentrotus lividus* et l'herbier de Posidonies. *Rapp. P.V. Comm.Int. Mer. Médit.*, 28(3) :157- 158.
- **WALKER, M. & LIVINGSTONE, D. R.** (1992). *Persistent pollutants in marine ecosystems*, SETAC Spec. Publ. Ser., Pergamon Press, New York, p. 3–35.
- **WHITE, JR** The selectivity of a sequential extraction procedure for the determination of iron oxyhydroxides and iron sulfides in lake sediments. *Biogeochemistry* 14:193-208. (2004)
- **WHO** (1993), (World Health Organization) *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*, Int. Prog. Chem. Safety, WHO, Vammole, p.92.



- **WIDDOWS, J.** (1985). Physiological responses to pollution. *Mar. Poll. Bull.*, 16, p. 129-134.
- **WILHELM, F. D., TRIBESS, T., GASPARI, C., CLAUDIO, F. D., TORRE, M. A., MAGALHAES, A. R. M.** (2001). Seasonal changes in antioxidant defences of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture* 203, p. 149–158.
- **WIRTH, D., CHRISTIANS, E.S., DRION, P.V., DESSY-DOIZE, C., GUSTIN, P.** (2003). Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps). Hsp70: biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Ann. Méd. Vét.*, 147, p. 127-144.
- **ZHAO TJ, SINGHAL SS, PIPER JT.** (1999). The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 367: 216-224