

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE D'ORAN ES-SENIA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE RESEAU DE SURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE



MEMOIRE PRESENTE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MAGISTER

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

Présenté par :
M^{elle} BENALI IMENE

Thème

Utilisation de l'activité de l'acétylcholinestérase chez *Mytilus galloprovincialis* (Lmk, 1819), transplantée en baie d'Oran : biomarqueurs d'exposition à la contamination marine côtière

Soutenu le : / / 2007 devant la commission du jury composée de :

PRESIDENT:	D. SAIDI	PROFESSEUR, UNIVERSITE D'ORAN ES- SENIA
EXAMINATEUR :	A. AOUES	PROFESSEUR, UNIVERSITE D'ORAN ES- SENIA
EXAMINATEUR :	S.M.E.A ABI AYAD	MAITRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE D'ORAN ES- SENIA
PROMOTEUR :	Z. BOUTIBA	PROFESSEUR, UNIVERSITE D'ORAN ES- SENIA
CO-PROMOTEUR :	M. Z. TALEB	CHARGE DE COURS, UNIVERSITE D'ORAN ES- SENIA

Remerciements

Au terme de ce travail j'ai l'immense honneur de remercier en premier lieu mon Encadreur le Professeur **Z. BOUTIBA**, de l'université d'Oran Es-Senia, et directeur du laboratoire « Réseau de Surveillance Environnementale » pour son enseignement de valeur. Je lui suis particulièrement reconnaissante d'avoir guidé mes premiers pas d'initiation à la recherche dans le domaine de l'environnement et de la pollution marine. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et mes sincères remerciements pour ces perpétuels encouragements ces conseils ainsi qu'à sa disponibilité quand au suivie et l'avancement de mon travail, je le remercie particulièrement pour la confiance qu'il m'a accordée.

J'adresse à Mr. **Z. TALEB**, chargé de cours à l'université d'Oran Es-Senia, mes profonds remerciements pour m'avoir dirigé, suivie, orienté et enrichie. Merci de m'avoir guidé tout au long pour la réalisation de ce modeste travail. Vos exigences ont largement contribué à l'amélioration de mes connaissances et de mon travail.

Je tiens aussi à remercier **D. SAIDI**, professeur à l'université d'Oran Es-senia, d'avoir accepté de présider ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Que Mr. **S. M. E. A. ABI AYAD** Maître de conférence à l'université d'Oran Es-senia, soit vivement remerciés de l'intérêt qu'ils témoignent à ce travail en acceptant de l'examiner en siégeant dans ce jury.

Je suis honoré de compter parmi les membres du jury Mr. **R. SENHADJI**, Maître de conférences à l'université d'Oran Es-Senia. Je vous exprime ma gratitude et mes respects.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers l'ensemble de mes enseignants pour leurs enseignements et leurs encadrements en graduation et post graduation.

Je ne pourrais oublier tout ceux qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à l'aboutissement de ce modeste travail. Je remercie particulièrement **GUERRAS HAMIDA ET ALLAL AMINA** pour les bons moments passés en leur compagnie que ce soit pendant le travail ou pendant les moments de détente. Merci a mes camarades de promos **SOULAH CHERIFA, BENKABOUCHE IKRAM, ADA HANIFI MALIKA, LARBI DOUKARA KAMEL**, merci à **BELKHEDIM LILA** et **SLIMANI ZOHOR** pour leur aide indispensable et leur soutien. Je remercie **BENGHALI SOFIANE M. E. A.** qui m'a fourni l'aide scientifique et morale, sans oublier tous mes collègues du

Remerciements

laboratoire « Réseau de surveillance environnemental ». Merci à tous pour avoir égayé ces deux années.

Je remercie tout particulièrement ma famille qui m'a aidé dans ce travail par leur soutien et leur confiance. Merci à mes tendres parents sans qui je ne serais arrivé jusqu'ici. Merci à mes frère et sœurs pour leur soutien, leur confiance et leur présence.

Je dédie ce modeste travail en premier lieu à mes parents,

Mes frères et sœurs,

Tous mes amis (es).

Liste des abréviations

- ♦ **ACh** : Acétylcholine.
- ♦ **AChE** : Acétylcholinestérase.
- ♦ **ACo-A** : Acétyl Coenzyme A.
- ♦ **AEE** : Agence Européenne de l'Environnement.
- ♦ **AthChI** : Acétylcholinestérase Iodide.
- ♦ **DBO** : Demande Biochimique en Oxygène.
- ♦ **DDT** : Dichlorodiphényltrichloroéthane.
- ♦ **DCO** : Demande Chimique en Oxygène.
- ♦ **DTNB** : 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate.
- ♦ **HAP**: Hydrocarbures Polyaromatiques.
- ♦ **IOP** : Insecticides Organophosphorés.
- ♦ **MES** : Matières En Suspensions.
- ♦ **NOAA** : National Oceanographic and Atmospheric Administration.
- ♦ **OP** : Organophosphorés.
- ♦ **OPN** : Organophosphorés Neurotoxiques.
- ♦ **PAM** : Plan d'Action pour la Méditerranée.
- ♦ **PCB** : Polychlorobiphényles.
- ♦ **PNUE** : Programme des Nations Unies pour l'Environnement.
- ♦ **POC** : Pêches et Océans Canada.
- ♦ **RINBIO** : Réseau Intégrateur Biologique.
- ♦ **RNO** : Réseau National d'Observation.
- ♦ **SNC** : Système Nerveux Central.
- ♦ **WHO**: World Health Organization.

Liste des figures

- Fig. 1 : Les deux phases de la biotransformation.
- Fig. 2: Dessin du type de mouillage, poches compartimentées en trois.
- Fig. 3: Formule chimique de l'Acétylcholine.
- Fig. 4: Transmission de l'influx nerveux.
- Fig. 5: Schéma général d'un neurone.
- Fig. 6: Recyclage de l'acétylcholine.
- Fig. 7 : Transmission synaptique cholinergique
- Fig. 8 : Formule des organophosphorés.
- Fig. 9: Principaux sites d'action des insecticides au niveau des synapses du système nerveux.
- Fig. 10: Formule des carbamates.
- Fig. 11 : Principaux pays producteurs de *Mytilus galloprovincialis*.
- Fig. 12 : *Mytilus* sp. fixé à son support.
- Fig. 13 : Face interne et externe d'une valve de moule.
- Fig. 14 : *Mytilus galloprovincialis* parasité par toutes sortes d'organismes.
- Fig. 15 : Structure interne de la moule.
- Fig. 16 : Schéma de l'activité de filtration de *Mytilus* sp.
- Fig. 17 : Différentes étapes de la nutrition des bivalves.
- Fig. 18: Sites d'échantillonnage.
- Fig. 19 : Fiche d'échantillonnage.
- Fig. 20 : Vue panoramique du site de Kristel.
- Fig. 21 : Port d'Oran.
- Fig. 22 : Emissaires des eaux usées des Genêts (Ouest d'Oran).
- Fig. 23 : Emissaires des eaux usées du Fort Lamoune (Oran Est).
- Fig. 24 : Port de Mostaganem.
- Fig. 25 : Moules en phase de stabulation.
- Fig. 26 : Filet expérimental pour l'opération de mouillage.
- Fig. 27 : Moules (*Mytilus galloprovincialis*) indigènes du port d'Oran.
- Fig. 28 : Variations des indices de conditions des moules *Mytilus galloprovincialis* au niveau des différents sites d'échantillonnages.
- Fig. 29 : Activité de l'AChE (nmoles/min/mg prot) des moules de Kristel et des ports d'Oran et de Mostaganem.

Liste des tableaux

Tableau 1: Classes des micropolluants.

Tableau 2: Différences observées entre la biosurveillance active et passive

Tableau 3 : Différents biomarqueurs utilisés pour le diagnostic écotoxicologique.

Tableau 4 : Réponses des différents biomarqueurs selon la classe des polluants.

Tableau 5: Liste des biomarqueurs.

Tableau 6: Quelques insecticides organophosphorés utilisés en agriculture.

Tableau 7: Comparaison entre les deux espèces voisines, moule méditerranéenne et la moule d'Atlantique.

Tableau 8: Caractéristiques physico-chimiques des sites d'échantillonnage.

Résumé

A travers le dosage de l'activité de l'Acétylcholinestérase considérée comme biomarqueurs de pollution spécifique aux composés organophosphorés, carbamates, et aux métaux lourds, nous avons essayé d'établir la présence d'un déséquilibre physiologique au niveau d'une espèce sentinelle la moule *Mytilus galloprovincialis*, afin d'évaluer le degré de l'impact d'une éventuelle pollution des eaux côtières occidentales algériennes en suivant une nouvelle approche expérimentale « biosurveillance active » adoptée ces dernières années par de nombreux organismes de recherche pour la biosurveillance environnementale.

A cet effet, une transplantation de population de moules, prélevée d'un site référence Kristel a été réalisée, au niveau de deux sites portuaires d'Oran et de Mostaganem. Nos résultats ont révélé une inhibition significative de l'AChE retrouvée chez *M. galloprovincialis* après la période de transplantation dans les deux sites ciblés, soumis aux rejets anthropiques et aux trafics maritimes, ainsi qu'une éventuelle présence de pesticides en provenance des terres agricoles à proximité du site d'étude : le port de Mostaganem. Une différence significative de l'activité de l'AChE est également relevée chez les moules indigènes du port d'Oran, par rapport au site de référence.

Les résultats témoignent de la capacité des biomarqueurs tels que l'AChE à être utilisé pour interpréter l'état physiologique de l'organisme en raison de la présence de contaminants dans le biota et à son utilisation comme signal précoce de l'exposition aux effets nuisibles le long d'un gradient de pollution. Ceci atteste la dégradation ascendante que subit l'écosystème marin et la nécessité de la prévenir par le biais de biomarqueurs nous renseignant sur les conditions d'existence des peuplements le long de la côte occidentale algérienne.

Mots clés: biosurveillance active, bioindicateurs, biomarqueurs, acétylcholinestérase, *Mytilus galloprovincialis*, transplantation, port d'Oran, port de Mostaganem, Kristel.

Abstract

Through the analysis of Acetylcholinesterase (AChE) activity considered as a specific biomarker to the organophosphorous compounds, carbamates, heavy metals and hydrocarbons pollutions, we tried to evaluate the degree of a possible pollution impact in the west Algerian coasts by using the mussels *Mytilus galloprovincialis* following a new experimental approach “active biomonitoring” adopted these last years by many research organisms for the environmental biological assessment. For this purpose, we proceeded to a translocation of a mussel’s population taken from the Kristel reference site in Oran and Mostaganem polluted harbours.

The results showed a significant inhibition of AChE in *M. galloprovincialis* before the period of transplantation in the two target sites, subjected to urban and industrial sewages discharge and maritime traffic also a possible pesticides presence from agricultural lands close to the Mostaganem harbour. A significant difference of the AChE activity was observed on the native mussels of Oran harbour, in comparison with those of the reference site. The results showed the ability of the biomarkers such as AChE to be employed to interpret the physiological status and as tools to predict an early signal of the contaminants exposition in a polluted area.

This data suggested the marine ecosystem deterioration which needs to prevent by using an environment active biomonitoring as tool of information of Algerian west coast marines populations.

Keywords: active biomonitoring, bioindicators, biomarkers, acetylcholinesterase, *Mytilus galloprovincialis*, transplantation, harbour of Oran, harbour of Mostaganem, Kristel.

ملخص

من خلال قياس نشاط أنزيم الاستيلكلينستيراز Acétylcholinestérase التي تعتبر كمشير بيولوجي للتلوث الخاص للمركبات الارقنوفسفورية و الكربمات و كذلك المعادن الثقيلة و المواد الهيدروجينية, حاولنا إثبات عدم وجود توازن فيزيولوجي على مستوى نوع من طحالب بلح البحر *Mytilus galloprovincialis* من اجل تقييم درجة محتملة من التلوث في مياه السواحل الجزائرية (ميناء وهران و ميناء مستغانم) و ذلك بإتباع الطرق الاختبارية الجديدة (المراقبة البيولوجية النشيطة) التي اعتمدت إليها عديد من البرامج الدولية هذه السنوات الأخيرة من اجل الحراسة المحيطية و المراقبة البيولوجية للبيئة البحرية. في هذا الغرض نقلنا مجموعة من طحالب بلح البحر مصدرها من كريشتل (موقع صالح من منبع التلوث) إلى موقع ميناء وهران و مستغانم. إن النتائج بينت لنا هبوط معتبر من نشاط الاستيلكلينستيراز في *Mytilus galloprovincialis* بعد مرحلة التنقل إلى المواقع المذكورة أعلاه و الخاضعة للفضلات الإنسانية و الباخرات و السفن و حتى إلى المبيدات المستعملة للأراضي المجاورة لميناء مستغانم. هناك كذلك فرق معتبر من كمية الاستيلكلينستيراز وجدناها عند طحالب بلح البحر الأصليين لميناء وهران بالنسبة لكريشتل.

النتائج تبين قدرة المشير البيولوجي للتلوث كالأستيلكلينستيراز في تفسير الحالة الفيزيولوجية لجسم الحيوان في حالة وجود تلوث في سكونه و القدرة كاستعمال هذا المشير كإنداز على التلوث في محيط بحري. المحيط البحري يخضع إلى انحطاط متصاعد و بالتالي التنبيه عن طريق المشير البيولوجي للتلوث مهم ليلغنا و يبين لنا حالة السواحل الغربية الجزائرية.

الكلمات الهامة: المراقبة البيولوجية النشيطة, مشير البيولوجي للتلوث, Acétylcholinestérase, *Mytilus galloprovincialis*, التنقل, ميناء وهران, ميناء مستغانم.

- Sommaire -

INTRODUCTION.....	01
-------------------	----

PARTIE I : STRESS ENVIRONNEMENTAL ET OUTIL DE LA BIOSURVEILLANCE

I. Les polluants et impact sur l'écosystème.....	04
II. Biosurveillance de la pollution marine.....	08
1. Les réseaux de surveillance environnementale et stratégie de recherche.....	10
2. Technique et procédure de transplantation.....	12
3. Les indicateurs biologiques de pollution.....	16
4. Les marqueurs biologiques de pollution.....	18
III. Acétylcholinestérase : Biomarqueur spécifique d'exposition aux pesticides.....	26
1. Notion générale sur la transmission cholinergique.....	26
a. L'acétylcholine et l'acétylcholinestérase.....	26
2. L'acétylcholinestérase comme biomarqueur de pollution...	31
3. Action neurotoxique des pesticides anticholinestérasiques..	33
a. Les organophosphorés.....	34
b. Les carbamates.....	37

PARTIE II : *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* ESPECE SENTINELLE BIOINDICATRICE DE POLLUTION

I. Biologie de l'espèce <i>Mytilus galloprovincialis</i>	39
1. Systématique.....	39
2. Anatomie de l'espèce.....	41
3. La reproduction.....	44
II. Trajet de l'eau et rôle de la filtration.....	45

1. L'activité ventilation.....	48
III. Utilisation de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> comme bioindicateur	49

PARTIE III : MATERIELS ET METHODE

I. Couverture spatiale.....	52
1. Le site de Kristel (site de référence).....	54
2. Le port d'Oran.....	55
3. Le port de Mostaganem.....	57
II. Couverture temporelle	58
III. Stratégie d'échantillonnage.....	58
1. Choix du matériel biologique.....	58
2. Collecte des échantillons références.....	58
3. Mise en stabulation des moules.....	59
4. Opérations de mouillage (transplantation) des filets à moules.	59
a. Filets expérimentaux.....	60
b. Lieu et période d'immersion.....	60
c. Récupération des filets.....	61
IV. Traitement des échantillons et détermination de l'indice de condition.....	62
V. Méthodologie analytique.....	63
1. Préparation de la fraction S9.....	63
2. Dosage des protéines.....	63
3. Mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase.....	64
VI. Traitements statistiques.....	65

PARTIE IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Paramètres physico-chimiques.....	66
II. Statut physiologique.....	66

III. Activité de l'Acétylcholinestérase.....	68
---	-----------

CONCLUSION GENERALE.....	72
---------------------------------	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	75
---	-----------

Introduction

La superposition des deux grands antagonistes qui sont le gradient de continentalité et le gradient d'océanité, confère au littoral sa grande originalité et son importance écologique, où on lui reconnaît une forte pression d'usage. En effet, les écosystèmes littoraux sont des espaces d'intérêt majeur écologique et socio-économique. D'ailleurs, les zones intertidales et les organismes qui y résident sont tout spécialement concernés et exposés aux apports de contaminants, tant latéraux qu'en provenance des embouchures des cours d'eau.

Les polluants émis du fait de l'activités humaine (métaux, PCB, HAP, pharmaceutiques, perturbateurs endocriniens, pesticides) sont dispersés dans les différents compartiments de l'environnement, air, sols, eaux, et sont susceptibles d'atteindre aussi gravement les organismes terrestres qu'aquatiques. Cependant, tout finit par aboutir dans les eaux côtières : des pots d'échappements et cheminées rejetant les gaz acides retombant en suite sous forme de pluie acides, aux engrais contenant les nitrates et phosphates contribuant à l'eutrophisation des eaux, aux pesticides acheminés par les eaux de ruissellements, les rejets urbains qui représentent la source la plus importante de pollution, en rajoutant tous les solvants, acides et métaux lourds induisant chaque jour un déséquilibre majeur des écosystèmes marins. Les effets d'une telle perturbation peuvent se produire à différents niveaux d'organisation biologique, depuis celui des individus et des populations, jusqu'à celui de l'écosystème dans son ensemble, en passant par les assemblages d'espèces et les communautés.

La pollution marine a été traditionnellement documentée en terme de concentration chimique des contaminants ; cependant, ces mesures n'ont fourni que les évaluations des effets délétères sur les organismes vivants et sont maintenant complétées avec des critères biologiques, et particulièrement avec la mesure de biomarqueurs. Dans ce sens, plusieurs études ont accentué l'importance, ces dernières années, de l'approche intégrée de biomarqueurs dans l'évaluation de la qualité de l'environnement, pour une meilleure compréhension des voies et des mécanismes par lesquels les produits chimiques exercent leur toxicité dans les organismes marins (NASCI et *al.*, 2002). Un biomarqueur toxicologique est défini comme 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 ont une sensibilité élevée et une spécificité aux niveaux moléculaires et cytologiques ; ces réponses peuvent servir de détection précoce du stress antérieur avant l'affaiblissement physiologique ou l'impact environnemental. Ces biomarqueurs d'ordre supérieur, fournissent une évaluation combinée des perturbations induites par ces toxiques à des niveaux plus bas de complexité fonctionnelle et sont potentiellement les marqueurs les

plus efficaces pour l'évaluation de la pollution, comme ils peuvent servir de précurseurs des effets chez les populations et communautés.

En conséquence, des suites de biomarqueurs à différentes complexités fonctionnelles (moléculaires, cytologiques et physiologiques) couplées aux mesures d'importance écologique élevée (bioindicateurs) sont recommandés dans des programmes de contrôle pour fournir une détection précoce des impacts de pollution et la pertinence environnementale (NICHOLSON & LAM, 2004). Ils sont utilisés dans des études écotoxicologiques pour évaluer les effets négatifs des contaminants chez les organismes aquatiques, les bivalves en particulier (VIARENGO & CANESI, 1991). Par ailleurs, Ces dernières années, il y'a eu un développement rapides des biomarqueurs enzymatiques. C'est dû non seulement aux avancements en biochimie mais également aux améliorations des instruments analytiques. Parmi la batterie de biomarqueurs existants, l'activité de l'acétylcholinestérase AChE possède un grand intérêt dans l'évaluation des effets de l'exposition aux composés neurotoxique chez les organismes aquatiques (CAJARAVILLE et *al.*, 2000). Cette enzyme joue un rôle important dans le fonctionnement du système neuro-musculaire empêchant la continuité de la contraction musculaire en dégradant le transtransmetteur l'Acétylcholine dans les synapses cholinergiques et les jonctions neuromusculaires. Les composés anticholinestérasique peuvent causer un dysfonctionnement sérieux chez les organismes aquatiques, et des changements comportementaux dont la paralysie et la mort.

Beaucoup d'organismes marins sont d'une importance immédiate pour l'homme, en tant qu'espèces comestibles et commerciales, et par conséquent, la surveillance de la concentration en polluants au niveau de la chaîne alimentaire peut prévenir des dangers pour la santé humaine. D'ailleurs, la réponse des organismes vivants soumis à l'agression toxique constitue le point central des stratégies de dépistage. A notre connaissance, les organismes médiolittoraux tels que la moule, la patelle, l'oursins, ...) subissent un stress physiologique considérable et les conséquences potentielles en terme de bioaccumulation, biotransformation et effets toxiques des polluants, ont été largement étudiés et font l'objet de préoccupation de nombreux organismes de recherche et de biosurveillance environnementale. Parmi les espèces sensibles à la contamination de leur biotope: les moules *Mytilus sp.* Celles-ci restent d'excellentes espèces sentinelles pour la détection d'éventuelles perturbations biologiques subléthales et sont d'ailleurs, intensivement utilisées dans les programmes de surveillance environnementale. Les polluants représentent un ennemi mortel, non pas des moules mais des consommateurs, car ces Mollusques supportent à merveille les conditions les plus hostiles de l'environnement.

Le développement des biomarqueurs pour la détection de polluants et l'évaluation des effets des toxiques peuvent servir à extrapoler l'effet des agressions chimiques sur la santé humaine.

Les stratégies de biosurveillance sont diverses. Notre objectif dans cette présente étude est celui d'analyser les interactions croisées entre l'exposition aux contaminants chimiques et l'effet physiologique que cela peut engendrer sur *Mytilus galloprovincialis*, et d'évaluer ces interactions en terme d'expression d'un biomarqueur d'exposition (l'Acétylcholinestérase) afin de concevoir un gradient ecotoxicologique et mesurer les niveaux d'impact de la pollution des eaux côtières algériennes.

Dans cette optique, et en vue de répondre à cet objectif, nous avons utilisé une approche expérimentale relativement nouvelle qui est celle de la transplantation (biosurveillance active) de moules en provenance d'un site peu contaminé et de les transplanter dans un site exposé aux sources de pollution et impacté. Cette approche a l'avantage d'assurer des échantillons biologiquement comparables et donc de réduire leurs variabilités naturelles.

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 terme 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 sur l'espèce ciblée pour ce travail, et son utilisation comme bioindicateur dans les programmes de recherche.
- Dans la troisième partie, le choix du site, les étapes de l'opération de transplantation et le protocole analytique y sont décrits.
- Dans la quatrième partie, nous affichons les résultats et nous les discutons par rapports aux différents sites ciblés et à travers les études effectuées antérieurement.

Partie I :
Stress environnemental et outils
de la biosurveillance

I. Les polluants et impact sur l'écosystème :

Le milieu marin est contaminé par de nombreux produits chimiques dont des éléments métalliques rejetés par les industries, 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 forme chimique (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 (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 susceptible 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

* Biotransformation : La biotransformation ou métabolisation des contaminants a pour objectif l'élimination des xénobiotiques de la cellule, on parle d'activités de détoxification (CABANE, 2007).

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 (PAH) Benzo (a) anthracène/ B(a)A et Benzo (a) pyrène/ B(a)P 2. Parafines chlorées: CH₃Cl, ChCl₃, 3. Aromatiques halogénés Polychlorobiphényles (PCB) Polychloroterphényles (PCT) Polychloronaphtalènes (PCN) 4. Aromatiques halogénés avec oxygène 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 (AH-PENG, 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, MES, 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 3 phases :

- Phase I : phase d'exposition ;
- Phase II : phase toxicocinétique qui correspond à l'absorption et la redistribution du contaminants ;

- 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 (hydroxyl, carboxyl, sulfhydryl,...) à la molécule exogène



Temps II : Conjugaison molécule 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 (complexe de 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).

II. 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 biosurveillance¹ utilisant la moule comme bioindicateur repose sur l'hypothèse que le contenu en contaminant de cet animal reflète la concentration en contaminants biodisponibles dans l'eau sous formes particulaire et / ou dissoute, selon un processus de bioaccumulation. L'intérêt des "organismes sentinelles" ou "indicateurs" pour la surveillance des contaminants dans le milieu marin est reconnu au niveau international (ANDRAL & ALZIEU, 2004). Le recours à l'utilisation de la moule repose sur la capacité de ce bivalve à concentrer dans ses tissus les contaminants chimiques dans un facteur proportionnel à leur biodisponibilité. Les techniques dites des bioindicateurs quantitatifs et qualitatifs utilisent cette propriété pour suivre la contamination chimique du milieu, tout en atténuant ses fluctuations à court terme.

La présentation d'indicateurs, la justification scientifique de leur utilisation, ainsi que la liaison entre les différents niveaux sont présentées 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;

¹ Biosurveillance : utilisation des réponses biologiques d'organismes sélectionnés pour la surveillance de l'environnement (PNUE/PAM, 2004).

- ◆ 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.

1. Les réseaux de surveillance environnementale et stratégie de recherche:

L'objectif d'un programme de surveillance biologique est d'évaluer l'état de santé de l'écosystème marin et de prédire les effets à long terme des polluants. Dans cette optique, les stratégies développées sont de deux types. Certaines utilisent les populations indigènes de moules sauvages ou cultivées (biosurveillance « passive », cas du Réseau National d'Observation en France (RNO), du réseau de surveillance en Italie, ou du « Mussel Watch » aux Etats Unis. D'autres organismes ont recours aux transplants d'individus provenant d'un site de référence (biosurveillance « active ») (RNO, 2006).

◆ *Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO)*

Le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO) de l'Ifremer a été mis en place en France en juin 1974 par le Ministère chargé de l'environnement avec pour premier objectif l'évaluation des niveaux et des tendances de contamination et des paramètres généraux de la qualité du milieu. C'est un réseau de type « passif » dont les premiers prélèvements ont débuté en juin 1974 et ont essentiellement porté jusqu'en 1978 sur les eaux marines. Par la suite, se sont développés les programmes de surveillance des contaminants dans la matière vivante, compartiment mieux adapté pour répondre aux objectifs du RNO qui sont ceux d'évaluer les niveaux et les tendances de la contamination chimique du littoral, ainsi que des paramètres généraux de la qualité du milieu en intégrant également les mesures d'effets biologiques des contaminants. Les organismes marins, moules et huîtres, sont alors utilisés comme indicateurs quantitatifs de la contamination.

Ainsi, la surveillance de la contamination côtière a été effectuée dès 1979, le long des côtes françaises, en utilisant la moule comme espèce indicatrice. Cette approche, dite de moule témoin (sentinelle) ou « Mussel Watch », a été utilisée pour surveiller la contamination par les métaux (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn), les organochlorés (DDT, DDD, DDE, lindane, etc.) et les hydrocarbures polycycliques aromatiques. C'est en particulier 100 points de prélèvement de Mollusques visités quatre fois par an depuis 1979. (BUAT-MENARD et *al.*, 1980; THIBAUD & BOUTIER, 1988; CLAISSE, 1989; CLAISSE et *al.*, 1992; AMIARD-TRIQUET et *al.*, 1999; CLAISSE et *al.*, 2001).

♦ *Réseau Intégrateurs Biologiques (RINBIO)*

Le Réseau Intégrateurs Biologiques (RINBIO), réseau de type actif, a été développé en partenariat entre l'Ifremer, l'Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse (RMC) et l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) depuis 1996. La technique spécifique de mesure de la contamination chimique au moyen de moules en stations artificielles a été développée dans le cadre du réseau RINBIO. Ce réseau se base sur les capacités bioaccumulatrices de la moule mais utilise la technique des transplants (bioindicateurs actifs) qui combine le contrôle expérimental réalisé en laboratoire avec le réalisme des expériences pratiquées sur le terrain (BEHRENS & DUEDALL, 1981; PHELPS, 1983; REGOLI & ORLANDO, 1994; HAYNES *et al.*, 1995; HAYNES & TOOHEY, 1998). Cette technique procure de nombreux avantages.

Les mesures sont optimisées par l'utilisation d'échantillons homogènes au regard de la population d'origine, de la taille, de l'âge et de leur environnement. Elle permet ainsi 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 (KOCK DE, 1983; KOCK DE & VAN HET GROENEWOUD, 1985; BUESTEL, 1997; ANDRAL & STANISIERE, 1999; ODZAC *et al.*, 2000; ANDRAL *et al.*, 2001; ANDRAL *et al.*, 2004). Le phénomène de bioaccumulation fonctionnant à l'échelle de quelques mois permet de s'affranchir des fluctuations rapides des masses d'eaux et facilite l'analyse des teneurs plus élevées rencontrées dans les organismes (ANDRAL, 2004). Les procédures et la méthodologie de traitement des données du réseau RINBIO permettent de discriminer les facteurs physiologiques, notamment la croissance liée aux caractéristiques trophiques du milieu et les facteurs environnementaux qui interagissent sur le signal brut de contamination mesurée dans la moule. A l'échelle du réseau, les données sont ajustées à un individu standard et peuvent être comparées indépendamment de l'hétérogénéité physico-chimique et trophique des sites de stabulation (CASAS, 2005).

Cette dernière technique est utilisée avec succès par les laboratoires de l'Ifremer en Méditerranée, depuis 1996, dans le cadre du Réseau Intégrateurs Biologiques (RINBIO). La transplantation d'organismes (« cages à moules »), issus d'un même site, permet en effet de sélectionner les stations indépendamment de la présence de populations naturelles, de leur distance à la côte et de leur profondeur. Elle permet également de réduire l'influence de nombreux facteurs externes et internes, susceptibles d'induire des fluctuations dans les mesures : variations entre espèces, variations saisonnières, variations pour une même classe d'âge ou de taille en raison de différences génétiques (MONIQUA, 2005).

2. Technique et procédure de transplantation :

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, tout les programmes de surveillance utilisant des transplants à une large échelle spatiale se trouve confronté au suivi de secteurs hétérogènes du point 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.

Par contre, les inconvénients peuvent être la lourde logistique inhérente à la mise en place de mouillages en mer et leur tenue face aux aléas climatiques et humains. Aussi, les expériences de transplantation demandent beaucoup de travail de terrain ; si l'on tient compte du coût de la main d'œuvre, le déploiement de transplants occasionnent beaucoup de dépenses (NAKHLE, 2003).

Dans le cadre des travaux réalisés pour RINBIO, trois solutions techniques complémentaires ont été retenues pour fixer un échantillon composé de 10 kg de moules stockées dans une poche ostréicole comportant trois compartiments (Fig. 2) (COSSA *et al.*, 1998 ; ANDRAL & STANISIERE, 1999 ; ANDRAL *et al.*, 2001 ; ANDRAL *et al.*, 2004) :

- ◆ Un mouillage de surface constitué d'une bouée crayon Mobilis maintenue sur le fond par une chaîne de 40 mètres (diamètre 12 mm) reliée à une ancre plate de 35 kg ;
- ◆ un mouillage de sub-surface constitué de la poche conchylicole elle-même reliée à un lest de 45kg ;
- ◆ un mouillage de type « phares et balises » pour garantir un meilleur pourcentage de récupération, certains échantillons ont été fixés sur des points d'immersions existants (bouées des phares et balises, récifs artificiels, filières), en tenant compte des possibles interactions de ces structures sur les analyses chimiques.

Les relargages éventuels de contaminants par l'ensemble de ces dispositifs ont été considérés comme négligeables compte tenu de la position des poches dans la colonne d'eau.

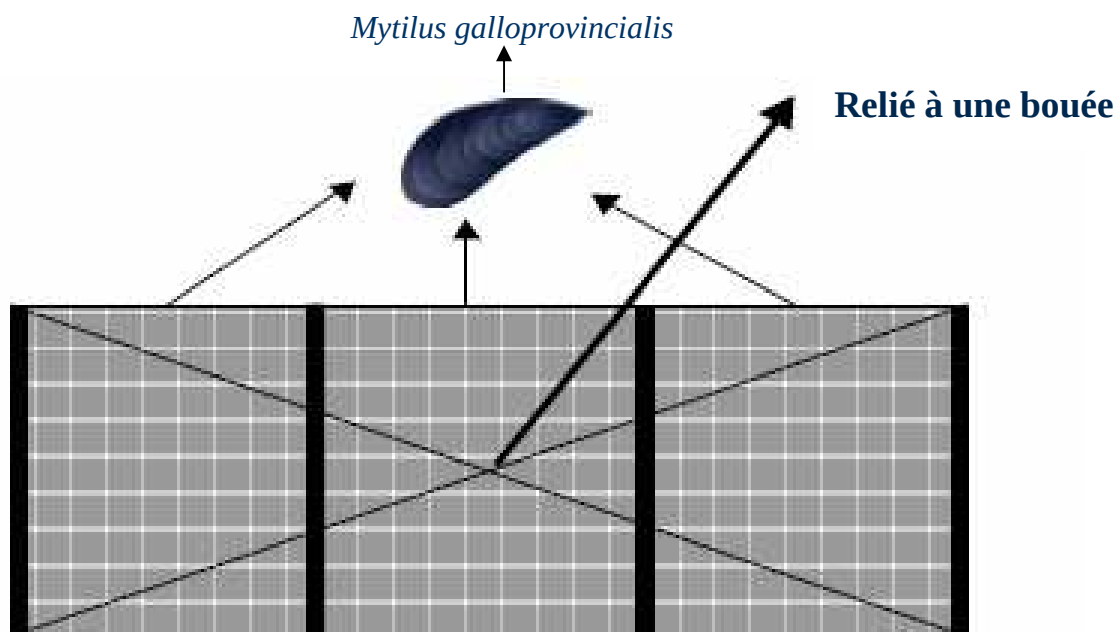


Fig. 2: Dessin du type de mouillage, poches compartimentées en trois (CASAS, 2005).

Le centre principal de biosurveillance actif utilisant les moules, se trouve dans des régions tempérées du globe en utilisant des espèces de *Mytilus* (NICHOLSON & LAM, 2005). La technique des transplants de moules s'est ainsi révélée particulièrement adaptée au suivi des niveaux de contamination chimique en Méditerranée. Les développements réalisés permettent d'en optimiser les coûts d'une manière significative, avec des taux de récupération élevés et des méthodes de traitement garantissant la validité des résultats. Ce qui ouvre la porte à de nombreuses possibilités : suivi de rejets (industriels, station d'épuration, dragage) ou de panaches de rivière, études d'impact, détection locale de contamination, surveillance globale de la qualité du milieu,... (Ifremer, 2003).

La méthode des transplants permet donc d'évaluer l'évolution de la qualité du milieu. Toutefois, sa mise en œuvre à une large échelle spatiale nécessite la prise en considération des caractéristiques trophiques des sites d'implantation. Selon ANDRAL & ALZIEU (2004) si l'âge et le stade de maturation des échantillons peuvent être parfaitement contrôlés, par contre la variabilité physico-chimique et trophique des sites de stabulation devraient être appréhendée.

Tableau 2: Différences observées entre la biosurveillance active et passive

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.

3. 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 ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées (BLAUDIN, 1986).

La surveillance biologique de la qualité des ressources vivantes commerciales côtières, vis-à-vis des diverses pollutions employant les bioindicateurs vise finalement la surveillance de la santé publique chez l'homme, qui est le consommateur final dans la chaîne alimentaire.

Les organismes (marins) concentrent beaucoup les polluants : ils sont donc utiles pour prévoir et pour détecter la distribution spatiale et temporelle de ces polluants. Ils sont ainsi choisis dans les programmes de surveillance d'après leur importance envers l'homme, la commodité de l'échantillonnage, l'« importance » écologique et la diversité biochimique, physiologique et comportementale. En résumé, les propriétés d'un bioindicateur (ou espèce sentinelle), doivent être les suivantes (CABANE, 2007) :

- Elle doit être représentative du milieu où elle vit; mais en même temps, on doit pouvoir comparer plusieurs endroits de la côte avec la même espèce indicatrice.
- Elle doit montrer des variations quantitatives et qualitatives représentatives des changements du milieu où elle vit.
- Elle doit être représentative des espèces commercialisées pour le consommateur final : elle doit donc être une espèce commerciale. Voici quelques Indicateurs biologiques les plus connus, et employés chez les Vertébrés, et/ou Invertébrés :

Chez les Vertébrés, ce sont essentiellement les Poissons (le plus souvent, Poissons benthiques, plus ou moins sédentaire, vivant sur le fond de la mer : Poisson plat, du type « limande » ou « flet », représentatif des pollutions entraînées au fond de la mer par les matières en suspension qui sédimentent, et le plancton mort qui coule (CABANE, 2007).

Chez les Invertébrés, on choisira de préférence la Moule, parce qu'elle a une répartition universelle, ce qui n'est pas le cas de l'Huître, ni de la Coquille Saint-Jacques. De nombreux « bioessais » sont effectués sur des larves de Mollusques bivalves, ou d'embryons d'Oursins, spécialement dans le cas de déversement en mer de substances dangereuses. La réponse de ces organismes vis-à-vis de la pollution peut-être assimilée au « test-souris » en biologie terrestre. Dans le règne végétal, on trouvera certaines algues (*Laminaires*, ou *Fucus*), et chez les Phanérogames, la *Posidonie* (mais des limitations de distribution restreignent l'usage de ces indicateurs biologiques). Au point de vue microbiologique, on distinguera ainsi les coliformes fécaux, les streptocoques et les salmonelles comme indices de contamination urbaine; on les nomme également, et pour les mêmes raisons « germes tests » (CABANE, 2007).

Une bonne connaissance de la biologie des espèces est une condition essentielle à leur sélection comme bioindicateur. L'étude des cinétiques d'accumulation permet d'obtenir des informations sur la durée d'intégration de la contamination. Des connaissances sur le mode de vie, la stratégie de nutrition, la reproduction, la croissance, la durée de vie sont aussi nécessaires. Plusieurs espèces déjà utilisées dans la surveillance du milieu marin ont échoué de satisfaire les conditions requises (NAKHLE, 2003). Les stratégies d'accumulation propres à chaque bioindicateur surtout pour les métaux traces doivent être bien établies avec des expériences au laboratoire (PHILLIPS & RAINBOW, 1993).

De la plupart des sources écotoxicologiques, les Vertébrés présentent de nombreux avantages dans le choix pertinent d'une espèce sentinelle. La connaissance et la compréhension des mécanismes et processus de métabolisation et de génotoxicité est plus développée chez les Vertébrés que chez les Mollusques (STEGEMAN et al., 1992). Les réponses sont aussi plus fortes et donc plus « lisibles ». En revanche, la grande mobilité des Poissons et les difficultés liées à leur capture sont de fortes limitations à leur usage comme bioindicateur. En tant qu'organismes filtreurs, les moules ont d'intéressantes capacités à concentrer certains contaminants tels que les métaux lourds et certains matières organiques persistants à l'endroit précis où elles se développent (THOMAS et al., 1990).

Les chercheurs se sont mis d'accord sur le principe d'utiliser la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* comme bioindicateur quantitatif et qualitatif (FISHER et al., 1987). Le choix de cette espèce dans le cadre du suivi biologique des effets de la pollution côtière sur les organismes marins n'est pas strictement scientifique puisque la moule reste un produit consommé, et donc la salubrité de cette espèce concerne la santé publique (BOCQUENE, 2002). Cependant, quelques participants se sont rendus compte que cette espèce est devenue rare et même absente dans la partie Sud et Est de la Méditerranée. Ce

changement dans la distribution résulte probablement de la destruction des habitats à cause du développement côtier, ou peut être de l'interférence avec d'autres espèces provenant de la Mer rouge (NAKHLE, 2003)

4. 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 et ne permettent pas de détecter les plus de 100 000 molécules chimiques à caractère toxique existantes et rejetées dans le milieu naturel.

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 médical 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 3):

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'effet 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. Il s'agit de la durée de survie à l'air des moules (test du stress sur stress), de la fréquence des micronoyaux dans les cellules branchiales de moules, de la stabilité lysosomale membranaire, de l'accumulation des lipofuscines et de la détermination des lipides neutres des glandes digestives de moules.

- Sois **d'indices de stress spécifiques** traduisent une réponse de l'organisme à une famille de polluants. Il s'agit 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.

Tableau 3: 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 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).

Tableau 3: (suite) Différents biomarqueurs utilisés pour le diagnostic écotoxicologique (PEAKALL, 1992).

Type de biomarqueur	Genre de réponse biologique
Biomarqueurs mixtes d'exposition et d'effets	-Réponses moléculaires : Synthèses protéiques et enzymatiques; les premières à être détectées et mesurées: -Métallothionéines (COUILLARD et <i>al.</i>, 1995) -Enzymes métaboliques (HUGGETT et <i>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).

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 (NICHOLSON & LAM, 2005). 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 dix 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, régime, 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 sujet 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), comme l'évaluation des points finaux caractéristiques 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).

Tableau 4 : Réponses des différents biomarqueurs selon la classe des polluants (PEAKALL, 1992).

Polluant	Biomarqueur	Information
Métaux	Métallothionéines et autres métalloprotéines	++
	Intégrité de l'ADN	+
	Réponse immunitaire	+
	Atteintes cytologiques	++
HAP	Induction des monooxygénases à cyt. P450	++
	Intégrité de l'ADN	+
	Adduits à l'ADN et à l'hémoglobine	+++
	Réponse immunitaire	+
HAP chlorés	Induction des monooxygénases à cyt. P450	++
	Taux d'hormones stéroïdes	+
	Adduits à l'ADN et à l'hémoglobine	+
	Intégrité de l'ADN	+
	Réponse immunitaire	+
Organophosphorés	Intégrité de l'ADN	+++
	Inhibition de l'AChE	+++
	Inhibition des neuroestérases (neuropathies)	+++
	Réponse immunitaire	+

+ : Signal d'une perturbation
 ++ : Présence d'un polluant de cette classe
 +++ : Risque d'effets à long terme

Tableau 4 (suite) : Réponses des différents biomarqueurs selon la classe des polluants (PEAKALL, 1992).

Polluants	biomarqueur	Information
Polluants divers	Protéines de stress	+
	Enzymes du stress oxydant	+
	Nucléotides adényliques	+
	Glycogène et autres polysaccharides	++
	Atteintes cytologiques	++

+ : Signal d'une perturbation

++ : Présence d'un polluant de cette classe

+++ : Risque d'effets à long terme

Tableau 5: Liste de quelques biomarqueurs (BOCQUENE et *al.*, 2002).

Marqueurs biologiques		Tissu	Référence analytique	Unité
BenzoPyrène Hydroxylase	BPH	glande digestive	DEHNEN et <i>al.</i> , 1973	pmol resorufin mg^{-1} P.min ⁻¹
Glutathione S-Transferase	GST	branchies	HABIG et <i>al.</i> 1974	nmol. mg^{-1} P. min ⁻¹
Catalase	CAT	glande digestive	GRENNWALD, 1985	$\mu\text{mol. mg}^{-1}$ P. min ⁻¹
MalonDiAldéhyde	MDA	glande digestive	BUEGE & AUST, 1978	nmol. mg^{-1} P
Adduits à l'ADN	Add	glande digestive	GENEVOIS et <i>al.</i> , 1998	adduits per 10 ⁸ nucleotides
Multi Xenobiotic Resistance	MXR	branchies	Minier & Moore, 1991	ng proteine
Acétylcholinestérase	AChE	branchies	ELLMAN et <i>al.</i> , 1961	nmol acétylthiocholine. mg^{-1} P.min ⁻¹
Superoxyde dismutase	SOD	glande digestive	MARKLUND & MARKLUND (1974)	U mg protein_1 min_1

III. Acétylcholinestérase : Biomarqueur spécifique d'effets neurotoxiques

1. Notion générale sur la transmission cholinergique :

a. L'acétylcholine et l'acétylcholinestérase :

L'acétylcholine (ACh) (Fig. 3) 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. 4 et 5), 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 d'autre part au niveau des ganglions sympathiques un rôle dit nicotinique, inversant certains effets précédents. 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.

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.

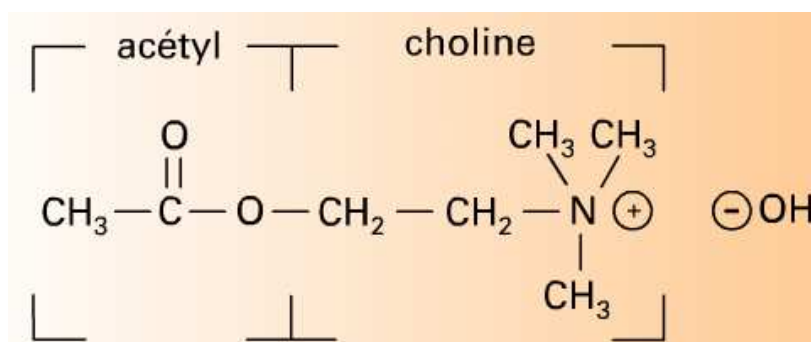


Fig. 3 : Structure chimique de l'Acétylcholine.

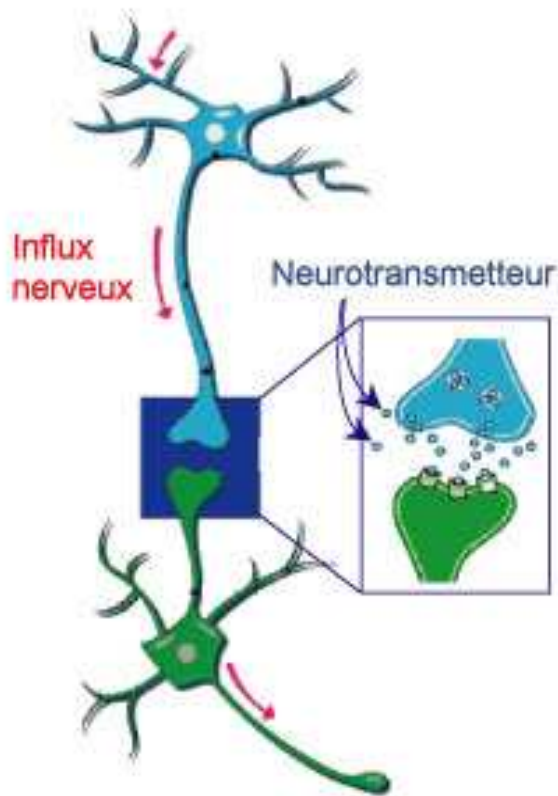


Fig. 4: Transmission de l'influx nerveux. Au bout du neurone, les neurotransmetteurs libérés se lient sur leurs récepteurs du deuxième neurone ce qui induit la propagation de l'influx.

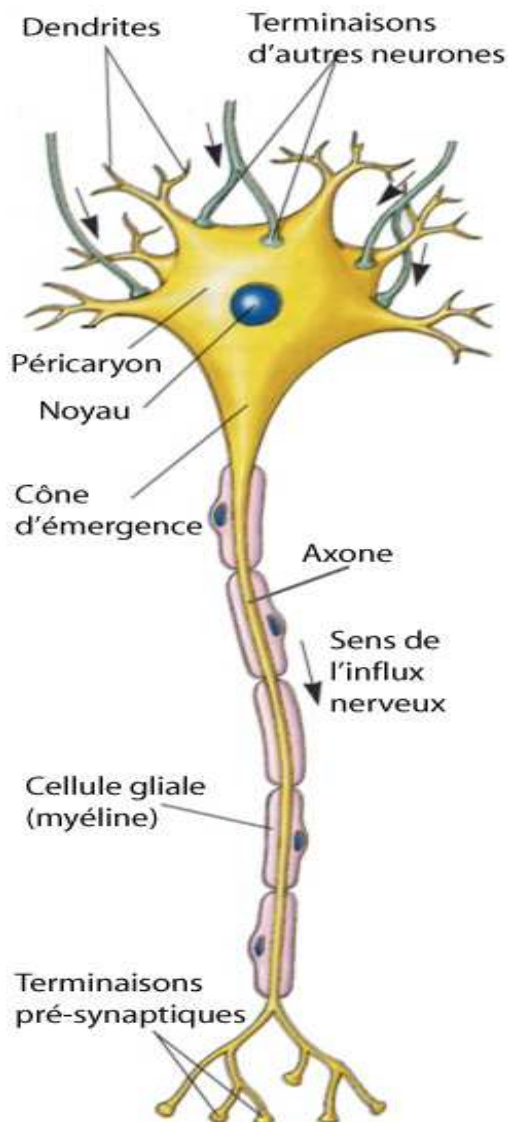
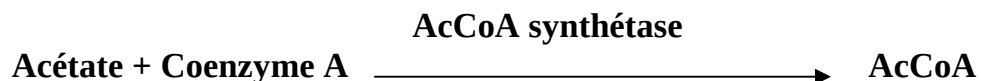


Fig. 5: Schéma général d'un neurone (HARVEY-GIRARD, 2005).

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. 6 et 7). 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. 7). 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.

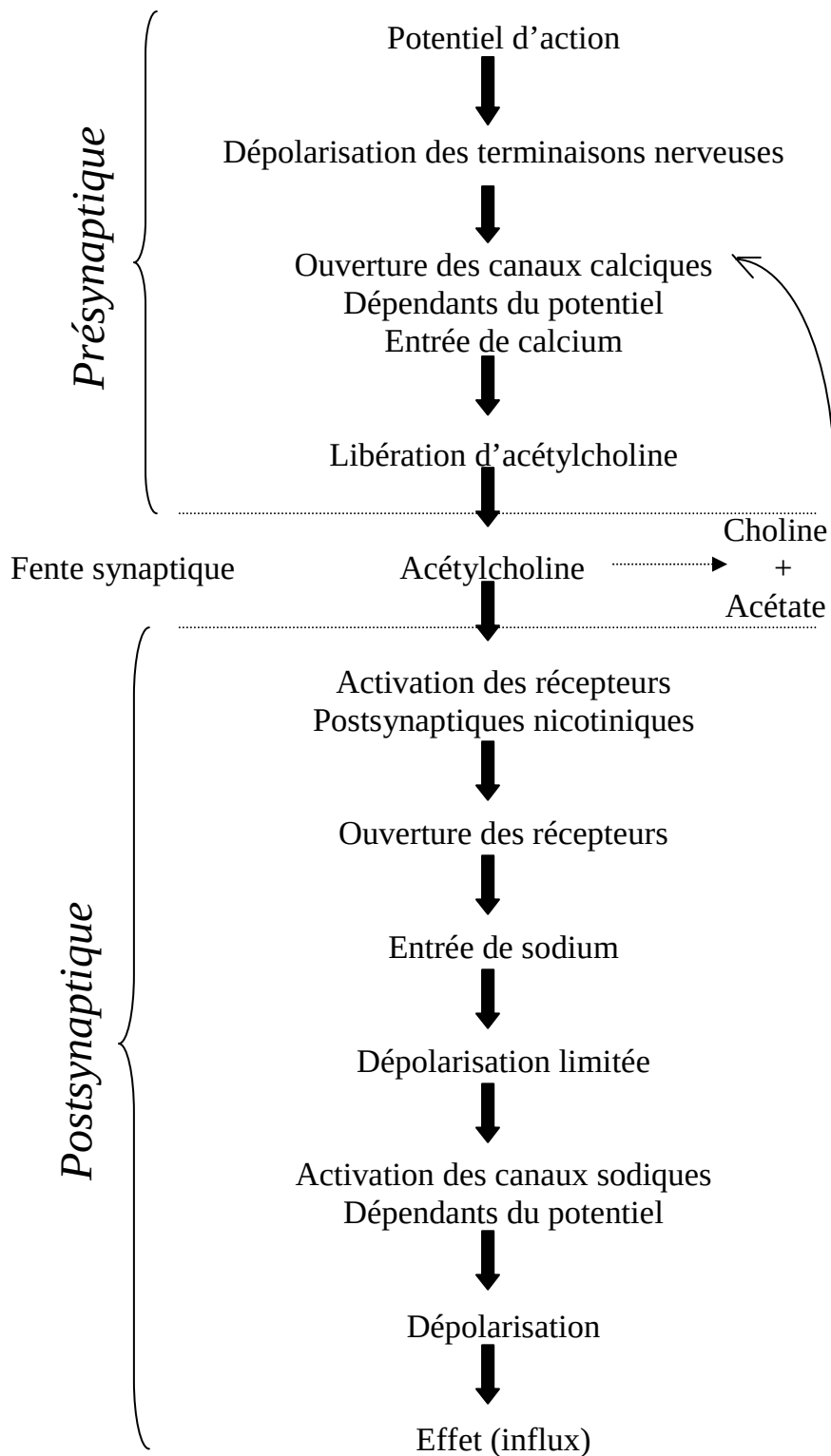


Fig. 6 : Recyclage de l'acétylcholine (PHARMACORAMA)

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. 7). 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. 7) (LAFLAMME, 2000).

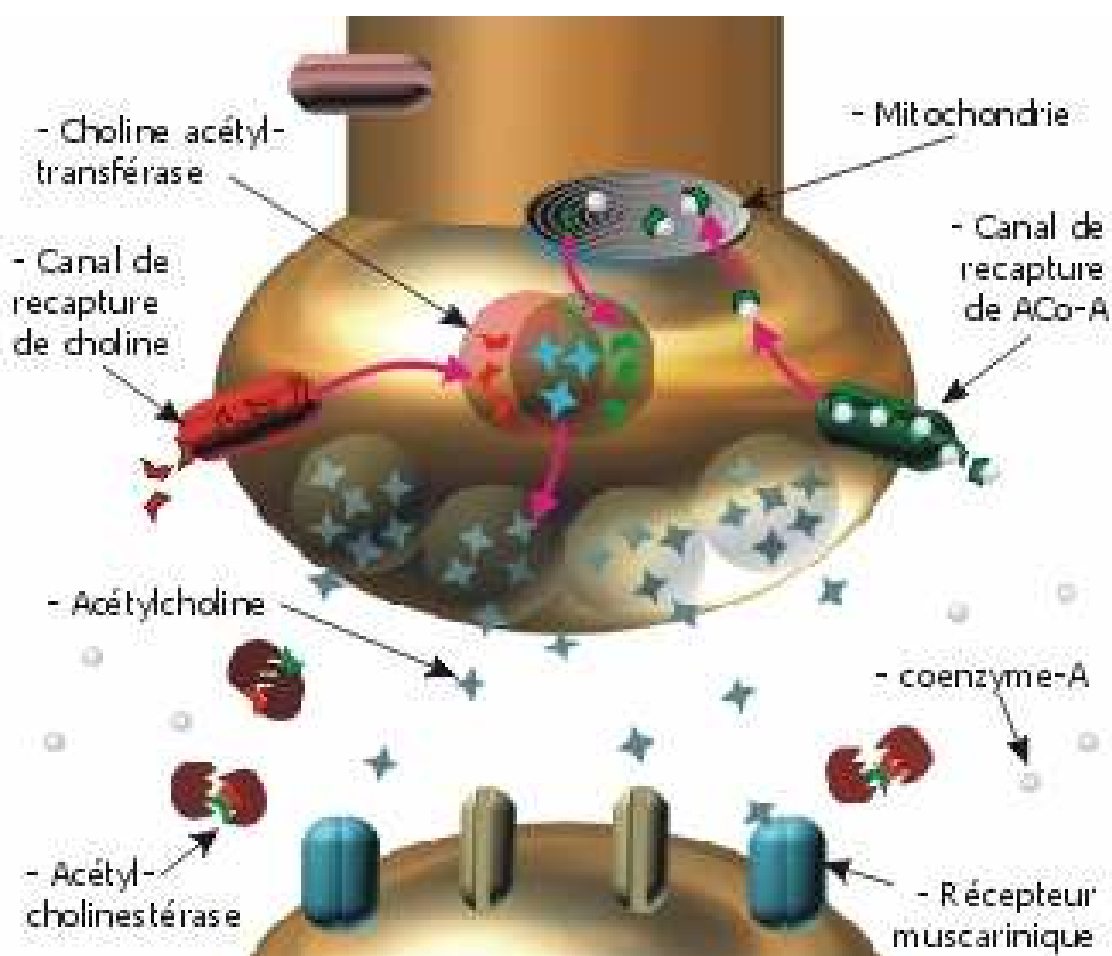


Fig. 7 : Transmission synaptique cholinergique (LAFLAMME, 2000).

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 désignés 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).

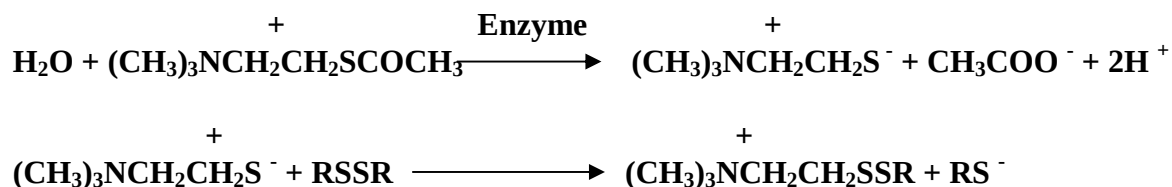
L'AChE est donc un biomarqueur enzymatique de neurotoxicité (MORA *et al.*, 1999). On pense que les niveaux d'activité de l'AChE peuvent être des indicateurs utiles des réponses biologiques chez les organismes (les moules et

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 (PAYNE et *al.*, 1996), 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. L'effet neurotoxique qui découle 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). Chez la moule, les activités AChE les plus fortes ont été mesurées dans les branchies (BOCQUENE et *al.*, 1990), et le choix de porter la mesure uniquement sur cet organe permet également de s'affranchir en partie de l'influence de la gamétogénèse et des périodes de pontes sur le contenu en protéines de ces tissus (BOCQUENE et *al.*, 2002).

La cholinestérase hydrolyse l'acétylcholinestérase iodure (AChEI) en thiocholine et acétate. Thiocholine réagit avec l'acide dithionitrobenzoïque (DTNB) pour former l'acide thionitrobenzoïque 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) indiquent que les variations saisonnières sont négligeables pour l'AChE ; les 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).

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 pesticides² 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

² Pesticide : c'est une substance, ou un mélange de substances, utilisé pour empêcher d'agir, détruire ou neutraliser un ravageur, un vecteur de maladie humaine ou animale, une espèce végétale ou animale nocive ou gênante au cours de la production, de la transformation, de l'entreposage, du transport ou de la commercialisation de denrées alimentaires, de produits agricoles, de bois et de dérivés du bois, ou d'aliments pour animaux, ou encore susceptible d'être administré à des animaux pour détruire les insectes, arachnides ou autres parasites à la surface de leur corps ou à l'intérieur de leur organisme (FAO, 1986).

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).

a. 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 surstimule 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 volatils, mais très liposolubles. 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-D-aspartate (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).

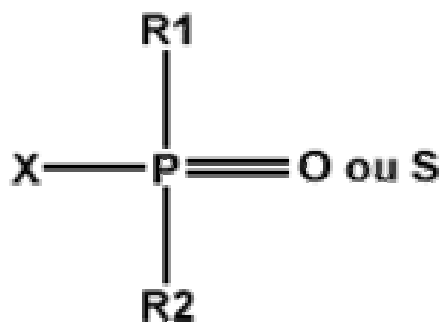


Fig. 8 : Formule des organophosphorés. Ce sont des dérivés esters, amides ou thiols de l'acide ortho et thiophosphorique. R1 et R2 sont des chaînes alkoxy ou aryloxy et X est un groupe aliphatique ou aromatique facilement détachable.

Tableau 6: 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).

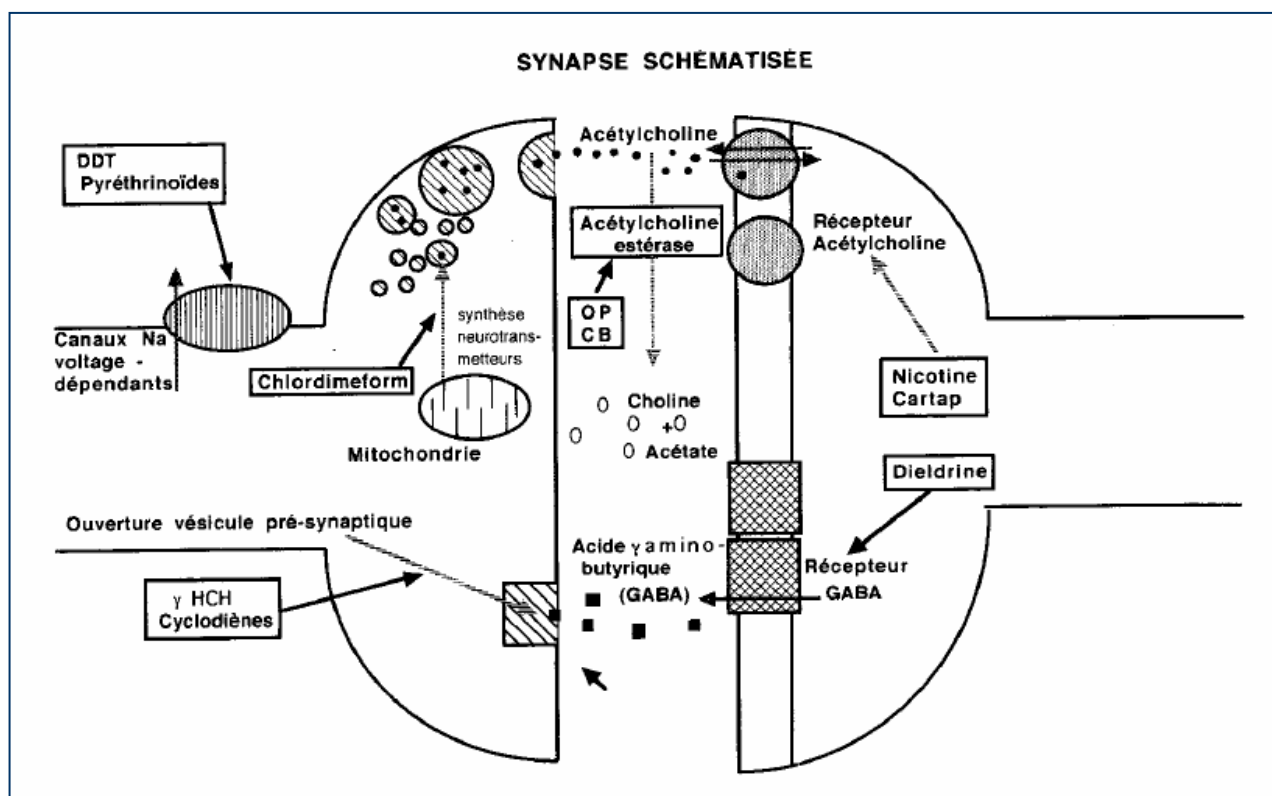


Fig. 9 : Principaux sites d'action des insecticides actuellement utilisés sur des protéines-cibles dont la majorité se trouve au niveau des synapses du système nerveux. (AMICHOT et *al.*, 1998).

♦ 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 (FLEISHER & HARRIS, 1965), 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. 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) le neurotoxicité cholinergique, (2) neurotoxicité retardé induit par les ester-organophosphores (OPIDN), et (3) la neurotoxicité chronique induite par l'ester-organophosphore (OPICN) (ABOU-DONIA, 2003).

b. 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 mois de 24h post exposition (INSP, 2007).

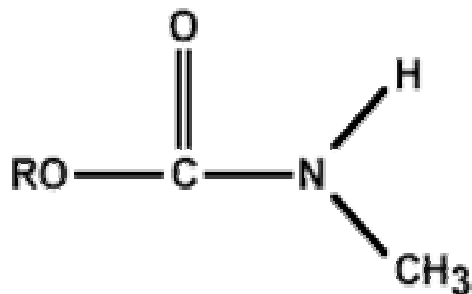


Fig. 10 : Formule des carbamates. Ce sont des méthylcarbamates dérivés de l'acide méthylcarbamique. R est une chaîne alkyl ou aryl.

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.

Partie II :

Mytilus galloprovincialis

*Espèce sentinelle bioindicatrice de
pollution*

I. Biologie de l'espèce *Mytilus galloprovincialis* :

Le mot Moule (*Mytilus*) dérive du grec *myo* (*mus* en latin) comme le mot muscle. Consommée depuis l'Antiquité comme l'évoque son nom *Mytilus galloprovincialis* qui indique qu'il s'agit de la moule qui vient de la province romaine de Provence.

1. Systématique :

- Embranchement : Mollusques
- Classe : Bivalves (*Lamellibranches*)
- Sous classe : Ptériomorphes
- Ordre : Mytiloidés (Hétéromyaires)
- Famille : Mytilidées (*Pélécypodes*)
- Genre : *Mytilus*
- Espèce : *galloprovincialis* (LAMARCK, 1819)

C'est une classe de Mollusques (corps mou, visqueux, non segmenté) à symétrie bilatérale, sans bosse viscérale dorsale. Le tégument forme de chaque côté un pli ou manteau enveloppant le corps sur lequel est moulée une coquille bivalve. La tête est indistincte (*Acéphales*). Le pied est comprimé latéralement, en forme de hache (*Pélécypodes*). Les branchies sont très développées et lamellaires (*Lamellibranches*). Deux muscles adducteurs puissants traversent le corps et ferment la coquille (GRASSE ; POISSON & TUZET, 1961). Le genre *Mytilus* appartenant à l'ordre des *Hétéromyaires* (qui indique que le muscle postérieur est plus important que le muscle antérieur) est principalement défini par la forme de sa coquille, en particulier par son embout en position terminale (CASAS, 2005).

Selon SOOT RYEN (1969), le genre *Mytilus* comprend trois espèces: *Mytilus edulis* Linné, *Mytilus californianus* Conrad et *Mytilus crassitesta* Lischke. Cet auteur fait ensuite la liste des sous-espèces parmi lesquelles *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (moules larges, quadrangulaires) et *Mytilus edulis planitalus* (Lamarck, 1819) (moules subconiques), deux moules fréquemment utilisées dans les programmes de surveillance respectivement en Méditerranée et en Océanie (BUTLER et al., 1971; DARACOTT & WATLING, 1975; KOCK DE, 1986; PHILIPS & SEGAR, 1986; CLAISSE et al., 1992; JOANNY et al., 1994; PHILLIPS & RAINBOW, 1994; RAINBOW, 1995; HAYNES & TOOHEY, 1998; AMIARD-TRIQUET et al., 1999; BOENING, 1999; ODZAC et al., 2000; BESADA et al., 2002; ROMEO et al., 2003; ANDRAL et al., 2004; FUNG et al., 2004; KALPAXIS et al., 2004; RAINBOW et al., 2004 ; BENGHALI, 2006).

L'espèce *Mytilus galloprovincialis*, dite moule méditerranéenne (LUBET, 1959), est un Mollusque bivalve, généralement bien étudié (Bayne, 1976 ; LUBET, 1959, 1963, 1973, 1981 ; LUBET & ALOUI, 1987). L'aire de répartition de cette espèce s'étend sur la côte atlantique depuis la baie d'Agadir (Maroc) jusqu'au îles britanniques et englobe aussi l'ensemble du bassin méditerranéen, l'Afrique du Sud, la Nouvelle-Zélande et la Californie (MC DONALD & KOEHN, 1991).

Les moules vivent fixées sur substrats durs dans la zone médiolittorale (zone intertidal), en adhérant à la roche par le byssus, ce dernier est très résistant ; SONGY & AVEZARD (1963) parlent de pouvoir même soutenir une pierre de 15 Kg par l'intermédiaire d'une moule qui était attachée par son byssus. Les moules recouvrent des rochers battus par les vagues ; mais peuvent proliférer dans les estuaires où l'eau est moins salée, moins claire et moins agitée (SONGY & AVEZARD, 1963). On les retrouve aussi dans les ports, dont les eaux riches en matières organiques, provoquent leur engraissement. Elles se prêtent remarquablement à l'élevage (mytiliculture) (Fig. 11) et à la capacité de croître dans un large éventail de conditions environnementales.



Fig. 11: Principaux pays producteurs de *Mytilus galloprovincialis* (FAO FISHERY STATISTICS, 2002).

Cette espèce est sessile (Fig. 12) mais son déplacement peut être effectué par l'arrachement de quelques filaments du byssus par contraction du pied, puis par un mouvement de bascule et pour finir par une fixation un peu plus loin de quelques autres filaments (GAUROY, 1972). DARE (1975) avait attiré l'attention sur la grande production des populations de moules due aux conditions écologiques, en particulier à une forte fixation et une croissance rapide (NACIRI, 1997-1998).

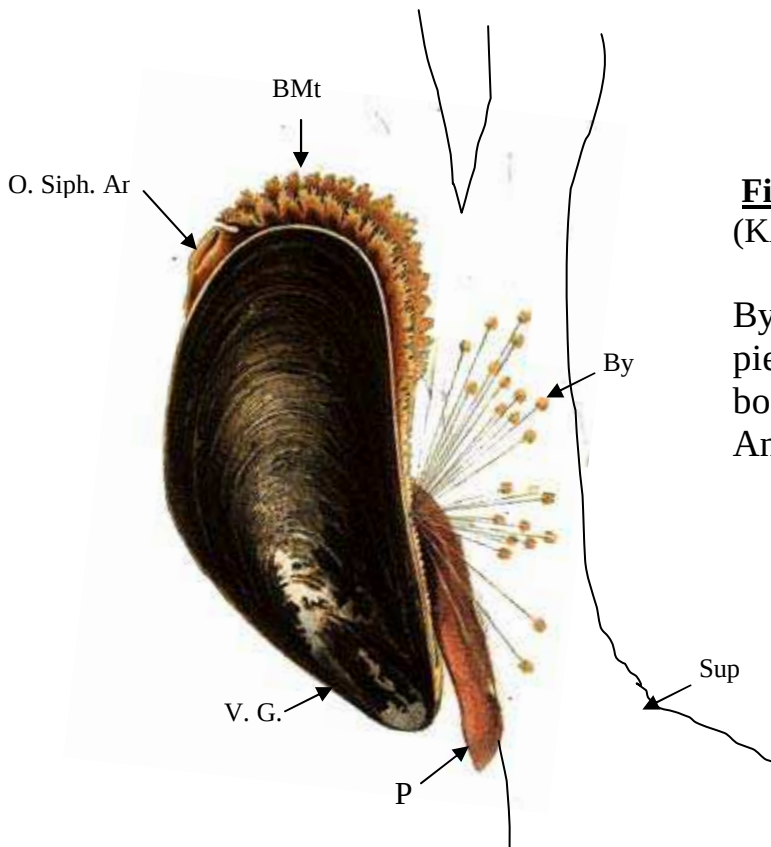


Fig. 12: *Mytilus* sp. fixé à son support (KANTIN & PERGENT, 2004)

By : Byssus ; Sup : support ; P : pied ; V.G. : valve gauche ; BMt : bords frangés du manteau ; O. Siph. An. : Orifice du siphon anal.

2. Anatomie de l'espèce :

Les deux valves sont réunies entre elles par un ligament élastique, situé au niveau de la charnière qui fait écarter les deux valves. Autrement dit, l'écartement des valves est un phénomène passif (muscle rétracteur) ; le rapprochement est un phénomène actif (muscle adducteur) (Fig. 15). Les valves portent à leur surface des stries témoins de leur stade de croissance. Ils sont souvent parasités par des épibiontes : des tubes calcaires d'Annélides sédentaires (serpules), de carapaces de Crustacés (balanes), et de Gastéropodes (capulus) (Fig. 13 et 14). Sécrétée par le manteau sous-jacent, la coquille est de nature constituée d'une matière organique (conchyoline) et de calcaire intimement lié (SONGY & AVEZARD, 1963). Son extrémité antérieure est plus effilée que l'extrémité postérieure (GAUROY, 1972).

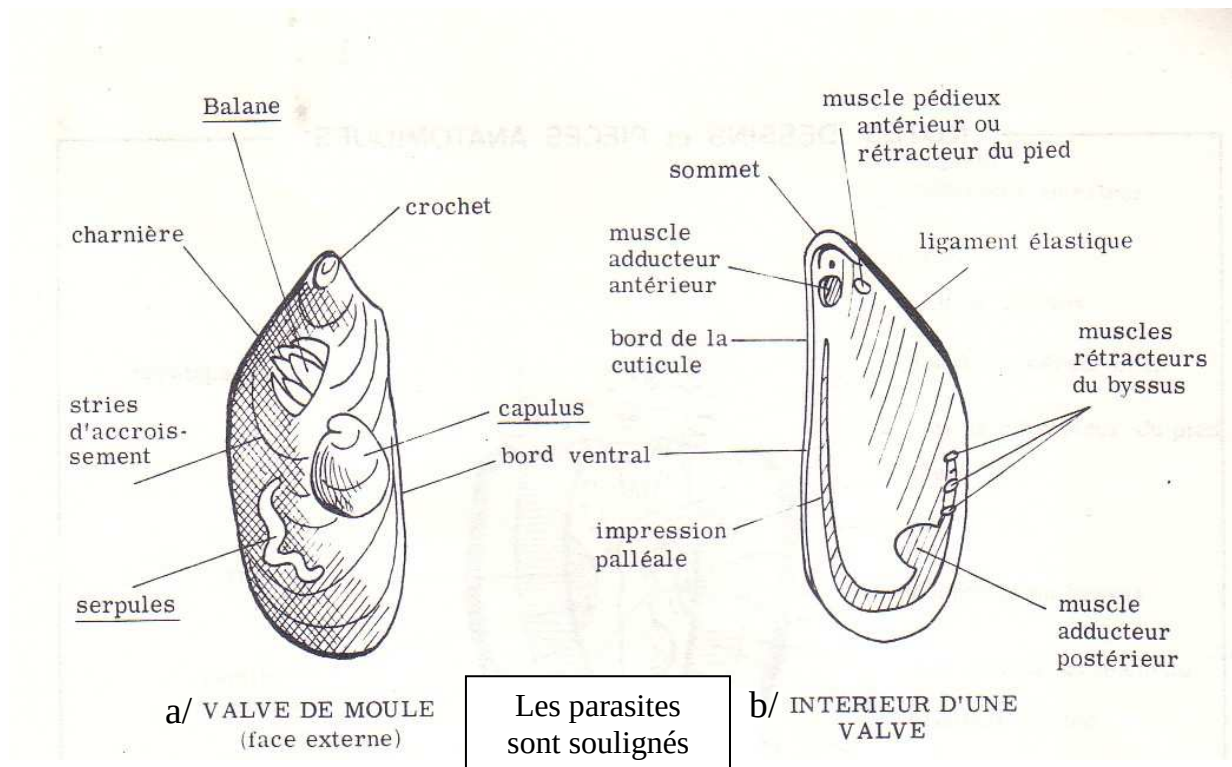


Fig. 13: Face interne et externe d'une valve de moule (Gauroy, 1972).



Fig. 14: *Mytilus galloprovincialis* parasitée par toutes sortes d'organismes.

Le manteau est constitué de deux lobes de tissus, et entoure les organes. Le corps mou forme une masse viscérale globuleuse (GAUROY, 1972). La bouche, dont les bords comportent quatre palpes labiaux, amène vers l'orifice buccal un courant d'eau de mer chargé d'aliments (algues et animaux microscopiques). Les glandes à mucus des palpes labiaux permettent la fixation des particules alimentaires (Fig. 15) (GAUROY, 1972).

Le pied est un organe allongé, musculeux, et est parcouru sur sa face ventrale par un sillon longitudinal. Deux bandes blanchâtres représentent les muscles rétracteurs du pied (Fig. 15) (VILLENEUVE & DESIRE, 1965). Il possède des canaux qui produisent et excrètent une protéine de nature polyphénolique dotée de très forte propriété adhésive (byssus). Au début, la protéine présente une consistance visqueuse ; au contact du support (rocher, bois ou autres coquillages), une enzyme, est immédiatement libérée. Elle solidifie la colle, et la rend inattaquable par l'eau (GAUROY, 1972).

Les deux lobes du manteau délimitent une cavité remplie d'eau de mer qui est la cavité palléale. Une paire de branchies disposée dans la cavité palléale et orientée vers l'arrière, filtre des particules en suspension dans l'eau. Un organe de couleur marron foncé représente le foie ou l'hépatopancréas. Deux tubes nommés les siphons inhalant et exhalant, ont pour fonction respective d'aspirer et d'expulser l'eau lui permettant de circuler dans la cavité palléale (Fig. 15).

Le rein qui a une forme d'un sac ouvert à ses deux extrémités, communique d'un côté avec l'intérieur du péricarde, de l'autre côté avec la cavité palléale où s'ouvre une papille uro-génitale qui sert à l'évacuation des déchets et des oeufs.

Le système nerveux de la moule est simple, et est formé de trois paires de ganglions (VILLENEUVE & DESIRE, 1965). Une paire de ganglions cérébroïdes au voisinage de la bouche. Une paire de ganglions pédieux se trouve à la partie antérieure de la base du pied. Une paire de ganglions viscéraux s'observe dans la partie postérieure du corps. Ces ganglions sont réunis par des filets nerveux ou connectifs et innervent les différentes parties du corps (VILLENEUVE & DESIRE, 1965).

Le cœur des *Mytilidae* est un organe à trois chambrés situé sur la charnière de la coquille et enfermé dans le péricarde. Il se compose d'un ventricule central et d'oreillettes latérales appareillées. Sa fonction primaire est une pompe musculaire pour le transport de l'hémolymphe. Le cœur a également un rôle dans l'excrétion et l'ingestion pendant que la filtration de l'hémolymphe à travers les membranes du cœur produit l'urine primaire (NICHOLSON, 2002). Le rectum traverse également le ventricule et les contractions systoliques peuvent faciliter le mouvement des fèces par l'intestin inférieur (NICHOLSON, 2003 b). L'intestin passe sous le cœur et gagne presque directement l'anus. La moule ne possède ni veine, ni capillaires. Le liquide hémolymphe de retour tombe dans des lacunes (sinus, circulation lacunaire) avant de revenir aux branchies.

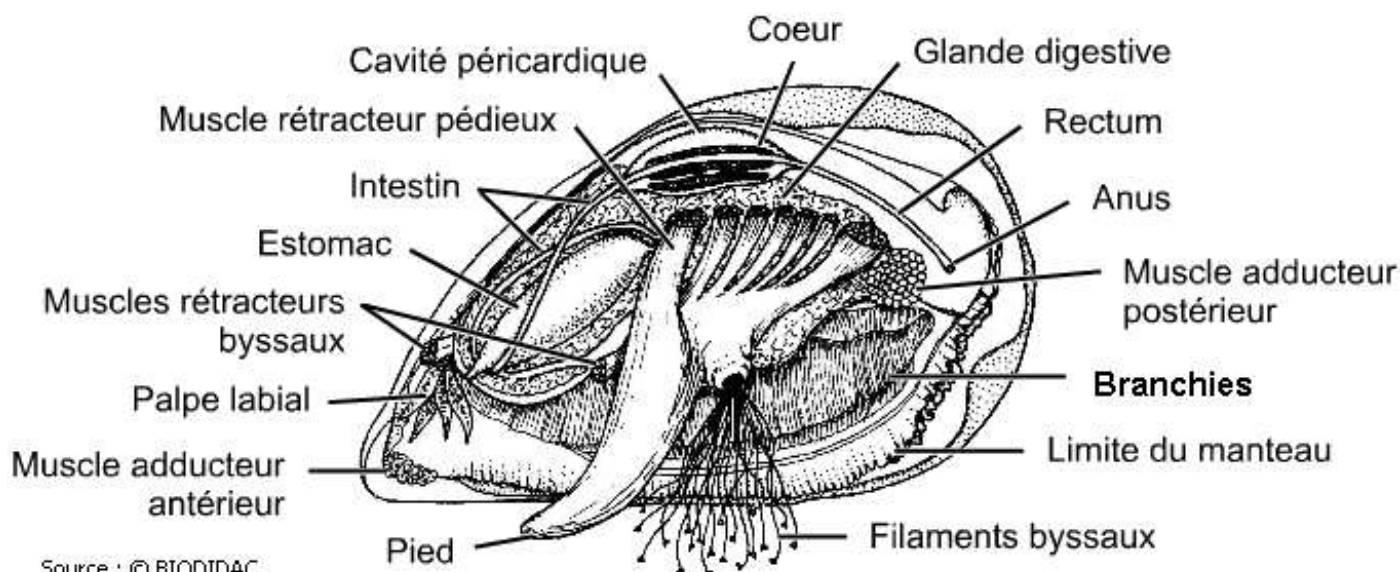


Fig. 15 : Structure interne de la moule (NEWELL, 1989).

3. La reproduction :

La reproduction de *M. galloprovincialis* est continue durant toute l'année (NACIRI, 1997-1998), avec une période de repos sexuel très réduite n'affectant qu'un nombre limité d'individus (IDHALLA et al., 1997).

Le courant d'eau joue un rôle important dans la reproduction. On sait que les deux sexes sont séparés chez la moule (gonochorisme) au moment de la maturité sexuelle ; quand les moules sont « grasses », les spermatozoïdes sont libérés et transportés par les courants d'eau dans la cavité palléale des femelles. Ils y rencontrent les ovules qu'ils fécondent (SONGY & AVEZARD, 1963).

Les chances de cette fécondation sont d'autant plus renforcées en raison du groupement très dense des individus, dont la maturité et l'activité génitale se manifestent de façon collective et simultanée. Ainsi, dans ce monde de silence, le processus de synchronisation s'opère par le biais de phéromones : les fertilisines (TRAN KY ; GUILBERT J-M. & DIDOU-MANENT, 2003). Le déclenchement et la durée de la gamétogenèse sont sous l'influence de la température (BAYNE, 1976). Celle-ci ne peut se dérouler normalement qu'à une température comprise entre 4°C et 17°C (LUBET & ALOUI, 1987). Au moment de la reproduction, les glandes génitales pénètrent dans les feuillets du manteau, celui-ci apparaît rougeâtre pour les mâles et jaunâtre pour les femelles.

Quatre étapes principales de développement de gonades ont été différenciées selon BAYNE (1976) : Repos sexuel, reprise d'activité génétique, gamétogenèse, maturation génitale et émission de gamètes.

La ponte, c'est-à-dire la libération des larves, se fait sous l'influence d'une variation brusque de température ou de salinité, mais à des périodes qui ne semblent pas être fixes. Ainsi, les embryons une fois formés, quittent leur mère en nageant grâce à leur vélum formé de cils vibratoires. Ils partent à la recherche d'un support, et se fixent avec leur byssus naissant. Les larves perdent alors leur voile, sécrètent une minuscule coquille et deviennent de petites moules qui se développent sur place.

Le recrutement des jeunes moules *Mytilus galloprovincialis* s'effectue durant toute l'année (NACIRI, 1997-1998) avec trois périodes de fortes intensités qui succèdent aux périodes de pontes. Les périodes de recrutement principales en Algérie se font de Mai à Septembre (ABADA-BOUDJEMA & MOUEZA, 1981). Selon BOROMTHANARAT (1986), des moules ayant une taille de 0,25 à 1 mm peuvent avoir 15 jours, mais n'atteindraient 1,5 mm qu'à l'âge d'un mois.

II. Trajet de l'eau et rôle de la filtration :

Le courant d'eau pénètre librement entre les deux valves de la coquille, par la cavité palléale et en ressort épurée, en un point bien défini à l'opposé du sommet pointu de la coquille : Boutonnière. Une partie de l'eau est attirée vers la bouche par le battement des cils qui tapissent les palpes labiaux, l'autre partie est filtrée à travers les branchies. Le plancton retenu par les branchies est alors acheminé vers l'estomac grâce à l'ondulation des cils du tube digestif (SONGY & AVEZARD, 1963). Cette eau délestée de ses substances assimilables est rejetée par le siphon exhalant. Le courant d'eau est donc ravitailleur (Fig. 16) (SONGY & AVEZARD, 1963).

Le genre *Mytilus* est suspensivore (microphage) omnivore. Les cellules phytoplanctoniques, vivantes et mortes, constituent la principale source de nourriture, mais d'autres sources de carbone, comme des macrophytes en décomposition ou des détritiques en suspension peuvent aussi compléter le régime alimentaire. Par ailleurs, la surface corporelle de la moule absorbe également la matière nutritive dissoute dans l'eau (TRAN KY ; GUILBERT & DIDOU-MANENT, 2003).

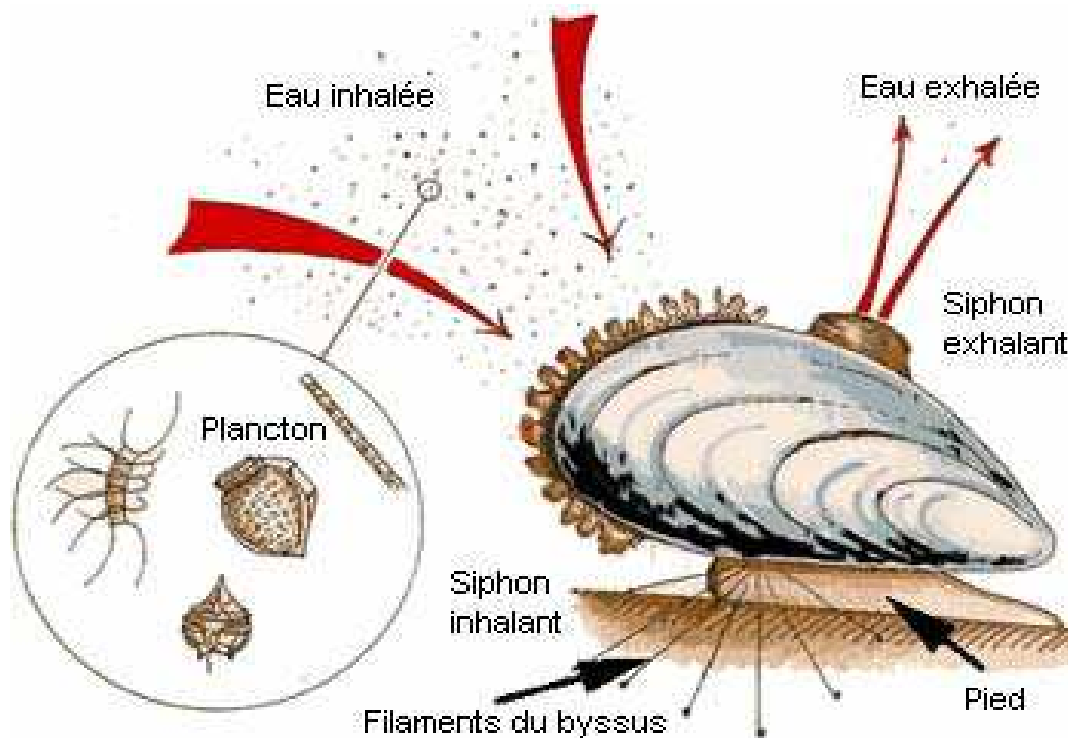


Fig. 16 : Schéma de l'activité de filtration de *Mytilus sp* (P. O. C., 2003).

Par son importance essentielle dans la nutrition et la respiration du bivalve, le courant d'eau est par conséquent entretenu continuellement, on estime la quantité d'eau filtrée à travers les branchies de 3 à 5 litres par heure (TRAN KY ; GUILBERT & DIDOU-MANENT, 2003). Le courant d'eau joue alors, un rôle primordial dans les fonctions biologiques de l'espèce. Le taux de filtration enregistrés chez les individus de petite taille est plus important que celui des individus de grande taille (RIVA & MASSE, 1983).

L'hémolymphe circule activement dans l'épaisseur des lamelles branchiales. Ce liquide hémolymphatique reçoit au passage l'oxygène dissous dans l'eau de mer et rejette dans celle-ci le gaz carbonique (TRAN KY ; GUILBERT ET DIDOU-MANENT, 2003) et l'azote, essentiellement sous forme d'azote amoniacale $N-NH_4$ (SONGY & AVEZARD, 1963). Le courant d'eau joue donc un rôle respiratoire.

Trois termes essentiels sont utilisés en terme de nutrition des bivalves (HAWKINS & BAYNE, 1992 ; BARILLE, 1996) :

- Le pompage ou débit palléal (ventilation ou pumping rate PR), défini comme étant la quantité d'eau qui circule à travers les branchies par heure (L/h).
- La filtration (Clearance rate CR) correspond au volume d'eau épuré à 100% par unité de temps (L/h ou L/h/g).

- La consommation (ingestion rate IR) désigne la quantité de particules retenues par les branchies par unité de temps (mg/h ou g/h) (Fig. 17).

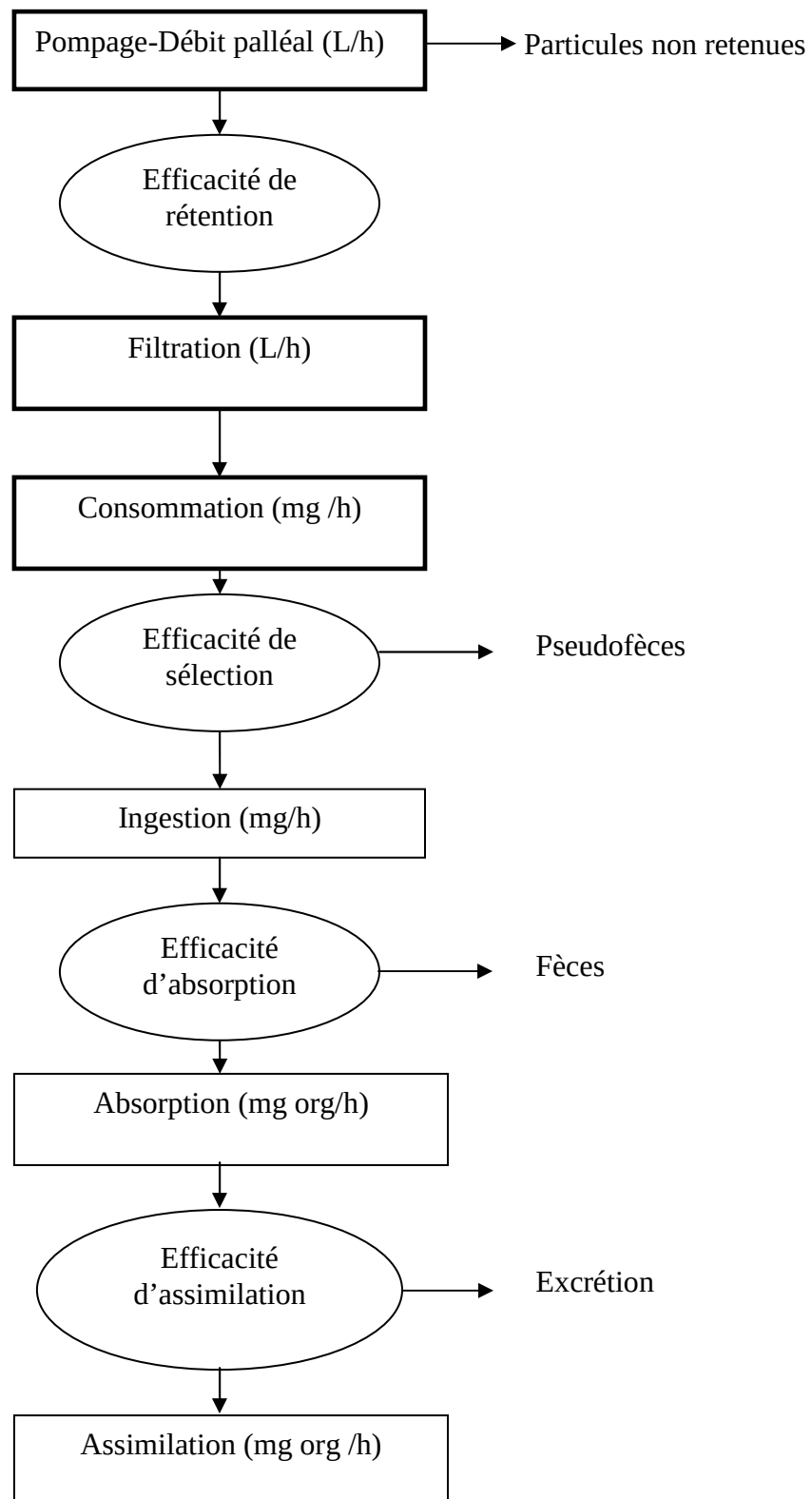


Fig. 17 : Différentes étapes de la nutrition des bivalves (CASAS, 2005).

1. L'activité ventilatoire :

Selon TRAN, BOUDOU & MASSABUAU (2000), la ventilation est réglée par deux « stimuli », l'oxygène et la concentration en plancton. Le stress peut également profondément modifier la ventilation, mais d'une manière aléatoire et non reproductible (c'est un perturbateur ventilatoire). Les variations du débit ventilé sont fonctions des facteurs suivants (MASSABUAU, 2004) :

- Oxygène
- Variations des concentrations en plancton
- Température
- Modification des surfaces branchiales ventilées
- Stress
- Nature du contaminant en cas d'une éventuelle contamination

Selon BAYNE *et al.* (1976), le taux d'excrétion du N-NH₄ chez *M. edulis*, augmente avec la température et avec l'abaissement de la salinité. RIVA & MASSE (1983), confirment ces données chez *M. galloprovincialis* et concluent qu'une température égale à 28°C et qu'une salinité de 20 ‰ constituent des limites écologiques ultimes pour *M. galloprovincialis*.

La physiologie des bivalves filtreurs est dépendante de multiples facteurs environnementaux (MES, plancton, oxygène, température...) (POUVREAU, 2004). Si l'on considère alors l'influence des conditions du biotope sur les activités physiologiques du bivalve et la répartition géographique des deux espèces *M. galloprovincialis* et *M. edulis*, qui ont une grande importance dans les nombreux programmes de surveillance environnementale, on peut ressortir leur différence physiologique dans le tableau qui suit :

Tableau 6: Comparaison entre les deux espèces voisines, moule méditerranéenne et la moule d'Atlantique (RIVA & MASSE, 1983).

	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>
Sensibilité aux fluctuations de la salinité	-	+
Taux de consommation de l'oxygène	+	-
Valeurs de taux de filtration	+	-
Métabolisme	+	-
Température limite pour l'activité de filtration	28°C avec une salinité de 20‰	30°C
Température létale	28°C - 29,5°C	30°C – 31,5°C

III. Utilisation de *Mytilus galloprovincialis* comme espèce sentinelle :

Les Invertébrés, en particulier les Mollusques bivalves, tels que les moules (*Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*) sont des organismes très appropriés pour étudier les effets biologiques des polluants. Ils ont été étudiés physiologiquement dans le domaine de l'aquaculture et répondent aux critères de sélection d'espèce cible pour des applications de surveillance.

Les mytilidés sont un groupe de faune occupant des habitats dynamiques, des habitats d'estuaires et sont adaptés aux environnements naturellement stressants. Les moules étant sédentaires, sont passivement exposées aux polluants environnementaux et ne succombent pas habituellement à la toxicité aigue mortelle (NICHOLSON & LAM, 2005). Elles accumulent certains composés xénobiotiques de façon passive et selon un certain équilibre avec la contamination du milieu (BOCQUENE et *al.*, 2002), avec un facteur de concentration de 10^3 à 10^5 (CASAS, 2005). La biotransformation est souvent considérée comme faible et relativement lente ; de ce fait, la contamination chimique des Mollusques reflète assez bien la contamination du milieu (BOCQUENE et *al.*, 2002). Elles sont considérées comme étant des **bioindicateurs** fortement utiles, car elles reflètent des conditions d'emplacements spécifiques et accumulent beaucoup de contaminants à des niveaux considérablement plus haut par rapport aux concentrations présentes dans l'eau, fournissant de ce fait, une indication de la concentration biologiquement disponible ; elles sont employées intensivement pour surveiller la qualité de l'eau dans les environnements côtiers et les estuaires (NICHOLSON & LAM, 2005).

Les moules sont les conducteurs filtreurs intertidaux, connues pour accumuler des niveaux élevés d'oligo-métaux et de composés organiques dans leurs tissus, fournissant une indication intégrée par temps de contamination de l'environnement avec des réponses cellulaires et physiologiques observables. Ces caractéristiques font d'elles de bonnes candidates pour le contrôle de l'environnement depuis le programme « *Mussel Watch* » de 1970 (GOLDBERG, 1980 ; LIVINGSTONE, 1993).

Elles sont donc considérées comme des organismes de biosurveillance aquatique idéale et ont été déployées dans des programmes de biosurveillance de la pollution dans plusieurs régions du monde (NICHOLSON & LAM, 2005). Ces organismes sessiles sont résistants et faciles à collecter et à manipuler pour les expériences de biosurveillance active (The caging ou la transplantation) (NASCI et *al.*, 2002).

Bien que l'utilisation des moules comme bioindicateur ait un certain nombre d'avantages, il existe des limitations intrinsèques à cette approche. Les fluctuations saisonnières dans la charge des corps des contaminants, peuvent compliquer l'interprétation des résultats analytiques. En outre, les paramètres biologiques, comprenant (l'âge, le sexe, la physiologie et le statut de santé) peuvent différer de manière significative et entre les individus. Néanmoins, les moules accumulent les contaminants à plusieurs ordres de grandeurs et intègrent généralement la fraction biologiquement disponible. En plus de fournir une évaluation utile des contaminants chimique dans le temps et l'espace, plusieurs techniques ont été maintenant développées pour établir des réponses biologiques chez la moule permettant, de ce fait, des mesures de produits chimiques et de biomarqueurs chez un même individu (NICHOLSON & LAM, 2005).

Mytilus galloprovincialis représente donc, un excellent bioindicateur quantitatif et qualitatif de pollution côtière, grâce aux nombreux critères de qualité que nous exposons ci-dessous (CASAS, 2005):

- Résistante à la pollution et aux différents stress ; concentre le polluant sans effets létaux, aux concentrations retrouvées dans le milieu avec un facteur de concentration de 10^3 à 10^5 .
- Sédentaire, elle est donc représentative de la zone d'étude.
- Possède une vie longue, pour permettre l'échantillonnage de différentes classes d'âges.
- Euryhaline ; on la retrouve en milieu estuarien et côtier, supporte les apports d'eau douce et donc résiste aux fluctuations de la salinité.
- Sa large répartition géographique allant aux régions tempérées aux régions subarctiques
- La possibilité de les transplanter.
- Sa consommation par l'homme, donc vecteur d'éventuelles contaminations.
- Son pouvoir d'utilisation au cours de toute l'année.
- Sa facilité d'échantillonnage, de conservation et de traitement analytique des moules constitue un attrait supplémentaire face aux sédiments, poissons et planctons.

Sur un plan ecotoxicologique, par rapport à d'autres organismes filtreurs, les moules accumulent certains composés xénobiotiques de façon passive et selon un certain équilibre avec la contamination du milieu (LIVINGSTONE, 1991). La biotransformation de ces xénobiotiques chez ces Mollusques bivalves est souvent considérée comme faible et relativement lente. De ce fait, leur

contamination chimique reflète assez bien la contamination du milieu. Ceci explique leur forte utilisation dans les programmes de surveillance de la qualité du milieu marin (RNO, NOAA). Son importance est également due à sa bioconcentration de nombreux métaux présents dans le milieu aqueux aussi bien à partir de l'eau (surtout au niveau branchial) qu'à partir de la phase particulaire (NAKHLE, 2003). Par contre, son influence aux cycles des saisons est réelle ; de nombreuses études (COSSA et *al.*, 1985, 1989) ont montré une relation nette entre les concentrations de différents contaminants métalliques dans la moule et son poids, de sorte que les moules de petite taille, présentent des concentrations plus élevées que les grandes. En effet, l'augmentation de la biomasse, lors des cycles de reproduction, se traduit par une dilution pondérale des métaux bioaccumulés. Par conséquent, ces variations saisonnières sont la conséquence d'une combinaison de facteurs directement corrélés au poids (cycle sexuels, abondance de nourriture, température) (NAKHLE, 2003).

Partie III :
Matériels et méthodes

I. Couverture spatiale :

Les stations d'échantillonnage et de transplantation de *Mytilus galloprovincialis* se localisent au niveau de la côte occidentale algérienne (Fig. 18):

- Site de Kristel et port d'Oran : baie d'Oran
- Port de Mostaganem : golfe d'Arzew

Pour garantir un lot de moules plus ou moins sein, notre choix pour le site de référence et d'approvisionnement en moules sauvages a été porté sur le site de Kristel, connu pour avoir préservé sa nature sauvage. Cette zone côtière se caractérise par l'absence totale de pratique industrielle ni d'apports directs de contaminants.

Par ailleurs, deux sites d'études impactés ont été ciblés, il s'agit du port d'Oran et celui de Mostaganem, exposés tous deux aux pollutions urbaines, industrielles et au trafic maritime intense.

Lors des campagnes d'échantillonnage et de transplantation, nous avons procédé au géo-référencement des stations à l'aide de GPS (Garmin), ainsi qu'aux relevés de certains paramètres physico-chimiques des eaux par la mesure du pH, température, salinité, oxygène dissous et de la turbidité (Fig. 19).



Fig. 18: Sites d'échantillonnage ()



Laboratoire de Recherche : RESEAU DE SURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE (RSE)
 Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université d'Oran Es-Senia, Oran (Algérie)
 Responsable : Pr. Z. BOUTIBA
 Tel : 070164870 - Tel/Fax : 041-51-31-74

Référence station	Site :	Code :	
		Fiche d'échantillonnage	
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		
	Houle		Courants
	Direction :		Direction :
	Hauteur :		Vitesse :
	Période :		
Paramètres physico-chimiques & biologiques	Température (°) :	pH :	
	Salinité (‰) :	O ₂ dissous (mg/l ; %) :	
	Turbidité (NTU) :	biologiques	
Références de l'échantillon	Nature :	Espèce :	
	Date du prélèvement :	Heure du prélèvement :	
	Profondeur (hauteur d'eau) :	Nature du substrat :	
	Autres :		
Informations complémentaires : Mission effectuée par :			

Fig. 19 : Fiche d'échantillonnage

1. Le site de Kristel (site de référence) :

A l'Est du Port d'Oran, à 18 Km, on retrouve le petit village de Kristel (commune de Gdyl), à l'abri de la pointe de l'Aiguille, fait de jardiniers et de pêcheurs. Cet emplacement, dont la position géographique est la suivante (latitude Nord : N 35° 49' 08", longitude Ouest : W 0° 28' 61") est constitué de criques, de plages à sable fin (Sidi Moussa et Tamda) et d'un petit port très pittoresque où l'on y pratique la pêche de manière artisanale.

Kristel se trouve dans une baie protégée par le cap Ferrat et le cap Carbon des vents violents provenant de l'Est et du Nord. Les données satellitaires témoignent que le site est caractérisé par des courants de faible intensité provenant de l'Ouest (*in* HEBBAR, 2005).

Nous avons choisi le site de Kristel pour récolter les moules sauvages destinées à la transplantation (Fig. 20). Ce dernier étant considéré comme une zone de référence par rapport au port d'Oran et au port de Mostaganem du fait de son éloignement des importantes sources de contamination. Il est à noter également que ce site est le seul au niveau de la baie d'Oran contenant encore des moulières naturelles.



Fig. 20 : Vue panoramique du site de Kristel.

*** Zone de prélèvement de moules références (Pointe de l'Aiguille)**

2. Le port d'Oran : (1^{er} site de transplantation)

Le port d'Oran est un port mixte : Commercial ainsi qu'un grand port de pêche. Il occupe la partie centrale de la baie d'Oran (Fig. 21). Ce port comprend 7 bassins d'une superficie totale de 122 ha et une imposante digue artificielle de 3300 Km de longueur. Le port d'Oran présente 6 Km de quai avec des tirants d'eau variant de 7 à 12 mètres. Les coordonnées géographiques de ce port sont : latitude Nord : N 35° 42' 963", longitude Ouest : W 000° 37' 266". Partant du détroit de Gibraltar, le port d'Oran est le premier à accès maritime à grande profondeur.

En Algérie, dans 80% des cas, les eaux usées d'origine domestique et/ou industrielle ne sont pas épurées avant leur rejet en mer ou dans les oueds. Les eaux usées domestiques représentent près de 60% des rejets totaux, 30% pour les eaux usées collectives et 10% pour eaux usées industrielles. Les eaux usées de la ville oranaise ont présenté en 2001 les charges polluantes suivantes : DBO₅ : 39g/hab/jour ; DCO : 69 g/hab/jour ; MES : 100g/hab/jour (ALG, 2001).

Selon ALG (2001), parmi les points de rejets les plus importants au niveau du port d'Oran :

- Les émissaires des Gênets à l'Est du port qui reçoivent tous les affluents domestiques, les ruissellements pluviaux et affluents d'activité industrielle (artisanales) de la région et de la ville d'Oran (le quartier de Seddikia et le centre ville) (Fig. 22).
- L'émissaire du Fort Lamoune à l'Ouest du port, haut de 2,70 m et large de 2,50 m ; il reçoit les mêmes affluents de la région ouest, prend son départ au niveau de l'ADE du ravin de Ras El Ain et déverse au Fort Lamoune (BENGHALI, 2006) (Fig. 23).

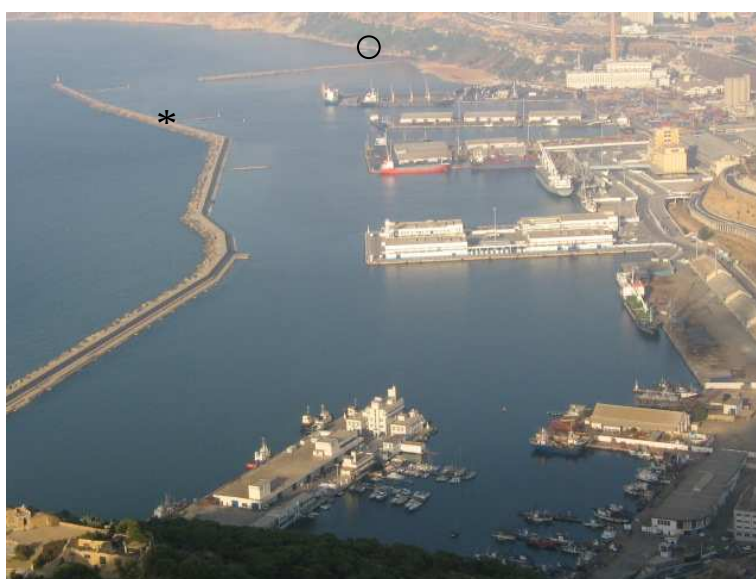


Fig. 21 : Port d'Oran

* Site de transplantation ; ○ émissaires des Gênets



Fig. 22: Emissaires des eaux usées des Genêts (Ouest d'Oran)



Fig. 23: Emissaires des eaux usées du Fort Lamoune (Oran Est)

3. Le port de Mostaganem : (2^{ème} site de transplantation)

Le port de Mostaganem (Fig. 24) est situé à l'Est du golfe d'Arzew, entre la pointe de Salamandre (limite Ouest) et l'embouchure de la rivière d'Ain Sefra (limite Est). Sa Latitude Nord est N 36° 02' 285" et la longitude Ouest est W 000° 08' 005" C'est un port de pêche et de commerce, dont la linéaire de quai atteint 2 km. La superficie totale est de 68 ha dont 60 ha de terre pleine et 2 ha couvert. Il comporte deux bassins, l'un d'une superficie de 14 ha et le second de 16 ha ; leurs profondeurs s'étendent respectivement de 6,77 à 8,17 mètres et de 6,95 à 8,22 mètres. Ce port bénéficie d'une jetée de 1830 mètres.



Photo : TALEB & BENALI, 2007

Fig. 24: Port de Mostaganem
* Site de transplantation

A quelques centaines de mètres du rivage, un courant sous marin se dirige de la pointe de Kharouba vers celle de Salamandre et vient longer la jetée à partir de la courbe vers son extrémité (Laurent, 1993).

Durant la saison estivale, considérée comme une station balnéaire par excellence, Mostaganem accueille un nombre important de touristes qui viennent s'abreuver du soleil et de la mer sur sa bande côtière qui s'étant de la Macta en passant par les Sablettes et la Salamandre jusqu'à la frontière avec la wilaya de Chlef. Le manque de stations d'épuration des eaux usées le long de cette côte, rend le schéma d'assainissement absolument dramatique, vu que tous les émissaires d'eaux usées en provenance des différents points de rejet vont, dans tous les cas, se retrouver à la mer sans aucun traitement préalable.

II. Couverture temporelle :

Pour la biosurveillance active, il est indispensable de prendre en considération la période où l'immersion des moules doit se faire, et cela pour éviter l'influence des facteurs biotiques des animaux transplantés (période de reproduction, croissance...) sur les résultats de la biosurveillance, où la croissance va agir comme un facteur de dilution de la quantité de contaminant incorporée et l'amaigrissement comme un facteur de concentration. Par ailleurs, la période située entre la fin Avril et la première quinzaine de Juillet est la période durant laquelle la moule est en phase de repos sexuel et où son métabolisme est le plus stable et donc la période propice pour procéder à une transplantation (RINBIO, 2001).

Les travaux de TALEB *et al.* (2007a et b) ont situé les périodes de ponte de *Mytilus galloprovincialis*, de la baie d'Oran, aux mois d'octobre et de janvier ; correspondant aux périodes automnales et hivernales. Les saisons, donc, printanières et estivales reflètent des périodes de repos (développement). C'est sur cette base que nous avons procédé à la transplantation des cages de moules dans les deux sites portuaires impactés d'Oran et de Mostaganem entre Mai et Juin 2007.

III. Stratégie d'échantillonnage :

1. Choix du matériel biologique :

Le modèle biologique utilisé pour cette étude est la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* en raison de son implantation naturelle, de la facilité d'approvisionnement dans nos zones d'étude, de sa robustesse au transport et de son statut éco-biologique caractérisé par ses capacités de bioaccumulation des contaminants intégrant parfaitement une pollution locale; mais aussi, pour son intérêt ascendant dans les programmes de surveillance environnementale où elle a été proposée comme espèce bioindicatrice à l'échelle mondiale par GOLDBERG dès 1975 (*in* CASAS, 2005).

2. Collecte des échantillons références :

Le lot de moules destiné à la transplantation est originaire d'une moulière naturelle située au niveau de la pointe de l'Aiguille, à l'extrême Est du site de Kristel (Fig. 20).

Les moules ont été collectées à une profondeur de 2 mètres où elles adhéraient à un substrat rocheux. Une fois ramenées sur la terre ferme, elles ont été transportées au laboratoire, dans une glacière étanche et hermétique remplie d'eau de mer propre à l'emplacement où l'échantillonnage a été fait.

Pour garantir l'homogénéité des lots, une taille de 50mm, correspondant à des jeunes adultes d'environ 18 à 24 mois (ANDRAL & ALZIEU, 2004); période pendant laquelle le métabolisme est stable (RNO, 2006).

3. Mise en stabulation des moules :

Les moules sauvages récoltées sont rapidement transférées dans un aquarium rempli d'eau de mer filtrée et aérée (25°C ; 35‰) pour une phase de stabulation afin de réduire l'effet du stress dû au transport avant les opérations de transplantation des cages et même avant le prétraitement des échantillons en vue de l'analyse biochimique (Fig. 25).



Fig. 25 : Moules en phase de stabulation.

4. Opérations de mouillage (transplantation) des filets à moules :

Pour procéder à la transplantation, il a fallu suivre les étapes suivantes :

- Fabrication des filets en s'inspirant du modèle utilisé par le Réseau Intégrateurs Biologiques (RINBIO, France).
- Autorisations pour les mouillages auprès des autorités portuaires (gardes côtes, administrations portuaires).
- Planification et organisation des campagnes de transplantations.

a. Filets expérimentaux :

Les filets expérimentaux (Fig. 26) sont constitués de deux filets en plastique de maille de 3 cm, cousus l'un avec l'autre de manière à former une poche de dimension 33,5 x 53,5 cm. Cette poche est rigidifiée par deux tubes PVC de 3,50 cm de diamètre, fendus dans leurs longueurs et enfilés sur les parties supérieure et inférieure de la poche. Les poches sont compartimentées en deux de façon à disposer sur chaque filet deux lots d'échantillons de moules identiques.

Un flotteur de surface, maintient le filet à quelques mètres sous la surface et sert de repère aux filets immergés. Pour empêcher tout risque de déplacement, un lest de 05 kg est attaché aux filets à leur extrémité inférieure par une corde.



Photo : TALEB & BENALI, 2007

Fig. 26 : Filet expérimental pour l'opération de mouillage

b. Lieu et période d'immersion :

Les filets ont été transplantés, respectivement en amont de la jetée du Port d'Oran, à proximité des émissaires des eaux usées des Gênets (Fig. 21 et 22) et à la sortie de la rade portuaire de Mostaganem (Fig. 24), baignant à environ 05 mètres de profondeur.

Il est important de signaler que le mouillage des filets a été effectué près des postes de contrôle des gardes côtes au niveau des deux sites de transplantation (port d'Oran et port de Mostaganem) pour pallier aux pertes possibles liés aux activités de pêches et autres.

Les périodes d'immersion se sont étendues du 20 Mai au 09 Juin 2007 pour les deux populations transplantées.

c. Récupération des filets :

Sur les sites de transplantation, les moules ont été dégrappées, triées en séparant les individus morts (coquilles ouvertes ou vides) des individus vivants pour déterminer le taux de mortalité au niveau de chaque filet.

Les moules sont transportées au laboratoire dans une glacière remplie d'eau de mer pour traitement. Un lot de 10 individus est sélectionné au hasard pour chaque station ; ce dernier est prévu pour le calcul de l'indice de condition. Un second lot de 10 individus a été mis à part pour le prélèvement des organes en vue des dosages biologiques.

Par ailleurs, et pour donner un autre point de comparaison dans cette présente étude en terme d'évaluation du degré de stress environnemental, particulièrement au niveau du port d'Oran en raison de la présence d'une grande quantité de moules endogènes sur toute la ceinture de la digue longeant le port d'Oran (Fig. 27), un prélèvement d'un échantillon de moules a été effectué à l'endroit même du mouillage du filet, en vue d'étudier passivement l'impact des contaminants sur la population endogène au port d'Oran (biosurveillance passive).



Photo : TALEB & BENALI, 2007

Fig. 27: Moules (*Mytilus gallorprovincialis*) indigènes du port d'Oran.

IV. Traitements des échantillons et détermination de l'indice de condition :

Les indices de conditions constituent de bons indicateurs de l'état physiologique et de la croissance, notamment chez la moule (RINBIO, 2001). Les résultats acquis dans le cadre du programme de surveillance RINBIO ont permis de vérifier qu'une relation entre l'indice de condition et la concentration en contaminants existait, quelque soit le secteur et les contaminants mesurés (ADRAL & ALZIEU, 2004). Dans une étude de suivi environnemental telle que la notre, ces indices permettent d'évaluer la présence ou non de déviations par rapport à une croissance normale. L'indice de condition est la manifestation des altérations biochimiques et physiologiques exprimées au niveau de l'organisme (GOEDE & BARTON, 1990).

L'indice de condition a été mesuré sur 10 individus pour chaque site d'échantillonnage en utilisant le rapport (poids du tissu mou + liquide palléale / poids total du spécimen) multiplié par 100 (AMIARD *et al.*, 1998b).

Pour éviter une éventuelle dégradation biologique des organes à analyser (branchies, glande digestive et homogénats d'organes), les échantillons ont été maintenus à une température de 4°C lors des prélèvements, puis conservés dans de l'azote liquide (-196°C) et stockés à -80°C jusqu'à l'analyse biochimique.

V. Méthodologie analytique :

1. Préparation de la fraction S9 :

Les tissus sont broyés et homogénéisés dans du tampon phosphate de sodium à 0,02M, pH 7 + 0,1% Triton X100³, dont le rapport de suspension est de 1 : 4 (poids : volume ; g : ml) à l'aide d'un homogénéisateur Ultraturax. L'homogénéisation a été effectuée dans des tubes Nalgène maintenus dans de la glace pour respecter la chaîne de froid de 4°C.

L'homogénat obtenu est centrifugé à 9000g durant 20 min à une température de 4°C. Le surnageant issu de la centrifugation (dénommé fraction S9) contient les cholinestérases solubilisées. Celui-ci est stocké à -80°C avant le dosage enzymatique.

2. Dosage des protéines :

L'activité spécifique d'une enzyme est toujours exprimée par rapport à une quantité de protéine. Pour cette raison, il nous a fallu doser la quantité des protéines au niveau de nos échantillons. L'activité d'AChE est exprimée en nanomoles de substrat hydrolysées par minute et par milligrammes de protéines (nmoles/ mn/ 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 Coomassie⁴ sur les groupements cationiques des protéines. Nous avons réalisé avec le sérum d'albumine bovine SBA (Sigma-Aldrich) comme protéine standard, une courbe étalon à six points de concentrations croissantes (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,4 ; 2 mg SBA/ml).

Nous avons suivi les étapes ci-dessous, pour le dosage des concentrations en protéines au niveau des échantillons des différents organes ciblés :

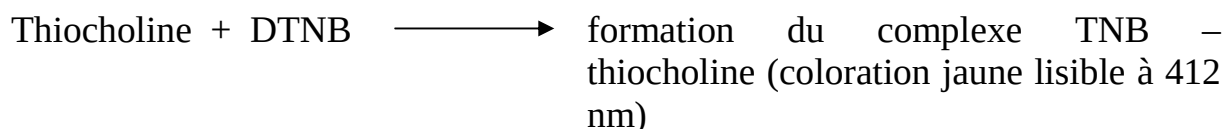
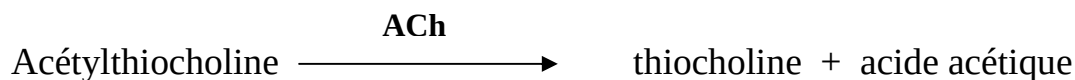
- 0,1 ml de chacun de nos échantillons et les solutions filles de BSA sont mélangés à 3ml de réactif de Bradford pour un volume final de 3,1 ml.
- Après une incubation de 5 à 45 minutes, ce mélange est transféré dans des cuves à spectrophotomètre.
- A l'aide du spectrophotomètre UV/Visible (Genesis), la lecture de l'absorbance se fait à une longueur d'onde $\lambda = 595$ nm.

³ Triton X100 est un détergent qui permet la solubilisation des protéines membranaires (BOCQUENE & GALGANI, 2004).

⁴ Le bleu de coomassie G250, s'associe aux protéines, en particulier sur les groupes aminés et arginines, en modifiant son spectre d'absorption de façon à former une bande intense dont le maximum est à 595 nm.

3. Mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase :

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 -l'acéthylthiocholine - suivant la cinétique :



Dans des conditions d'excès de substrat, l'apparition de la thiocholine est proportionnelle à l'activité enzymatique. 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 d'AChE (BOCQUENE & GALGANI, 2004).

La cinétique est suivie pendant 20 min ; 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 7,5.
- 50 µl du DTNB (Sigma-Aldrich) à 1,875mM sont ajoutés au mélange.
- Après une incubation de 5 à 10 min, l'introduction de 50 µl du substrat acéthylthiocholine iodide (ACTC) (Sigma-Aldrich) à 8,25mM déclenche la réaction enzymatique.

4. 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 (BOCQUENE & GALGANI, 2004), l'activité spécifique de l'AChE est exprimée en nanomoles de substrat hydrolysées rapportée par rapport à la teneur des protéines brutes (mg/ml) dans l'extrait de l'échantillon d'organe.

Exemple :

50 µl de l'extrait de branchies donnent une activité brute de 0,094 Δ DO/min. La concentration en protéine dans l'extrait est de 3,53 mg/ml (3,53 µg/µl). 50µl de l'extrait contiennent : $50 \times 3,53 = 176,34 \text{ µg} = 0,176 \text{ mg}$. L'activité spécifique est $(0,094/0,176) \times 75 = 39,98 \text{ nmoles/min/mg prot.}$

VI. Traitements statistiques :

Les variations de l'indice de condition des moules et de l'activité de l'AChE au niveau des organes cibles de *Mytilus galloprovincialis* (branchies, glande digestive et homogénat) ont été statistiquement comparées par l'analyse de variance à sens unique ANOVA (test de Duncan). La différence est significative à un 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 discussions

I. Paramètres physico-chimiques :

Au niveau des trois sites d'études (Tableau 8), on remarque que les valeurs d'oxygène dissous diffèrent; les faibles taux retrouvés dans le port d'Oran nous renseignent sur une éventuelle pollution organique, ceux-ci sont proportionnels à une turbidité prononcée par rapport au site de référence Kristel et à l'alcalinité du milieu. Les caractéristiques physico-chimiques mesurées au niveau du port de Mostaganem semblent aller dans le même sens que ceux retrouvés dans le port d'Oran, mais avec une moindre importance. Les eaux de Mostaganem ont enregistré une température légèrement plus élevée que celle retrouvée au niveau du port d'Oran et dans notre site de référence Kristel. La salinité reste, toutefois homogène au niveau des trois sites d'étude.

Tableau 8: Caractéristiques physico-chimiques des sites d'échantillonnage.

Sites	Dates	Zone	Temp. (°C)	Salinité (‰)	O ₂ dissous (mg/l)	pH	Turbidité (NTU)
Kristel	19-05-2007	Est de la baie d'Oran	22,9	39	8,1	8,23	1,04
Port d'Oran	09-06-2007	Baie d'Oran	24,5	38,5	6,70	7,99	1,40
Port de Mostaganem	09-06-2007	Golfe d'Arzew	25,5	39	5,9	8,06	2,08

II. Statut physiologique :

Le taux de mortalité de *Mytilus galloprovincialis* estimé dans les deux filets après la période de mouillage au niveau des ports d'Oran et de Mostaganem est relativement bas. Pour le lot transplanté au niveau du port d'Oran (de 80 individus), le nombre de mort est de 02, soit un taux de mortalité évalué à 2,5%. Cependant, chez la population du port de Mostaganem, nous avons isolé 06 spécimens morts sur 70 moules transplantées représentant ainsi un taux de mortalité de 8,57%. La survie des spécimens témoigne de la réussite de l'opération de transplantation.

Le calcul de l'indice de condition nous montre que les moules sauvages du port d'Oran possèdent un indice de condition significativement très élevé ($p < 0,01$) par rapport à ceux noté chez la population de moules références de Kristel et celles transplantées au niveau de Mostaganem (Fig. 28). Or les moules immergées au niveau du port d'Oran affichent une différence très significative

($p < 0,01$) de l'indice de condition avec le deuxième lot de transplantation (Fig. 28).

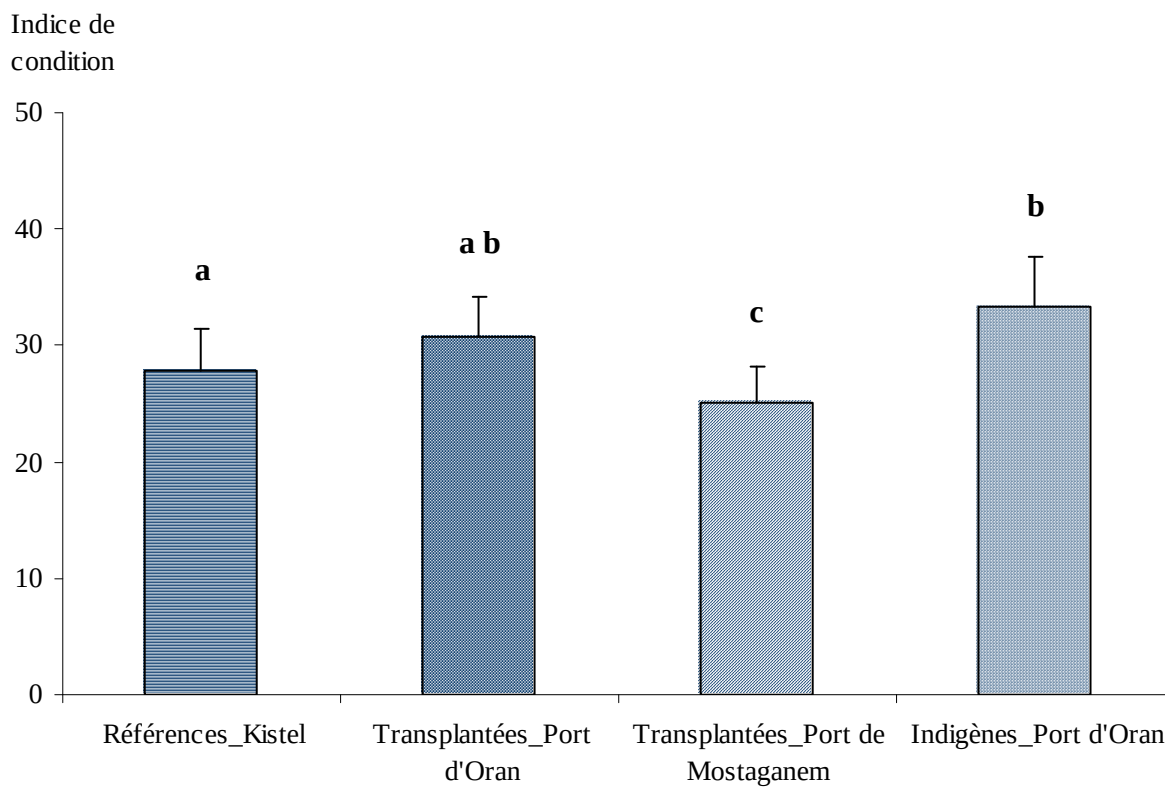


Fig. 28 : Variations de indice de condition des moules *Mytilus galloprovincialis* au niveau des différents sites d'échantillonnages.

$p(a/b) < 0,01$; $p(c/b) < 0,01$; $p(c/ab) < 0,01$

Les résultats acquis dans le cadre du projet RINBIO (2001), ont permis de vérifier que la liaison indice de condition/concentration en contaminant était concrète quelque soit le secteur et les contaminants mesurés. Dans note cas, les valeurs significativement élevées de l'indice de condition des moules indigènes du port d'Oran et même de la population transplantée au niveau de ce site portuaire à comparer avec les autres populations de moules peuvent s'expliquer par l'exposition chronique des moules aux apports de la matière organique charriée par les eaux urbaines issues des émissaires des Genêts et la disponibilité des nutriments en plus des facteurs saisonniers (maturité sexuelle) (ROMEO et *al.*, 2003). Par contre, la transplantation ne semble pas avoir changé significativement ($p < 0,05$) le poids somatique des moules après leur période de mouillage dans les deux sites portuaires.

Une augmentation du poids somatique chez les moules peut être également due au bloom phytoplanctonique printanier où la nourriture pour les

organismes marins est plus disponible et abondante (ROMEO et *al.*, 2003). En effet, les données de l'IC des moules *M. galloprovincialis* issues de la campagne annuelle de biosurveillance passive réalisée au niveau du port d'Oran (BENGHALI, 2006 ; TALEB et *al.*, 2007a et b) semblent confirmer ce constat avec des valeurs maximales de l'IC notées pendant les périodes chaudes (juillet et avril) caractérisées par des valeurs élevées des concentrations du biotope en chlorophylle *a* par rapport aux deux autres périodes de l'année (octobre et janvier). De plus, les dosages de la chlorophylle *a* et des phéopigments, reflétant l'état et la qualité de la biomasse phytoplanctonique et, par conséquent de la production primaire au niveau du port d'Oran (BOURAGBA-BENAZZA, 2006 ; BOURAGBA-BENAZZA et *al.*, 2006 ; TALEB et *al.*, 2006) ont montré une diminution significative des valeurs entre les saisons estivales et automnales. Ceci peut également expliquer la faible régression de l'IC observée chez la population de moules sauvages prélevée au niveau de la pointe de l'Aiguille (site de Kristel) qui est un emplacement ouvert, après la période de mouillage effectuée dans l'enceinte portuaire de Mostaganem.

III. Activité de l'Acétylcholinestérase :

La concentration la plus élevée de l'AChE qui est de 43,61 nmoles/min/mg prot. est retrouvée au niveau des branchies des moules sauvages de Kristel, tandis que la valeur minimum 5,52 nmoles/min/mg prot. a été enregistrée au niveau de la glande digestive de cette même population une fois transplantée au niveau du site portuaire d'Oran. Globalement, les concentrations de l'AChE varient de 9,89 nmoles/min/mg prot. à 43,61 nmoles/min/mg prot. au niveau des branchies, de 5,69 nmoles/min/mg prot. à 11,55 nmoles/min/mg prot. au niveau de la glande digestive et de 5,52 nmoles/min/mg prot. à 14,99 nmoles/min/mg prot. au niveau de l'homogénat.

Les tests statistiques enregistrent chez les moules transplantées au port d'Oran une inhibition hautement significative ($p < 0,01$) de l'activité de l'AChE au niveau des branchies et significative ($p < 0,05$) au niveau de la glande digestive et de l'homogénat à comparer avec la population des moules référence (Fig. 29). Néanmoins, cette enzyme affiche chez les moules transplantées au port de Mostaganem une différence très significative ($p < 0,01$) seulement au niveau des branchies.

Afin d'affiner le niveau d'activité de ce biomarqueur entre les différents sites étudiés, le traitement statistique a révélé une inhibition très significative ($p < 0,01$) de cette enzyme au niveau des branchies, et significative dans la glande digestive et l'homogénat des moules sauvages du port d'Oran en comparaison avec les moules du site de référence de Kristel (Fig. 29).

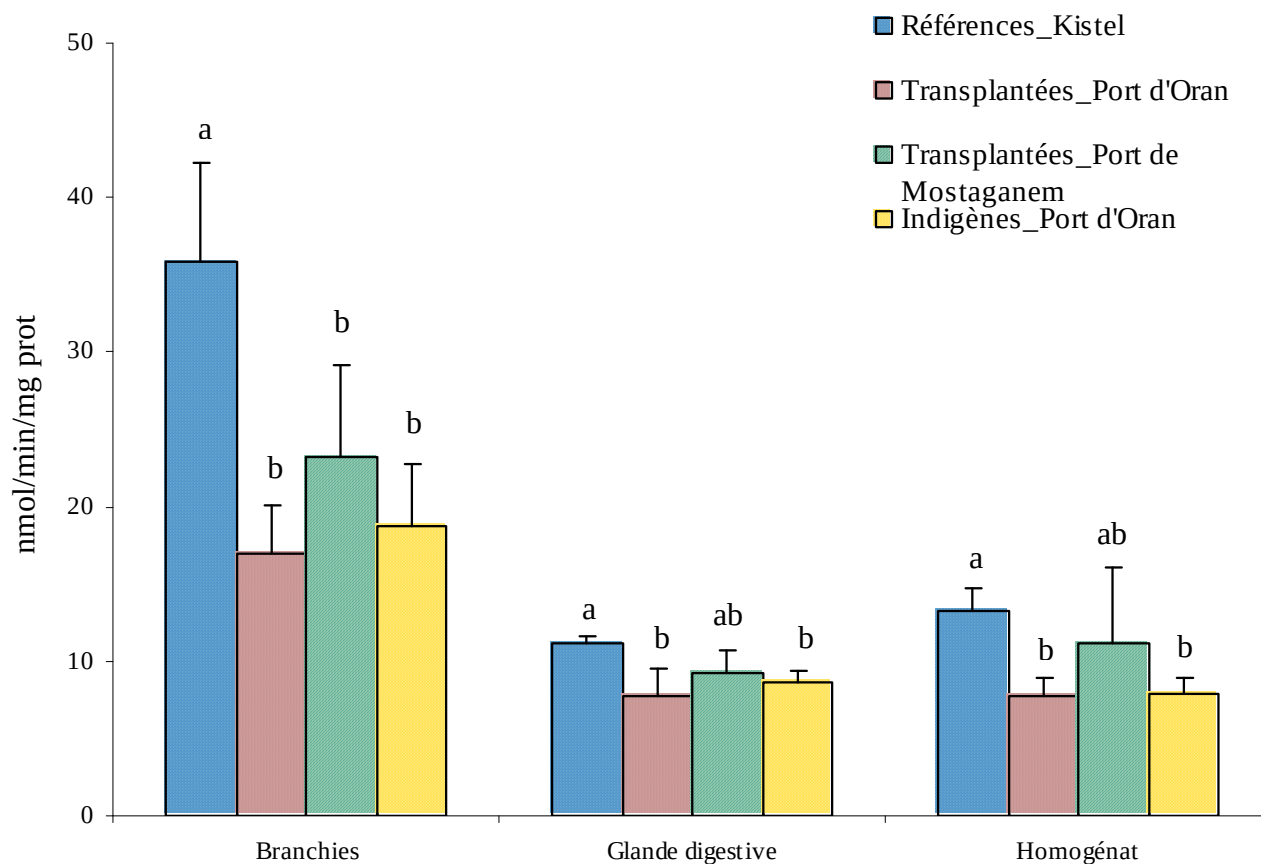


Fig. 29 : Activité de l'AChE (nmoles/min/mg prot) des moules de Kristel et des ports d'Oran et de Mostaganem, Les moyennes $\pm$ ES marquées par des mêmes lettres indiquent des différences non significatives (test de Duncan) ($p > 0,05$).

LAU et *al.* (2004) ne relèvent aucune différence significative de l'activité de l'AChE entre les moules (*Mytilus edulis*) de grande et de petite taille provenant des sites pollués et ceux de référence tout au long de l'année. Ils affirment que la taille n'est pas un facteur important affectant les réponses biochimiques. LIONETTO et *al.* (2003) décrivent également qu'il n'existe aucune corrélation significative entre l'action spécifique de l'AChE et la longueur de la coquille chez *Mytilus galloprovincialis*. De même, GALGANI et *al.* (1992) et KIRBY et *al.* (2000) n'ont observé aucune influence du sexe chez le poisson *Platichthys flesus* sur l'activité de l'AChE. Aussi, les résultats de BENGHALI (2006) et TALEB et *al.* (2007a et b) ne révèlent pas non plus d'augmentation significative de la taille des spécimens avec la variation de l'activité de l'AChE chez *Mytilus galloprovincialis* du port d'Oran. Ceci nous a permis d'avoir une flexibilité beaucoup plus grande dans les opérations d'échantillonnage de notre modèle biologique.

Les résultats de LAU et *al.* (2004) suggèrent que les branchies ont une réponse biologique plus sensible aux biomarqueurs par rapport aux autres tissus.

Selon ces auteurs, la localisation des réponses biochimiques se trouve au niveau des branchies. Ce système branchial sert de ligne de front au contact avec des contaminants potentiels, comme une première ligne de défense. Cette localisation importante de l'activité de l'AChE dans les branchies comparée à d'autres tissus (glande digestive, muscle, manteau et l'animal en entier) chez *Mytilus galloprovincialis* a été démontrée (NAJIMI et al., 1997, MORA et al., 1999 ; VALBONESI et al., 2003 ; BODIN et al., 2004 ; LAU et al., 2004).

La réponse de l'AChE est proportionnelle aux niveaux de contamination par les pesticides dans l'environnement aquatique (LIONETTO, 2003). Nos résultats chez les moules transplantées au niveau du port d'Oran, suggèrent la présence d'une réponse induite par des produits chimiques anticholinestérasiques. En effet, la valeur la plus basse de l'activité de cette enzyme a été enregistrée au niveau de ce site côtier exposé continuellement aux affluents urbains et industriels non traités. Il est fort probable que ces rejets apportent avec eux une vaste lignée de polluants et parmi eux plus d'oligo-métaux que des organophosphorés, puisque ce secteur n'est pas influencé par les activités agricoles. Dans cette optique, les travaux de TALEB & BOUTIBA (2007) (sous presse) ont démontré l'importance des variations des niveaux de bioaccumulation des métaux Zn, Cd, Pb, Cu, Ni, Fe et Mg par *M. galloprovincialis* du port d'Oran. Par ailleurs, LIONETTO et al. (2003) affirment que l'inhibition de l'AChE par les métaux lourds peut également expliquer la réduction de l'activité enzymatique dans des régions industrialisées et les secteurs portuaires. En effet, de tels métaux peuvent inhiber l'activité de l'AChE chez les poissons (BOCQUENE et al., 1990 ; FLAMMARION et al., 1996 ; BOCQUENE et al., 1997), chez les moules (NAJIMI et al., 1997 ; MORA, 1999 ; LAU & WONG, 2003 ; CASAS, 2005 ; MAGNI, 2006 ; BENGHALI, 2006 ; TALEB et al., 2007a et b) et les palourdes (HAMZA-CHAFFAI et al., 1998) . De même, DEVI & FINGERMAN (1995), LABROT et al. (1996), AMIARD-TRIQUET et al. (1998) et DELLALI et al. (2001), notent qu'une diminution de l'activité de l'AChE peut être une indication d'une pollution métallique.

ESCARTIN & PORTE (1997), démontrent des variations saisonnières de l'activité de l'AChE au niveau de *M. galloprovincialis*. L'activité la plus élevée a été détectée pendant l'hiver et la plus basse en été. Aussi, des variations saisonnières de cette enzyme ont été également trouvées chez la moule verte *Perna viridis*, avec un minimum pendant l'été et un maximum au cours de l'hiver (LAU et al., 2004). En plus des variations saisonnières et alimentaires (EDWARDS & FISHER, 1991 ; ESCARTIN & PORTE, 1997), l'activité de l'AChE peut être modulée par les expositions chroniques aux contaminants chimiques toxiques, ce qui peuvent mener alternativement aux niveaux élevés de l'activité de l'enzyme (THOMPSON et al., 1991). Les travaux de BENGHALI (2006) et TALEB et al. (2007a et b) menés sur *M. galloprovincialis* du port d'Oran

confirment cette variation avec une diminution significative de l'activité de l'AChE au niveau des branchies au mois d'Avril. Dans notre étude, en mettant en parallèle les valeurs de l'activité de l'AChE retrouvées dans le site de référence de Kristel, et ceux enregistrées chez la population de moules indigènes du port d'Oran, nous avons noté une inhibition significative de l'activité de l'AChE au niveau des trois organes ciblés.

Par ailleurs, l'inhibition significative de l'activité de l'enzyme chez les moules transplantées dans le port de Mostaganem est sans doute due aux activités portuaires et industrielles (SELPAP, MITTAL STEEL, SOAPHLOR,...) implantées le long de la frange côtière mostaganémoise. Sans mettre à l'écart également l'importante zone industrielle d'Arzew ; cette inhibition peut être également le résultat d'une présence potentielle de pesticides acheminés par les ruissellements pendant les périodes pluviales contaminant ainsi les eaux marines de la région de Mostaganem notamment ceux transportés par l'oued de la Mactâa à l'Ouest ou l'oued Chellif à l'Est de notre zone d'étude. A cet effet, DELLALI et *al.* (2001) et MOHAMMED et *al.* (2003) ont affiché des diminutions significatives d'activité d'AChE chez les palourdes, particulièrement après des périodes de pluie, accentuant le rôle important du ruissellement sur la contamination des eaux. MCHENERY et *al.* (1997) ont étudié l'exposition de l'enzyme face à différents taux d'exposition à un pesticide organophosphoré le Dichlorvos, et ont conclu que plus les niveaux du pesticide étaient importants et plus l'inhibition était accentuée. Dans le même sens, MORA et *al.* (1999) soulignent que l'activité de l'AChE est inhibée par la présence de pesticides tels que les organophosphorés, les carbamates et quelques métaux lourds chez la moule, ainsi que par la présence d'hydrocarbures (PAYNE et *al.*, 1996 ; KOPECKA et *al.*, 2004), et peut être, donc employé pour détecter ces molécules en eau de mer (GALGANI & BOCQUENE, 1989). Aussi, les travaux de PAYNE et *al.* (1996) démontrent que les huiles usagées, comme celles observées dans les ports d'Oran et de Mostaganem peuvent se comporter comme des inhibiteurs de cholinestérase.

Cependant, on a pu exclure le fait que les variations du biomarqueur pouvaient être la résultante de la différence génétique entre les individus (Romeo et *al.*, 2003) puisque les moules proviennent de la même population sauvage. BOCQUENE et *al.* (1997), décrit que l'activité de l'AChE peut être inhibée par des phycotoxines déchargées dans les colonnes d'eau pendant les périodes du bloom phytoplanctonique. Toutefois, l'effet de l'eutrophisation du milieu peut s'additionner quant aux raisons de l'inhibition de l'enzyme vue les taux bas et moyennement bas d'oxygène dissous retrouvés, respectivement au niveau des deux stations d'étude : le port d'Oran et le port de Mostaganem pendant la période de mouillage.

Conclusion générale

Cette étude nous a permis à l'aide de stratégie expérimentale recommandée dans les programmes de biosurveillance environnementale, de faire le constat de la vulnérabilité de l'écosystème marin algérien face au stress physico-chimique et ceci en utilisant une espèce sentinelle la moule *Mytilus galloprovincialis* et moyennant l'inhibition spécifique de l'AChE comme biomarqueur de polluants neurotoxiques tels que les organophosphorés, les carbamates, les métaux lourds et les hydrocarbures.

De récentes études ont montré que la transplantation des Mollusques d'un emplacement de référence à un secteur pollué, peut être une stratégie pour étudier les effets du changement environnemental due aux contaminants des zones côtières ou d'estuaires. La sélection du lot de moules, leur état physiologique et la période de mouillage sont des critères indispensables que nous avons pris en considération pour la mise en œuvres des opérations de transplantation et de l'assurance de la fiabilité des résultats analytiques.

La présente étude de transplantation d'une population de *Mytilus galloprovincialis* génétiquement uniforme pendant une période de trois semaines, nous a permis d'observer des niveaux inférieurs de l'activité de l'AChE dans les secteurs impactés, les ports d'Oran et de Mostaganem par rapport à la population référence de Kristel, confirmant ainsi la réponse et la sensibilité de l'AChE face aux stress environnemental relatif à la qualité chimique des deux sites portuaires fortement influencée par les apports d'une variété de xénobiotiques charriés par les principaux émissaires des eaux usées urbaines et industrielles (émissaires de Fort Lamoune et des Genêts au port d'Oran; émissaire du port de Mostaganem) ainsi que les ruissellements pendant les périodes pluviales qui représentent une source de composés anticholinestérasiques (organophosphorés et carbamates).

La mesure de l'activité de l'AChE chez *M. galloprovincialis* adoptée dans le cadre de ce travail et utilisée dans de nombreux programmes de *biomonitoring*, nous a fournit une solution rapide, aux moyens acceptables pour les opérations de routine pour les laboratoires de recherche, et fiable pour l'évaluation de l'exposition sub-létale des moules (et potentiellement d'autres invertébrés) aux pesticides organophosphorés et carbamates ainsi qu'aux métaux lourds et aux hydrocarbures. Quand à l'indice de condition, très souvent employé pour qualifier l'état des bivalves, il nous a été un bon indicateur de l'état brut du corps des différentes populations traitées.

Nos résultats montrent que les filets de mouillages des moules ont été soumis à un apport significatif de contaminants. Ainsi, la fiabilité de la technique de transplantation de moules au niveau des sites perturbés devra être représentée entant que méthodologie pour évaluer les apports d'effluents et leurs

impacts à moyen et long termes. Le faible taux de mortalité témoigne quant à lui aussi de la réussite de cette technique.

Nous pensons, à cet effet que l'intégration des biomarqueurs en fonction des variables naturelles et des mélanges chimiques (composés mères et métabolites) dans les habitats naturels spécifiques (baies et embouchures) soit appropriée pour la surveillance future du stress environnemental le long des côtes Ouest algériennes avec une approche multimarqueurs de stress spécifiques ou générales.

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'impacts par le biais de biomarqueurs et les concentrations mesurées en polluants chimiques induisant ces biomarqueurs en eau de mer ou dans les sédiments.

Notre engagement scientifique pour la protection des zones côtières est indispensable pour le maintien de l'homéostasie des écosystèmes marins et la préservation des ressources naturelles inestimables pour les générations futures. Pour cela, il nous faudrait agir inexorablement sur les points suivants :

- Faire de la surveillance 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 conne d'eau et leurs éventuels impacts sur l'écosystème marin.

Références bibliographiques

- **ABADA-BOUDJEMA, Y. M. & MOUËZA, M.** (1981). Structure des populations d'une moulière naturelle en baie d'Alger. *Acta oecologica Ecologia Generalis*, 1, 2, p. 183-194.
- **ABOU-DONIA, M. B.** (2003). Organophosphorus Ester-Induced Chronic Neurotoxicity. *Archives of Environmental Health* v.58, n.8, 1Aug 03.
- **AEE** (1999). Agence européenne de l'environnement.
- **AH-PENG, C.** (2003). Mise au point d'un outil diagnostic 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.
- **ALG** Projet national ALG/98/G31, (mars 2001). Elaboration de stratégie et du plan d'action national des changements climatiques. Communication nationale initiale.
- **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.
- **AMIARD, J. C., GEFFARD, A, AMIARD-TRIQUET, C.** (1998b). La métallothionéine chez la moule *Mytilus edulis* comme biomarqueurs de pollution métallique: variabilité entre sites, saisons et organes. *J. Rech. Océanogr.* 23, p. 25–30.
- **AMIARD-TRIQUET, C., ALTMANN, S., AMIARD, J.C., BALLAN-DUFRANC, AIS, C., BAUMARD, P., BUDZINSKI, H., CROUZET, C., GARRIGUES, P., HIS, E., JEANTET, A.Y., MENASRIA, R., MORA, P., MOUNEYRAC, C., NARBONNE, J.F., PAVILLON, J.F.** (1998). Fate and effects of micropollutants in the Gironde estuary, France: a multidisciplinary approach. *Hydrobiologia* 373/374, p. 259–279.
- **AMIARD-TRIQUET, C. ; GUIRAL, D. & CLAISSE, D.** (1999). Biomonitoring of the marine environment quality: experience of the French National Observation Network (RNO) and the development of biomarkers. Recent progress in marine chemistry and ecotoxicology, Symposium of the Oceanographic Institute.
- **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. & STANISIERE, J. Y.** (1999). Réseaux Intégrateurs Biologiques. RINBIO. Evaluation de la qualité des eaux basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules en Méditerranée: résultats de la campagne 1998, Ifremer. DEL/TL/99-038.
- **ANDRAL, B., STANISIERE, J. Y. & MERCIER, S.** (2001). Réseau Intégrateurs Biologiques. RINBIO. Evaluation de la contamination chimique des eaux basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules en Méditerranée: résultats de la campagne 2000. Ifremer. R.INT.DEL/TL/01-03.
- **ANDRAL, B. & ALZIEU, C.** (2004). Emploi d'une méthode de transplantation de mollusques pour l'évaluation de l'impact des immersions des sédiments drogues. IFREMER. Centre de Toulon. La Seyne sur mer.

- **ANDRAL, B., STANISIERE, J. Y., SAUZADE, D., DAMIER, E., THEBAULT, H., GALGANI, F. & BOISSERY, P.** (2004). "Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging." *Mar. Pollut. Bull.* 49, p. 704 -712.
- **BARILLE, A. L. (1996).** Contribution à l'étude des potentialités conchyliques du Pertuis Breton. Thèse es sciences. Univ. Aix-Marseille II, p. 312.
- **BAYNE, B. L. (1976).** *Marine mussels: their ecology and physiology.* Cambridge University Press, p. 506.
- **BEHRENS, W. J. & J. W. DUEDELL (1981).** "The behaviour of heavy metals in transplanted hard clams, *Mercenaria mercenaria*." *J. Cons. Int. Explor. Mer* 39, p. 223-230.
- **BENGHALI, S. M. E. A. (2006).** Biosurveillance de la pollution marine au niveau de la côte occidentale algérienne par la mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, l'oursin *Paracentrotus lividus* et la patelle *Patella coerulea*. Mémoire de magister. Sciences de l'environnement, p. 83.
- **BERTRAND, P. (2002).** Chef de Service du Service de Protection des Végétaux, DAF Martinique.- Communication personnelle le : 12 /03/2002.
- **BESADA, V., FUMEGA, J. & VAAMONDE, A. (2002).** "Temporal trends of Cd, Cu, Hg, Pb and Zn in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Spanish North-Atlantic coast 1991-1999." *The Science of the Total Environment* 288, p.239-253.
- **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*). *ELSEVIER. Chemosphere* 62, p. 510–519.
- **BISMUTH, C. (1993).** Armes chimiques, description et risques toxiques. *Réanim Urgence* ; 2, p. 625-33.
- **BLANCHET, G., CARPENTIER, P., LALLEMENT, G. (1991).** Vulnérabilité du système nerveux central vis-vis des neurotoxiques organophosphorés. *Méd Amées*; 19, p. 403-7.
- **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., GALGANI, F., WALKER, H. (1997).** Les cholinestérases, Biomarqueurs de neurotoxicité. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. Eds., *Biomarqueurs en Ecotoxicologie _ Aspects Fondamentaux.* Masson, Paris, p. 209-240.
- **BOCQUENÉ, G. & GALGANI, F. (1998).** Biological effects of contaminants: Cholinesterases inhibition by organophosphate and carbamate compounds, *ICES Tech. Mar. Environ. Sci.*, 22, p. 1–13.
- **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-INERIS, p. 28.

- **BOCQUENE, G. & GALGANI, F.** (2004). Les marqueurs biologiques des effets polluants : l'acétylcholinestérase. Ed. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin, p. 28.
- **BOCQUENE, G.** (2002). Bilan ponctuel de la présence et des effets des pesticides en milieu littoral martiniquais en 2002. le Robert : IFREMER, p.39.
- **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.
- **BOENING, D. W.** (1999). "An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metal pollution in marine waters." Environ. Monitoring and Assessment 55, p. 459-470.
- **BOROMTHANARAT, S.** (1986). Les bouchots à *Mytilus edulis* Linnaeus dans l'écosystème estuarien du bassin de Marennes-Oléron (France) : aspects biologique et bioénergétique. Thèse Univ. Aix-Marseille II, p.142.
- **BOURAGBA-BENAZZA, M.** (2006). Impacts des eaux usées de l'agglomération oranaise et des embouchures de Oued Cheliff et de Oued Tafna sur l'écosystème marin côtier occidental algérien. Mémoire de Magister. Département de Biologie, Université d'Oran, Algérie, p. 73.
- **BOURAGBA-BENAZZA, M., Taleb, M. Z. & BOUTIBA, Z.,** (2006). Impacts des eaux usées de l'agglomération oranaise et des embouchures de Oued Cheliff et de Oued Tafna sur l'écosystème marin côtier occidental algérien. Workshop International sur la Gestion Intégrée des Zones Côtières (GIZC) : problèmes et perspectives. 11, 12 et 13 Décembre 2006, ISMAL, Alger.
- **BRADFORD, M.** (1976). A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding. Anal. Biochem. 772, p. 242– 264.
- **BRETAUD, S.** (2001). Effets du carbofuran sur l'activité de l'acétylcholinestérase cérébrale et sur l'activité de la nage chez *Carassius auratus* (Cyprinidae). Cybium, 25(1), p. 33-40.
- **BUAT-MENARD, P., M. ARNOLD, D. BARON, H. BERNARD ET R. CHESSELET** (1980). "Particulate traces metal chemistry in the open ocean and the Western Mediterranean: a comparative study." Ves. Journées Etud. Pollutions, Cagliari, CIESM, p. 1005-1039.
- **BUEGE, J.A. & AUST, S.D.** (1978). Microsomal lipid peroxydation. *Meth. Enzym.* 50, p. 302-310.
- **BUESTEL, D.** (1997). Croissance et conditions des moules *Mytilus galloprovincialis* dans quelques sites caractéristiques de Méditerranée., Atelier RINBIO. Ifremer, DEL/DRV.
- **BUFFAT, J. J., BONSIGNOUR, J. P., RICORDEL, I., DIRAISON, Y.** (1989). Toxicité des " gaz " de combat. In : JEPU, 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.

- **BUTLER, P. A., ANDREN, L., BONDE, G. J., JERNELOV, A. & REISCH, D. J.** (1971). Monitoring organisms. FAO Conference on marine pollution and its affects on living resources and fishing. Rome, FAO fisheries report 99, Suppl. 1, p. 101-112.
- **CABANE, F.,** Aôt (2007). LEXIQUE, d'écologie, d'environnement et d'aménagement du littoral. Version 13. IFREMER. Documentation sur l'Environnement et de l'Aménagement du Littoral, p. 283.
- **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.
- **COSSA, D. & RONDEAU, J. G.** (1985). Seasonal, geographical and size-induced variability in mercury content of *M. edulis* in an estuarine environment: a reassessment of mercury pollution level in the estuary and gulf of St Laurent. Mar. Biol. (88), p. 43-49.
- **COSSA, D. & LASSUS, P.** (1989). le cadmium en milieu marin, biogéochimie et ecotoxicologie. Etude en soutien à la définition des normes. édition Ifremer, Brest, France, p. 111.
- **COSSA, 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.
- **CLAISSE, D., JOANNY, M. & QUINTIN, J. M.** (1992). "The French marine pollution monitoring network (RNO)." Analysis (Masson, Paris) 20(6), p. 19-22.
- **CLAISSE, D.** (1989). "Chemicals concentration of french coast: the result of ten year mussel watch." Mar. Pollut. Bull. 20, p. 523-528.
- **CLAISSE, D., COSSA D., BRETAUDEAU-SANJUAN, J., TOUCHARD, G. & BOMBLED, B.** (2001). "Methylmercury in molluscs along the French coast." Mar. Pollut. Bull. 42(4), p. 329-332.
- **COUILLARD, Y., CAMPBELL, P.G.C., TESSIER, A., PELLERIN-MASSICOTTE, J. & AUCLAIR, J.-C.** (1995). Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis* across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, Zn) concentrations in soft tissues. Can. J. Fish. Aquat. Sci., sous presse.
- **DA ROS, L., MENEGHETTI, F., NASCI, C.** (2002). Field application of lysosomal destabilisation indices in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: biomonitoring and transplantation in the lagoon of Venice (north– east Italy). Mar. Environ. Res. 54, p. 817– 822.
- **DAMIENS, G., HIS, E., GNASSIA-BARELLI, M., QUINIOU, F. & ROMEO, M.** (2004). Evaluation of biomarkers in oysters larvae in natural and polluted conditions.

- ELSEVIER. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 138 (2), p. 121-128.
- **DARE, P.J.** (1976). Settlement, growth and production of the mussel *Mytilus edulis* (L) in Morecambe bay. *Fish. Invest. Ministr. Agri. Fish. Food*, GB., Ser. II, 28, I, 25 p.
 - **DARACOTT, A. & WATLING, H.** (1975). "The use of molluscs to monitor cadmium levels in estuaries and coastal marine environments." *Trans. R. Soc. S. Afr.* 41, p. 325-338.
 - **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.
 - **DEHNEN, W., TOMIGAS, R., ROOS, J.** (1973). A modified method for the assay of benzo(a)pyrene hydroxylase. *Anal. Biochem.* 53, p. 373-383.
 - **DELLALI, M., GNASSIA BARELLI, M., ROMEO, M., AISSA, P.** (2001). The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. *ELSEVIER. Comparative Biochemistry and Physiology Part*, p. 227-235.
 - **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.
 - **DEVI, M., FINGERMAN, M.**, (1995). Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red Swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, by mercury, cadmium and lead. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55, p. 746-750.
 - **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.
 - **EDWARDS, C.A. & FISHER, S.W.** (1991). The use of cholinesterase measurements in assessing the impacts of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates. *In: Mineau, P. (Ed.), Cholinesterase Inhibiting Insecticides, Their Impact on the Environment.* Elsevier, Amsterdam, p. 255-275.
 - **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.
- **ESCARTIN, E. & PORTÉ, C.** (1997). The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, p. 2090– 2095.
- **FAO** (1986). International code of conduct on the distribution and use of pesticides. Rome, Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, p.28.
- **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).
- **FAO FISHERY STATISTICS** (2002).
http://www.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=culturespecies&xml=Mytilus_galloprovincialis.xml
- **FISHER, W., BAUCHOT, M. L. & SCHNEIDER, M.** (1987). Fiches FAO d'identification des especes pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Vol 1. Végétaux et Invertébrés. Publication FAO et comission de communautés européennes. Rome, FAO, Vol. 1, p. 760.
- **FLAMMARION, P., MIGEON, B., GARRIC, J.** (1996). Joint effect of copper sulfate and methidathion on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. EROD and AChE activities. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 440-445.
- **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.
- **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 ROS-mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *ELSEVER. Marine Environmental Research* 58, p. 609–613.
- **FUNG, C. N., LAM, J. C. W., ZHENG, G. J., CONNELL, D. W., MONIRITH, I., TANABE, S., RICHARDSON, B. J. & Lam, P. K. S.** (2004). "Mussel-based monitoring of trace metal and organic contaminants along the east coast of China using *Perna viridis* and *Mytilus edulis*." *Environ. Pollut* 127(2), p. 203-216.
- **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.
- **GAUROY, P.** (1972). *Le monde animal au laboratoire. Manuel de travaux pratiques de sciences naturelles*. Pierron-editeur, p. 217.
- **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.
- **GENEVOIS, C., PFOHL-LESZKOWICZ, A., BOILLOT, K., BRANDT, H., CASTEGNARO, M.** (1998). Implication of cytochrome P450 1A isoforms and the Ah receptor in the genotoxicity of coal-tar fume condensate and bitume fumes condensates. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 5, p. 283-294.
- **GIAM, C.S. & L.E. RAY, EDS** (1987). *Pollutant studies in marine animals*. Boca Raton, Fla, CRC Press, p. 187.
- **GOEDE, R.W. & BARTON, B.A.** (1990). Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. *Am. Fish. Soc. Symp.* 8, p. 91-108.
- **GOLDBERG, E. D.** (1980). *The International Mussel Watch*. National Academy of Sciences, Washington, DC.
- **GRASSE, P. P., POISSON, R. A. & TUZET, O.** (1961). *Zoologie. Invertébrés I. Précis de sciences biologiques*. Masson et Cie Editeurs, p. 919.
- **GRENNWALD, R.A.** (1985). *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- **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.
- **HAMZA-CHAFFAI, A., ROMEO, M., GNASSIA-BARELLI, M., EL ABED, A.** (1998). Effect on copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, p. 397-404.
- **HARVEY-GIRARD, E.** (2005) "Portrait de neurone." *Apterone*. Ed. Erik Harvey-Girard. Ottawa: Août2005. <http://www.apteronote.com/revue/neurone/printer77.shtml>.

- **HAWKINS, A. J. S. & BAYNE, B. L.** (1992). Physiological interrelations and the regulation of production. The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. E. Gosling, Elsevier, Amsterdam, p. 171- 222.
- **HAYNES, D. & TOOHEY, D.** (1998). "The use of transplanted cultured mussels (*Mytilus edulis*) to monitor pollutants along the Ninety Mile Beach, Victoria, Australia III. Heavy metals." *Marine Pollution Bulletin* 36(5), p. 396-399.
- **HAYNES, D., MOSSE, P. & LEVAY, G.** (1995). "The use of transplanted cultured mussels (*Mytilus edulis*) to monitor pollutants along the ninety mile beach, Victoria, Australia I. Extractable Organohalogenes (EOX)." *Mar. Pollut. Bull.* 30(7), p. 463-469.
- **HEBBAR, C.** (2005). Surveillance de la qualité bactériologique des eaux de baignade - Cas des plages d'Aïn-Franin et de Kristel – Magister en sciences de l'environnement et climatologie. Faculté des sciences, Université D'ORAN / ES-SENIA.
- **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.
- **HYOTYLANEN, T., KARELS, A., OIKARI, A.** (2002). Assessment of bioavailability and effects of chemicals due to remediation actions with caging mussels (*Anodonta anatina*) at a creosote-contaminated lake sediment site. *Water Res.* 36, p. 4497– 4504.
- **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.
- **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). *ELSEVIER. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 297, p. 253– 268.
- **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.
- **IDHALLA M., BOUHAIMIL, A., ZEKHNINI, A., NARBONNE, J. F., MATHIEU, M. & MOUKRIM, A.** (1997). Etude du cycle de reproduction de deux espèces de moules *Perna perna* (Linné, 1758) et *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) dans la baie d'Agadir (Sud du Maroc). *Halietis* 26, p. 51-62.
- **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.
- **JOANNY, M.; BELIN, C.; CLAISSE, D.; GROUHEL, A. & MOISSEC, L.** (1994). "Assesment of the French littoral zone through biological monitoring." *Equinoxe* 47-48, p. 10-19.

- **KANTIN, R. & PERGENT, G.** (2004). Groupement de recherche. Gestion des écosystèmes littoraux méditerranéens. Rapport octobre 2004. IFREMER, p. 156.
- **KALPAXIS, D. L., THEOS, C., XAPLANTERI, M. A., DINOS, G. P., CATSIKI, A. V. & LEOTSINIDIS, M.** (2004). "Biomonitoring of Gulf of Patras, N. Peloponnesus, Greece. Application of a biomarker suite including evaluation of translation efficiency in *Mytilus galloprovincialis* cells." *Environmental Research* 94, p. 211-220.
- **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.
- **KOCK DE, W. C.** (1983). "Accumulation of cadmium and PCBs by *Mytilus edulis* transplanted from pristine water into polluted gradient." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40 (sup 2), p. 282-294.
- **KOCK DE, W. C. & H. VAN HET GROENEWOUD** (1985). Modelling bioaccumulation and elimination dynamics of some xenobiotic pollutants (Cd, Hg, PCB, HCB) based on "in situ" observations with *Mytilus edulis*. TNO report. The Hague, p. 68-79.
- **KOCK DE, W. C.** (1986). "Monitoring bio-available marine contaminants with mussels (*Mytilus edulis*) in the Netherlands." *Environ. Monitoring and Assessment* 7, p. 209-220.
- **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.
- **LABROT, J., RIBERA, D., SAINT-DENIS, M., NARBONNE, J.F.** (1996). In vitro and in vivo study of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase and glutathione peroxidase activities in three non mammalian species. *Biomarkers* 1, p. 21-28.
- **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.** (2003). Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *ELSEVER. Marine Pollution Bulletin* 46, p. 1563–1572.
- **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. *ELSEVER. Continental Shelf Research* 24, p. 1969-1987.

- **LAURENT, M.** (Novembre 1993). Mosta, le lien des enciens de Mostaganem. Bulletin n°4, p. 28.
- **LAWSON A. A. & BARR R. D.** (1987). Acetylcholinesterase in red blood cells. *American Journal of Hematology*, 26, p. 101-112.
- **LIONETTO, M.G., CARICATO, R., GIORDANO, M.E., PASCARIELLO, M.F., MARINOSCI, L., SCHETTINO, T.** (2003). Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. PERGAMON. Marine Pollution Bulletin 46, p. 324–330.
- **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.
- **LUBET, P.** (1959). Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les pectinidés (Moll. Bival). *Rev. Trav. Inst. Pêche Marit.* 23, 4, p. 389-548.
- **LUBET, P.** (1963). Physiologie des moules. *Bull. Soc. Sci. Vét. Med. Comp.* Lyon, 65, 1, p. 31-62.
- **LUBET, P.** (1973). Exposé synoptique des données biologiques sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lmk., 1819). *Synop. F.A.O. Pêche* 88.
- **LUBET, P.** (1981). Action de la température sur le cycle de reproduction des lamellibranches. *Extrait Bull. Soc. Zool. France* 106, 3, p. 283-291.
- **LUBET, & ALOUI** (1987). Limites létales thermiques et action de la température sur la gametogenèse et l'activité neurosécrétoire chez la moule (*M. edulis* et *M. galloprovincialis*), mollusque bivalve. *Halictis* 16, p. 309-316.
- **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.
- **MAGNI, P., DE FALCO, G., FALUGI, C., FRANZONI, M., MONTEVERDE, M., PERRONE, E., SGRO, M., BOLOGNESI, C.** (2006). Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). ELSEVER. Environmental Pollution 142, p. 65-72.

- **MARKLUND, S., MARKLUND, G.** (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, p. 169– 479.
- **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.
- **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.
- **MASSABUAU, J. C.** (2004). Les activités ventilatoire, un facteur clé dans les processus de bioaccumulation chez le bivalve. Les journées contamination décontamination des mollusques bivalves. IFREMER- Nantes 26-27 mai 2004.
- **MATOZZO, V., TOME, A., GABRIELLA, M. M.** (2005). Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *ELSEVER. Marine Pollution Bulletin* 50, p. 1686–1693.
- **MAYER, F.L., VERSTEEG, D.J., MAC KEE, M.J., FOLMAR, L.C., GRANEY, R.L., MAC CUME, 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 DONALD, J. H. & KOEHN, R. K.** (1991). Allozymes and morphometric characters of 3 species of *Mytilus* in the Northern and Southern hemispheres. *Mar. Biol.* 111, p. 323-333.
- **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.
- **MINIER , C. & MOORE, M.N.** (1996). Induction of multixenobiotic resistance in mussel blood cells. *Mar. Environ. Res.* 42, p. 389-392.
- **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.
- **MOHAMED, B., RYM, B.D., AMOR, E.A., HAMADI, B.** (2003). Genotoxicity, catalase, and acetylcholinesterase in the assessment of the pollution status of some sites on the Tunisian littoral. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70, p. 854–860.
- **MONIQUA,** (2005). Programme interreg III A Sardaigne/Corse/TOSCANE. Rapport d'activité 2004. Région Corse. IFREMER, p. 84.

- **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.
- **NACIRI, M.** (1997_1998). Dynamique d’une population de moules, *Mytilus galloprovincialis* (LmK), vivant sur la côte atlantique marocaine. *Bulletin de l’Institut Scientifique, Rabat*, n°21, p.43-50.
- **NAKHLE, K. F.** (2003). Le mercure, le cadmium et le plomb dans les eaux littorales libanaises : Apports et suivi au moyen de bioindicateurs quantitatifs (Eponges, bivalves et gastéropodes). Thèse de doctorat. Interactions toxiques dans les écosystèmes. Université Paris 7, p. 246.
- **NAJIMI, S., BOUHAIMI, A., DAUBEZE, M.** (1997). Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution of Agadir marine bay South of Morocco.. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, p. 901-912.
- **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., MONTEDURO, R. A., DA ROS, L.** (2002). Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring in the Lagoon of Venice (NE Italy). *Mar. Environ. Res.* 54, p. 811–816.
- **NEWELL, R.C.** (1989). Biology of intertidal animals. *Marine Ecological Surveys Ltd.*, Faversham, U.K., p. 781.
- **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.** (2002). Ecophysiological aspects of cardiac activity in the subtropical mussel *Perna viridis* (L.) (Bivalvia: Mytilidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*; 267, p. 207–22.
- **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.** (2003b). Lysosomal membrane stability, phagocytosis and tolerance to emersion in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) following exposure to acute, sublethal, copper. *Chemosphere*; 52, p. 1147– 51.
- **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.
- **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). mRNA 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.
- **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.
- **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.
- **PHARMACORAMA.** www.pharmacorama.com
- **PHELPS, D. K.** (1983). Application of mussel watch concept; transplant experiments, hot spot and ocean disposal studies. U.S. environmental Protection Agency. Environmental Research Laboratory. South Ferry Road Narragansett, Rhode Island 02882 USA.
- **PHILIPS, D. J. H. & SEGAR, D. A.** (1986). "Use of indicators in monitoring conservative contaminants." *Mar. Pollut. Bull.* 17, p. 10-17.
- **PHILLIPS, D. J. H. & RAINBOW, P. S.** (1993). Biomonitoring of trace aquatic contaminants. Environmental management series, Alden pcess Ltd, Oxford: p. 371.

- **PHILLIPS, D. J. H. & RAINBOW, P. S.** (1994). Biomonitoring of trace aquatic contaminants, Aldenn Press Ltd, Oxford.
- **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.
- **P. O. C.** (Février, 2003). Pêches et Océans Canada. Profil de la moule bleue. Direction des politiques et des services économiques. Région du Golfe. Ministère des Pêches et des Océans. Moncton, Nouveau-Brunswick.
- **POUVREAU, S.** (2004). les modèles écophysiologiques chez les mollusques filtreurs: du rêve à la réalité. Les journées contamination décontamination des mollusques bivalves. IFREMER – Nantes, p. 26-27.
- **RAINBOW, P. S.** (1995). "Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment." Mar. Pollut. Bull. 31, p. 183-192.
- **RAINBOW, P. S., FIALKOWSKI, W., SOKOLOWSKI, A., SMITH, B. D. & WOLOWICZ, M.** (2004). "Geographical and seasonal variation of trace metal bioavailabilities in the Gulf of Gdansk, Baltic Sea using mussels (*Mytilus trossulus*) and barnacles (*Balanus improvisus*) as biomonitors." Mar. Biol 144, p. 271-286.
- **REGOLI, F. & ORLANDO E.** (1994). "Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb, Zn) in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, during a field transplant experiment." Mar. Pollut. Bull. 28(10), p. 592-600.
- **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.
- **RIVA, A. & MASSE, H.** (1983). Etude écophysiologique de quelques mollusques bivalves. Bases biologiques de l'aquaculture. Montpellier. IFREMER. Actes de Colloques n 1, p. 45-62.
- **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.
- **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, Médecine d'urgence.

- **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.
- **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.
- **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.
- **SOGREAH**, 1998. Etude d’assainissement du groupement urbain d’Oran. Plan directeur d’assainissement et d’aménagement.
- **SOOT-RYEN, T. & NEWELL, N. D.** (1969). Mytilidae. In: Moore, R. C. (ed.) *Treatise on Invertebrate Paleontology. Part N. Volume 1. Mollusca 6, Bivlavia*, Geological Society of America, Boulder, CO, University of Kansas Press, Lawrence, KS, p. 271-280.
- **SONGY, P. & AVEZARD, J.** (1963). Documents pour l’étude des invertébrés (non Arthropodes). Cours de sciences naturelles. Classique Hachette, p. 84.
- **STEGEMAN, J. J., BROUWER, M., RICHARD, T. D. G., FÖRLIN, L., FOWLER, B. A., SANDERS, B. M. & VAN VELD, P. A.** (1992). Enzyme and protein synthetis as indicators of contaminant exposure and effect. In: *Biomarkers Biochemical, Physiological and Histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers. Chelsea. MI, USA, p. 235-335.
- **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.
- **TALEB, M. Z. & BOUTIBA, Z.** (2007). La moule *Mytilus galloprovincialis* : bioindicatrice de pollution marine - Cas du port d’Oran. *Sciences & Technologie*, Université Mentouri Constantine, Algérie (sous presse).
- **TALEB, M. Z., BENGHALI, S. KADDOUR, A. & BOUTIBA, Z.** (2007a). First data of pollution biological effects in the Algerian west coast using the mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Proceeding of the Workshop on The MED POL Biological Effects Programme: Achievements and Future Orientations*. Department of Environmental and Life Sciences-DISAV, Alessandria, Italy. 19-22 December 2006.

- **TALEB, M. Z., BENGHALI, S. KADDOUR, A. & BOUTIBA, Z.,** (2007b). Monitoring of pollution biological effects using the mussels *Mytilus galloprovincialis* in the Algerian west coast. *Oceanologia*, Polish Academy of Sciences (sous presse).
- **TEMPLE, W. & SMITH, N. A.** (1996). Insecticides In: Human toxicology, J. Descotes (ED). Elsevier. Chap. 20, p. 541-550.
- **THIBAUD, Y. & BOUTIER, B.** (1988). "Surveillance du mercure et du cadmium dans les huîtres et les moules du littoral français (1979-1985)." Rapport Synthèse RNO Vol IV, p. 55-100.
- **THOMAS, P.** (1990). Molecular and Biochemical Responses of Fish to Stresses and their Potential Use in Environmental Monitoring, Biological Indicators of Stress in Fish. 1990, S.M. Adams, Ed. Bethesda M.D., *American Fisheries Society*, p. 9-28.
- **THOMPSON, H.M., WALKER, C.H., HARDY, A.R.** (1991). Changes in activity of avian serum esterases following exposure to organophosphorous insecticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, p. 514-521.
- **TRAN KY, GUILBERT, J-M & DIDOU-MANENT, M.** (2003). Petite encyclopédie des fruits de mer. Editions la vague verte, p. 212.
- **TRAN D., BOUDOU A. & MASSABUAU, J. C.** (2000). Mechanism for maintaining oxygen consumption under varying oxygenation levels in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Can. J. Zool.* Vol. 79. CNRS. Canada.
- **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.
- **Valbonesi, P., Sartor, G., Fabbri, E.** (2003). Characterisation of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic Sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *Science of the Total Environment* 312, p. 79-88.
- **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.
- **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.
- **VIARENGO, A., CANESI, L.** (1991). Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture* 94, p. 225-243.
- **VILLENEUVE, F. & DESIRE, C.** (1963). Zoologie. classe de 1re M'.

- **WALKER, M. & LIVINGSTONE, D. R.** (1992). *Persistent pollutants in marine ecosystems*, SETAC Spec. Publ. Ser., Pergamon Press, New York, p. 3–35.
- **WHO** (World Health Organization) (1993), *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.
- **ZINKL, J.G., LOCKHART, W.L., KENNY, S.A., & WARD, F.J.** (1991). The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. *In: Cholinesterase-Inhibiting Insecticides* (Mineau P., ed.) Elsevier. New York, p. 233-254.