



HAL
open science

Evaluation de la toxicité de moules de 2 sites de la Côte Atlantique Marocaine (Jorf Lasfar et Oualidia) utilisées comme bioindicateurs de contamination : étude in vivo et in vitro sur des rats et des cellules β -pancréatiques murines (MIN-6)

Mohamed Boumhras

► **To cite this version:**

Mohamed Boumhras. Evaluation de la toxicité de moules de 2 sites de la Côte Atlantique Marocaine (Jorf Lasfar et Oualidia) utilisées comme bioindicateurs de contamination : étude in vivo et in vitro sur des rats et des cellules β -pancréatiques murines (MIN-6). Ecotoxicologie. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS118 . tel-01392367

HAL Id: tel-01392367

<https://theses.hal.science/tel-01392367>

Submitted on 4 Nov 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE HASSAN 1^{er}
Ecole Doctorale : Biologie et- Santé
UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Ecole Doctorale : Science Vie – Terre – Environnement

THESE

En cotutelle

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne et de l'Université HASSAN 1^{er}

Discipline : Biochimie, Biologie Cellulaire et Ecotoxicologie

Présentation et soutenance publiques par :

Mohamed BOUMHRAS

17 Décembre 2012

**Evaluation de la Toxicité de Moules de 2 Sites de la Côte Atlantique Marocaine (Jorf Lasfar et
Qualidia) Utilisées Comme Bioindicateurs de Contamination :**

Etude *In Vivo* et *In Vitro* sur des rats et des Cellules β -Pancréatiques Murines (MIN-6)

Membres du Jury :

- Mr Claude LAMBERT	PH	Université St-Etienne	Rapporteur
- Mr Mohamed BLAGHEN	PU	Université Hassan II	Rapporteur
- Mr Khalid ESSAMMADI	PU	Université Hassan 1 ^{ER}	Rapporteur interne
- Mr Mustapha CHERKAOUI-MALKI	PU	Université de Bourgogne	Examineur
- Mr Abdallah BAGRI	PU	Université Hassan 1 ^{ER}	Examineur
- Mr Saïd EL KEBBAJ	PU	Université Hassan II	Examineur
- Mr Boubker NASSER	PU	Université Hassan 1 ^{ER}	Directeur de Thèse
- Mr Gérard LIZARD	CR	Université de Bourgogne INSERM	Directeur de Thèse

Remerciements

La réalisation de cette Thèse a été possible grâce aux soutiens financiers de différents organismes dont l'Action Intégrée Franco-Marocaine CNFIM-AIMA / 10 / 238 du programme Volubilis, ministère des Affaires Etrangères, France.

Ont aussi contribué au financement de cette Thèse : l'Ecole Doctorale Science Vie – Terre – Environnement de l'Université de Bourgogne (Dijon, France), l'Université de Bourgogne et l'Université Hassan 1^{er} (Settat, Maroc), l'Association Bourguignonne pour les Applications des Sciences de l'Information en Médecine (ABASIM, Dijon, France), l'ISAC (International Society for Advancement of Cytometry) et l'AFC (Association Française de Cytométrie).

Qu'il me soit permis de remercier :

Le Docteur **Claude LAMBERT** et les Professeurs **Mohamed BLAGHEN**, **Mustapha CHERKAOUI-MALKI**, **Khalid ESSAMMADI**, **Abdallah BAGRI** et **Said EL KEBBAJ** qui ont accepté de bien vouloir lire et évaluer ce travail.

Monsieur le **Professeur Boubker NASSER** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire (laboratoire de Biochimie et Neurosciences ; équipe de Toxicologie Appliquée), Université Hassan 1^{er}, Faculté des Sciences et Techniques, Settat, Maroc.

Monsieur le Docteur **Gérard LIZARD** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire (EA7270 : Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique), Université de Bourgogne/INSERM, Dijon, France.

Madame **Anne ATHIAS** (Plateforme lipidomique, IFR100 INSERM, Dijon, France) et Monsieur **Joseph GRETI** (INSERM UMR 866, Dijon, France) pour leurs assistances techniques en chromatographie en phase gazeuse, chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse.

Monsieur **Jean-Luc BELTRAMO** pour les analyses de métaux lourds (Pôle Chimie Analytique de Welience, Dijon, France).

Monsieur **Aziz ELCHAIMOUTI** pour les analyses plasmatiques chez le rat (Hôpital Hassan 2, Settat, Maroc).

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe EA7270 qui m'ont accompagné dans mon travail de Thèse.

Résumé

Des substances toxiques générées par les activités portuaires, urbaines et industrielles sont déversées à certains niveaux du milieu marin côtier marocain. Les mollusques peuvent concentrer les polluants et avoir des effets néfastes sur la santé humaine par l'intermédiaire de la chaîne alimentaire. Malgré le renforcement des mesures de sécurité alimentaire, l'implication de la pollution chimique des aliments dans les troubles métaboliques n'est pas à exclure. Pour prédire l'impact des polluants sur l'écosystème aquatique et sur la santé humaine, le développement d'outils de biosurveillance est nécessaire.

Nous avons quantifié les métaux lourds (Cd, Cr et Pb) chez les moules (*Mytilus galloprovincialis*) issues de la côte atlantique marocaine (site industriel Jorf Lasfar (JL) et site touristique d'Oualidia (OL)) en raison de la proximité d'une plateforme d'extraction de phosphate puis caractérisé leurs profils lipidiques (acides gras, cholestérol, oxystérols, phytostérols et phospholipides). Les extraits lipidiques totaux de moules ont été testés *in vivo* sur des rats pour déterminer leurs effets sur les paramètres biochimiques plasmatiques et *in vitro* sur une lignée de cellules β pancréatiques murine (MIN-6) en conditions normo et hyperglycémique. Les effets des extraits de moules JL et OL ont été comparés par rapport à ceux de moules d'origine espagnole (ES) destinées à la consommation en France. Les métaux lourds dans les moules JL dépassent les normes internationales. Les concentrations métalliques dans tous les extraits lipidiques sont à l'état de trace. Les moules JL et OL sont moins riches en acides gras insaturés, plus riches en oxystérols et en phospholipides par rapport aux moules ES, suggérant un stress environnemental. Les extraits lipidiques des moules JL et OL administrés à des rats, ont provoqué une perturbation des paramètres plasmatiques, notamment des taux de glucose, créatinine, triglycérides et transaminases avec une augmentation de cholestérol-HDL. *In vitro* seuls les extraits lipidiques JL et OL induisent la mort des cellules MIN-6 par un processus non apoptotique. Ce processus est associé à une dépoliarisation mitochondriale, une déstabilisation lysosomale et une augmentation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique, paramètres mesurés par cytométrie en flux dans une démarche cytomique. Ils provoquent aussi une surproduction de H₂O₂, une augmentation d'activité catalase, une diminution du glutathion réduit, une peroxydation lipidique et une forte stimulation de la sécrétion d'insuline avec un effet plus marqués en présence des extraits lipidiques JL.

Globalement, les lipides de moules JL induisent des effets néfastes *in vivo* et *in vitro* par rapport à ceux provenant de OL et ES. Une étude épidémiologique à large échelle dans le contexte des maladies métaboliques pourrait être pertinente chez les populations consommatrices de ces moules.

Mots-clés: cellules β pancréatiques murines (MIN-6); cytométrie en flux; cytomique; chromatographie; lipides (acides gras, cholestérol, oxystérols, phytostérols, phospholipides; microscopie; moules; métaux lourds; toxicologie (*in vivo*; *in vitro*)).

Abstract

Toxic substances generated by various human activities are spilled on different area of the Moroccan coast. Shellfishes can concentrate pollutants and have some adverse effects on human health through the food chain. Despite the strengthening of food safety rules, the involvement of chemical pollution of food on metabolic disorders is not known. To predict the impact of pollutants on the aquatic ecosystem and human health, the development of appropriate biomonitoring tools is required.

We quantified heavy metals (Cd, Cr and Pb) in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from two sites of Moroccan Atlantic coast (industrial site Jorf Lasfar (JL) and touristic site Oualidia (OL)) due to the proximity of a phosphate extraction platform, and further characterized their lipid profiles (fatty acids, cholesterol, oxysterols, phospholipids and phytosterols). Total lipid extracts of mussels were tested *in vivo* in rats to determine their effects on biochemical plasmatic parameters and *in vitro* on a β pancreatic murine cell line (MIN-6) in normo- and hyperglycemic conditions. The effects of JL and OL mussel extracts were compared to mussels from Spain (ES) used for human consumption in France. Heavy metals in JL mussels exceed international standard level. Metal concentrations in all lipid extracts are present in small quantity. JL and OL mussels are less enriched in unsaturated fatty acids, oxysterols and contain higher levels of phospholipids than ES mussels, suggesting an environmental stress. The lipid extracts of JL and OL mussels administered to rats induce a disruption of plasmatic parameters (glucose, creatinine, transaminases and triglycerides) with an increase of HDL-cholesterol. *In vitro*, only JL and OL lipid extracts induce MIN-6 cell death by a non-apoptotic process. This process is associated with mitochondrial depolarization, lysosomal destabilization and an increase of the cytoplasmic membrane permeability, parameters measured by flow cytometry in a cytotoxic context. They also induce an overproduction of H₂O₂, an increase of catalase activity, a decrease of reduced glutathion, lipid peroxidation and a strong stimulation of insulin secretion with a more marked effect in presence of JL lipid extracts.

Overall, JL mussel lipids induce various side effects *in vivo* and *in vitro*, which are more pronounced than those observed with OL and ES. A large-scale epidemiological study could be of interest to confirm the potential side effects of these mussels to favor metabolic disorders.

Keywords: β pancreatic murines (MIN-6) cells ; flow cytometry ; cytotoxic ; chromatography ; lipids (fatty acids, cholesterol, oxysterols, phytosterols, phospholipids ; microscopy ; mussels ; heavy metals ; toxicology (*in vivo* ; *in vitro*)).

Table des matières

AVANT-PROPOS.....	6
REVUE DE LA LITTERATURE	10
1. BIOSURVEILLANCE DU MILIEU COTIER MARIN : APPROCHE ANALYTIQUE	11
1.1. Intérêt du suivi de la bioaccumulation de contaminants dans les organismes marins.....	11
1.2. Utilisations des bivalves comme outils de surveillance des milieux aquatiques	11
1.2.1. La moule, <i>Mytilus</i> sp., en tant que bioindicateur	12
1.2.1.1. Morphologie et anatomie des <i>Mytilus</i> sp.....	13
1.2.1.2. Mode de vie de la moule, <i>Mytilus</i> sp.....	14
1.2.2. Stratégies utilisées dans les programmes de surveillance des milieux aquatiques.....	15
1.3. Les contaminants chimiques recherchés chez les bioindicateurs	16
1.3.1. Les nutriments.....	17
1.3.2. Les métaux	17
1.3.2.1. L’Arsenic (As).....	18
1.3.2.2. Le Cadmium (Cd).....	18
1.3.2.3. Le Chrome (Cr)	19
1.3.2.4. Le Mercure (Hg) :	20
1.3.2.5. Le Plomb (Pb)	21
1.3.3. Les pesticides.....	21
1.3.4. Les hydrocarbures halogénés.....	22
1.3.5. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)	22
1.4. Limite de l’approche analytique basée sur les bioindicateurs	23
2. LES BIOMARQUEURS POUR LA SURVEILLANCE DE LA QUALITE DE L’ENVIRONNEMENT MARIN	23
2.1. Les catégories des biomarqueurs	23
2.2. Les différents biomarqueurs de pollution chez les bivalves	24
2.2.1. Marqueurs de génotoxicité	24
2.2.2. Les métallothionéines	25
2.2.3. Le stress oxydant	25
2.2.4. La peroxydation lipidique.....	27
2.2.5. Les systèmes lysosomaux.....	28
2.3. Limites de l’approche biomarqueurs chez les bioindicateurs.....	29
3. CONTAMINATION CHIMIQUE DES ALIMENTS MARIN ET MALADIE METABOLIQUES CHEZ L’HOMME.....	31

3.1. Contexte et enjeux.....	31
3.2. Polluants Organiques persistant (POPs) et maladies métaboliques	31
3.3. Métaux toxiques et maladies métaboliques.....	32
DEFINITION DU MODEL D'ETUDE ET OBJECTIFS	33
MATERIEL ET METHODES	36
1. MODELE MOULES	37
1.1. Les Moules.....	37
1.2. Description de la zone d'étude.....	37
1.2.1. Site Jorf Lasfar	38
1.2.2. Site Oualidia	39
1.3. Prélèvement des Moules.....	40
1.4. Séchage des moules.....	40
1.5. Dosage des métaux lourds (Cd, Cr, et Pb).....	40
1.6. Extraction des lipides totaux	40
1.7. Caractérisation du profil lipidique des moules.....	41
1.7.1. Dosage des acides gras.....	41
1.7.1.1. Méthylation au boron trifluoride-méthanol (BF ₃)	41
1.7.1.2. Analyse des esters méthylés par chromatographie en phase gazeuse	41
1.7.2. Séparation et analyse des phospholipides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.....	41
1.7.3. Dosage du cholestérol, dérivés oxydés du cholestérol (oxystérols) et phytostérols par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	42
1.7.3.1. Saponification à froid.....	42
1.7.3.2. Extraction de l'insaponifiable	42
1.7.3.3. Dérivation	42
1.7.3.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ..	43
2. CARACTERISATION IN VIVO DE LA TOXICITE DES EXTRAITS LIPIDIQUES DE MOULES CHEZ LE RAT.....	44
2.1. Le modèle animal : le rat.....	44
2.2. Le sacrifice des animaux :.....	44
2.3. Analyse des paramètres plasmatiques chez le rat	45
2.3.1. Mesure de la glycémie	45
2.3.2. Dosage de la créatinine de l'urée et de l'acide urique.....	46

2.3.3. Etude du Bilan lipidique	47
2.3.3.1. Les triglycérides	47
2.3.3.2. Cholestérol total	47
2.3.3.3. HDL-Cholestérol et LDL-Cholestérol	47
2.3.4. Protéines totales	48
2.3.5. L'albumine	48
2.3.6. Exploration de la fonction hépatique.....	48
2.3.6.1. Les transaminases	48
2.3.6.2. La Phosphatase alcaline	49
3. CARACTERISATION DE LA TOXICITE DES EXTRAITS LIPIDIQUES DE MOULES SUR LES CELLULES B PANCREATIQUES MURINES (MIN-6)	50
3.1. Modèle cellulaire : cellules β pancréatiques murines (MIN-6)	50
3.1.1. Caractéristiques des cellules MIN-6	50
3.1.2. Culture et traitements des cellules MIN-6	50
3.2. Mesure de prolifération des cellules MIN-6.....	51
3.2.1. Numération et morphologie cellulaire.....	51
3.2.2. Mesure de la confluence par coloration au Crystal Violet	51
3.2.3. Evaluation de l'activité du succinate déshydrogénase avec le test MTT	52
3.2.4. Dosage de l'activité lactate déshydrogénase	53
3.2.5. Evaluation de l'intégrité de la membrane cytoplasmique par coloration avec l'iodure de Propidium et analyse par cytométrie en flux	54
3.2.6. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.....	54
3.3. Effet sur les organites cellulaires.....	55
3.3.1. Mesure du potentiel trans-membranaire mitochondriale avec DIOC ₆ (3)	55
3.3.2. Détection des lysosomes à membrane déstabilisée par coloration à l'Acridine Orange	56
3.3.3. Evaluation de la fonction peroxysomale	57
3.3.3.1. Etudes de l'expression d'ABCD3/PMP70 (Peroxisomal Membrane protein) par immunofluorescence indirecte	57
3.3.3.2. Etude de la Catalase.....	58
3.4. Analyse du stress oxydant	60
3.4.1. Dosage du Glutathion réduit par méthode colorimétrique	60
3.4.2. Détection des anions superoxydes par coloration à la Dihydroéthidine	61
3.4.3. Détection du monoxyde d'azote par le 4,5-Diaminofluorescein diacetate	62
3.4.4. Détection du peroxyde d'hydrogène par coloration à la Dihydrorhodamine 123.....	63

3.4.5. Détection du 4-hydroxy-2-nonéanal par immunofluorescence indirecte et analyse par cytométrie en flux	63
3.5. Caractérisation de la mort cellulaire.....	65
3.5.1. Analyse de la morphologie nucléaire par coloration au Hoechst 33342	65
3.5.2. Détection des cellules en phase Sub-G1	65
3.6. Dosage de l'insuline	66
4. ANALYSE STATISTIQUE	67
RESULTATS	68
1. ETUDES DES BIOMARQUEURS DE POLLUTION CHEZ MYTILUS GALLOPROVINCIALIS	69
1.1. Teneurs en métaux lourds dans la poudre et extraits lipidiques de moules.....	69
1.2. Profil lipidiques des moules.....	70
1.2.1. Profil lipidique en acide gras	70
1.2.2. Profil lipidique en phospholipides.....	72
1.2.3. Profils lipidiques en stérol chez les moules.....	73
2. CARACTERISATION DE LA TOXICITE DES EXTRAITS LIPIDIQUES DE MOULES SUR LES PARAMETES PLASMATIQUES CHEZ LE RAT	75
2.1. Effet du traitement sur la protéinémie, la créatinine, l'urée et l'acide urique:.....	75
2.2. Effet du traitement sur les transaminases et la phosphatase alcaline.....	76
2.3. Effet du traitement sur le bilan lipidique:	76
3. CARACTERISATION DE LA TOXICITE DES EXTRAITS LIPIDIQUES DE MOULES SUR LES CELLULES BETA PANCREATIQUES MURINES (MIN-6).....	78
3.1. Prolifération des cellules MIN-6	78
3.2. Effets des extraits lipidiques sur la prolifération des cellules MIN-6	80
3.2.1. Comptage des cellules MIN-6 par coloration au Bleu Trypan.....	80
3.2.2. Morphologie des cellules MIN-6	82
3.2.3. Evaluation de la confluence cellulaire par coloration au Crystal Violet.....	85
3.2.4. Evaluation de l'activité succinate déshydrogénase : test MTT	87
3.2.5. Evaluation de l'activité lactate déshydrogénase.....	89
3.2.6. Evaluation de l'intégrité de membrane cytoplasmique par coloration à l'iodure de propidium	91
3.2.7. Analyse du cycle cellulaire des cellules MIN-6.....	92
3.3. Effet sur les organites cellulaires.....	96

3.3.1. Effets des extraits lipidiques sur le potentiel transmembranaire mitochondriale	96
3.3.2. Effets des extraits lipidiques sur la stabilité des lysosomes des cellules MIN-6	98
3.3.3. Evaluation de la fonction peroxysomale	100
3.3.3.1. Incidence des extraits lipidiques sur l'expression d'ABCD3/ PMP70.....	100
3.3.3.2. Mesure de l'activité Catalase.....	103
3.3.3.3. Identification de la Catalase par immunofluorescence et quantification par cytométrie en flux	105
3.4. Effet des extraits lipidiques sur l'équilibre Redox des cellules MIN-6.....	106
3.4.1. Effet des extraits lipidiques sur le taux de glutathion réduit	106
3.4.2. Effet des extraits lipidiques sur la production d'anion superoxyde.....	108
3.4.3. Effet des extraits lipidiques sur la production du monoxyde d'azote.....	110
3.4.4. Effet des extraits lipidiques sur la production de peroxyde d'hydrogène	112
3.4.5. Effet des extraits lipidiques sur la production de 4-hydroxy-2-nonéanal.....	114
3.5. Caractérisation de la mort cellulaire induite par les extraits lipidiques	116
3.5.1. Effet des extraits lipidiques sur la morphologie nucléaire	116
3.5.2. Effet des extraits lipidiques sur la génération d'un pic Sub-G1	117
3.6. Effet des extraits lipidiques sur de la sécrétion d'insuline.....	120
DISCUSSION	122
1. APPROCHE ANALYTIQUE ET BIOMARQUEURS : INTERETS ET LIMITES	123
1.1. Les Métaux lourds.....	123
1.2. Le profil lipidiques des moules	125
2. APPORT DU MODELE RONGEUR POUR L'EVALUATION DE LA TOXICITE DES EXTRAITS LIPIDIQUES DE MOULES	128
3. APPORT DE L'ANALYSE MULTIPARAMETRIQUE FONCTIONNELLE SUR CELLULES MIN-6 POUR L'EVALUATION DE LA TOXICITE DES EXTRAITS LIPIDIQUES DE MOULES.....	131
3.1. Justification du modèle cellulaire utilisé.....	131
3.2. Extraits lipidiques de moules et stress oxydant	132
3.3. Extraits lipidiques de moules, prolifération et mort cellulaire	133
3.4. Extraits lipidiques de moules et sécrétion d'insuline	134
3.5. Apport des analyses multiparamétriques fonctionnelles en toxicologie : intégration des études microscopiques, cytométriques et biochimiques à l'approche cytomique	137
CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	139
1. CONCLUSION	140

2. PERSPECTIVES	141
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	142
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	145

Liste des figures

Figure 1	: Morphologie et anatomie de la moule, <i>Mytilus</i> sp.-----	14
Figure 2	: Mode de vie de la moule <i>Mytilus</i> sp. -----	15
Figure 3	: Mécanismes d'absorption et dommages du Cr(VI) sur l'ADN (Jomova et Valko 2011) -----	20
Figure 4	: Réaction d'oxydoréduction. Adapté de Ji JJ, Free Radic Biol Med, 1995 (Ji 1995)-----	26
Figure 5	: Processus de la peroxydation lipidique et rôle du système de défense antioxydant dans la gestion du stress oxydant (Valko et al. 2007) -----	28
Figure 6	: Représentation schématique des effets des métaux toxiques sur la signalisation cellulaire induisant différents effets toxiques sur les cellules β pancréatiques. D'après (Chen et al. 2009) -----	32
Figure 7	: Localisation des sites d'études (Jorf Lasfar) JL et Oualidia (OL) sur la côte atlantique Marocaine -----	38
Figure 8	: Photo aérienne du site Jorf Lasfar (JL) prise par Google earth-----	39
Figure 9	: Photo aérienne du site Oualidia (OL) prise par Google earth -----	39
Figure 10	: Schéma de traitement des rats-----	44
Figure 11	: Principe du dosage du glucose (GOD : glucose oxydase ; POD : peroxydase ; 4-AP : 4-aminophenazone) -----	45
Figure 12	: Principe du dosage de l'urée-----	46
Figure 13	: Principe du dosage de l'acide urique (TBHBA : acide 2,4,6-tribromo-3-hydroxybenzoïque) -----	46
Figure 14	: Principe du dosage des triglycérides-----	47
Figure 15	: Principe du dosage du cholestérol-----	47
Figure 16	: Principe du dosage des transaminases-----	48
Figure 17	: Réduction du MTT en formazan-----	52
Figure 18	: Représentation du cycle cellulaire et modèle de Dean & Jett.-----	55
Figure 19	: Principe du dosage de l'activité catalase (HRP : horseradish peroxidase)-----	58
Figure 20	: Principe du dosage du glutathion total-----	60
Figure 21	: Oxydation du Dihydroethidine (DHE) en Ethidium (HE) -----	61
Figure 22	: Oxydation du 4,5-Diaminofluorescein diacetate en Triazolofluorescein-----	62
Figure 23	: Oxydation de Dihydrorhodamine 123 (DHR123) en Rhodamine 123 (Rh123)-----	63
Figure 24	: Teneurs en métaux lourds (mg.kg-1 de tissus secs) chez les moules -----	69
Figure 25	: Pourcentage des trois classes des principaux acides gras chez les moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) 70	
Figure 26	: Courbe de croissance des cellules MIN-6 en fonction du taux de glucose -----	79
Figure 27	: Numération des cellules MIN-6 en présence de différents extraits lipidiques de moules -----	81
Figure 28	: Analyse par microscopie à contraste de phase de la morphologie des cellules MIN-6 (condition normo-glycémique : 5 mM)-----	83
Figure 29	: Analyse par microscopie à contraste de phase de la morphologie des cellules MIN-6 (condition hyper-glycémique : 25 mM)-----	84
Figure 30	: Analyse par coloration au Crystal violet de la confluence des cellules MIN-6-----	86
Figure 31	: Evaluation de l'activité de la succinate déshydrogénase : test MTT -----	88

Figure 32	: Evaluation de l'activité lactate déshydrogénase (LDH) -----	90
Figure 33	: Evaluation de l'intégrité de la membrane cytoplasmique des cellules MIN-6-----	92
Figure 34	: Analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire des cellules MIN-6 cultivées en conditions normo-glycémiques	94
Figure 35	: Analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire des cellules MIN-6 cultivées en conditions hyper-glycémiques	95
Figure 36	: Mesure du potentiel transmembranaire mitochondriale par coloration au DIOC ₆ (3)-----	97
Figure 37	: Evaluation de la stabilité lysosomale des cellules MIN-6 par coloration a l'acridine Orange-----	99
Figure 38	: Analyse par cytométrie en flux de l'expression de la protéine peroxysomale ABCD3 / PMP70 sur cellules MIN-6 en condition normo-glycémique (5 mM) et hyper-glycémique (25 mM)-----	101
Figure 39	: Analyse par microscopie à fluorescence de l'expression et de la topographie de la protéine ABCD3 / PMP70 sur cellules MIN-6 en condition normo-glycémique (5 mM) et hyper-glycémique (25 mM) en absence ou en présence d'extraits lipidiques de moules -----	102
Figure 40	: Analyse de l'activité catalase des cellules β-Pancréatiques murines (MIN-6) -----	104
Figure 41	: Quantification de la Catalase chez les cellules β-Pancréatiques murine (MIN-6).-----	105
Figure 42	: Teneur en GSH des cellules MIN-6 par méthode colorimétrique -----	107
Figure 43	: Analyse de la production d'O ₂ ^{•-} chez les cellules MIN-6 mesuré par coloration au DHE -----	109
Figure 44	: Analyse de la production du NO par les MIN-6 mesuré par coloration au DAF-2 -----	111
Figure 45	: Analyse de la production de H ₂ O ₂ par les MIN-6 mesurée par coloration à la DHR123-----	113
Figure 46	: Analyse des taux de 4-HNE dans les cellules β-Pancréatiques murines (MIN-6)-----	115
Figure 47	: Analyse de la morphologie nucléaire des cellules MIN-6-----	116
Figure 48	: Détection des cellules MIN-6 en Sub-G1 (Condition normo-glycémique : 5 mM)-----	118
Figure 49	: Détection des cellules MIN-6 en Sub-G1 (Condition hyper-glycémique : 25 mM) -----	119
Figure 50	: Taux de l'insuline sécrété par les cellules MIN-6 traitées avec les extraits lipidiques -----	121

Liste des tableaux

Tableau I	: Avantages et limites de la Biosurveillance passive et de la Biosurveillance active	16
Tableau II	: Pourcentages des principaux acides gras identifiés chez les moules	71
Tableau III	: Composition en phospholipides ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ tissus secs) de moules	72
Tableau IV	: Proportions des principaux stérols identifiés dans le tissus de moules	74
Tableau V	: Composition en cholestérol et dérivés oxydés (oxystérols) de moules	74
Tableau VI	: Paramètres glycémiques et rénaux chez les rats traités avec les extraits lipidiques de moules	75
Tableau VII	: Paramètres hépatiques chez les rats traités avec les extraits lipidiques de moules	76
Tableau VIII	: Bilan lipidique chez les rats traités avec les extraits lipidiques de moules	77
Tableau IX	: Pourcentage de cellules MIN-6 à noyaux condensés et/ou fragmentés	117
Tableau X	: Comparaison des teneurs en métaux toxiques ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ poids sec) dans les moules de notre étude avec celles obtenues dans d'autres études relatives au littoral marocain et à d'autres régions du monde	124

Abréviations

AGL	: Acide Gras Libre
DIOC₆(3)	: 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide
PMP70	: 70-kDa peroxisomal membrane protein
$\Delta\psi_m$: Potentiel transmembranaire mitochondriale
4-HNE	: 4-hydroxy-2-nonéal
7 KC	: 7 cétocholestérol
ABCD3	: ATP-binding cassette transporter D
Ag	: Argent
ALAT	: Alanine Aminotransférase
AO	: Acridine orange
As	: Arsenic
ASAT	: Aspartate Aminotransférase
BF3	: Boron trifluoride-méthanol
Cd	: Cadmium
CPG	: Chromatographie en Phase Gazeuse
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
Cr	: Chrome
CT	: Cholestérol total
Cu	: Cuivre,
DAF-2	: 4,5-Diaminofluorescein diacetate
DHE	: Dihydroéthidine
DHR 123	: Dihydrorhodamine 123
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DO	: Densité optique
DTNB	: 5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid
ERN	: <i>Espèces Reactives de l'Azote</i>
ERO	: <i>Espèces Reactives de l'Oxygène</i>
ES	: Espagne
Fr	: Fer
GLP-1	: Glucagon-like-peptide-1
GOD	: Glucose oxydase
GPO	: Glycérol-3-phosphateoxidase

GSH	: Glutathion réduit
GSSG	: Glutathion oxydé
HAPs	: Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HDL-C	: high-density lipoprotein Cholesterol
Hg	: Mercure
IP	: Iodure de Propidium
JL	: Jorf Lasfar
LDH	: Lactate déshydrogénase
LDL-C	: Low-density lipoprotein Cholesterol
m/z	Masse/Charge
MDA	: Malonedialdéhyde
MIN-6	: Mouse insulinoma-6
MTs	: Métallothionéines
MTT	: 3 - [4,5-diméthylthiazol-2-yl] -2,5-diphényltétrazolium bromure
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
O₂⁻	: Anion Superoxyde
OL	: Oualida
ONOO-	: Peroxynitrites
Pb	: Plomb
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCBs	: Chlorophénols, polychlorobiphényles
PFA	: Paraformaldéhyde
POD	: Peroxydase
POPs	: Polluant organiques persistants
POPs	: Polluants organiques persistants
SIM	: Selected Ion Monitoring
SM	: Solution Mère
sp	: Espèce
SVF	: Sérum de veau foetal
TG	: Triglycérides
TIC	: Total Ion Chromatography
UCP2	: UnCoupling Protein1
UV	: Ularat Violet
Zn	: Zinc

Avant-propos

De nombreuses substances toxiques générées par les activités humaines sont quotidiennement déversées dans le milieu marin et côtier. La pollution engendrée est générée par des polluants divers, d'origines naturelles et/ou synthétiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), chlorophénols, polychlorobiphényles (PCBs), hexachlorohexanes, hexachlorobenzènes, dioxines, organoétains, pesticides organochlorés, insecticides organophosphorés, carbamates, radioéléments, métaux lourds ou toxiques tels que cadmium, mercure, argent, plomb, zinc, cuivre, fer, aluminium, arsenic) qui peuvent affecter l'écosystème par une multiplicité de voies de contaminations. Bien que les pollutions accidentelles puissent avoir des répercussions graves sur la santé humaine et l'environnement, elles sont supposées se produire rarement en raison des renforcements des codes de sécurité.

Le déversement direct des rejets d'origine industrielle et urbaine constitue la 1^{ère} voie de contamination de l'environnement marin et côtier. Le continuum (eau-douce / eau de mer) véhicule aussi des effluents chargés en contaminants issus des activités anthropiques continentales. Par ailleurs, une partie des particules ou aérosols, rejetés dans l'atmosphère par les activités industrielles peut être transporté sur une grande distance et finir par être absorbé, au moins en partie, par le milieu marin côtier. Les courants marins peuvent également participer à la dispersion horizontale et verticale des polluants, à leur remise en suspension ainsi qu'à la contamination des sites vierges.

Le milieu marin côtier étant le point de convergence de voies d'expositions à de multiples contaminants, sa biosurveillance nécessite la mise en œuvre de divers moyens de contrôle pour s'assurer qu'il ne présente aucun risque pour l'écosystème et pour l'homme en particulier dans le cadre de la chaîne alimentaire.

Les mesures de biosurveillance actuellement mises en œuvre se font en deux approches complémentaires : (i) La détection des polluants et leur quantification (approche analytique) ; (ii) l'évaluation des effets des polluants sur les organismes vivants (approche biomarqueurs). Toutefois, ces méthodes globales restent insuffisantes. En effet, les contaminants recherchés par méthodes analytiques peuvent avoir des demi-vies courtes et subir dans les milieux, divers biotransformations qui conduisent à la production de métabolites actifs non analysés. Quant aux biomarqueurs, la principale limitation est la difficulté de discriminer entre réponses adaptatives « naturelles » et réponses au stress chimique.

Malgré le renforcement des mesures de sécurité alimentaires, l'implication de la pollution chimique (polluants organiques persistants «POPs», métaux toxiques, ...) des aliments dans la progression dramatique des troubles métaboliques (syndrome métabolique, diabète type II, obésité) n'est pas à exclure.

En raison de ces limites, le développement de nouveaux outils de biosurveillance apparaît nécessaire, en particulier pour prédire l'impact précoce des polluants sur l'écosystème aquatique et sur la santé humaine.

Ce travail a consisté à comparer deux sites côtiers marins situés sur la côte atlantique marocaine de la région d'El Jadida: l'un se trouve à proximité de la zone industrielle de Jorf Lasfar (JL) (plateforme d'extraction de phosphate, port maritime, centrale thermique au charbon), l'autre est localisé à Oualidia (OL), site touristique balnéaire. Pour effectuer cette comparaison, différentes approches ont été mises en œuvre à partir d'extraits de moules, en utilisant d'une part une approche analytique et d'autre part une approche *in vivo* sur rongeurs et une approche *in vitro* sur cellules β -pancréatiques murines (MIN-6).

L'approche analytique a consisté à rechercher des métaux lourds par spectrométrie de masse à partir du tissu sec de moules.

L'approche *in vivo* a consisté à évaluer sur des rats l'impact d'un gavage avec des extraits lipidiques de moules sur des paramètres plasmatiques (bilan lipidique, glycémie, transaminase, créatinine, urée, acide urique).

L'approche biomarqueurs *in vitro* a consisté à mesurer sur des cellules β -pancréatiques murines (MIN-6) cultivées en conditions normo et hyper-glycémique en présence ou en absence des extraits lipidiques de moules (JL et OL) différents types de marqueurs relatifs aux activités biologiques spontanées, adaptatives et/ou induites de ces cellules : marqueurs d'activités des principaux organites cellulaires (mitochondries, peroxyosomes, lysosomes), marqueurs de stress oxydant, marqueurs de prolifération et de mort cellulaire, sécrétion d'insuline. Les effets des extraits de moules JL et OL ont été comparés par rapport à des extraits de moules d'origine espagnole (ES) destinées à la consommation en France et vendues en grandes surfaces.

Les différents modèles expérimentaux utilisés dans cette étude sont complémentaires.

Si certains sont difficiles à mettre en œuvre dans le cadre d'une surveillance régulière (modèles animaux), les autres (analyses biochimiques, utilisation de cellules MIN-6 comme biomarqueurs)

sont appropriés pour appréhender assez rapidement (délai de l'ordre d'une semaine) l'état de contamination d'un environnement côtier et les risques biologiques potentiels qu'ils pourraient induire.

L'utilisation des cellules pancréatiques murines MIN-6 combinée à une panoplie de tests de cytométrie en flux assez faciles et rapides à mettre en œuvre pourrait constituer un outil intéressant. Cet outil permettrait d'évaluer les risques potentiels associés à la consommation de mollusques, tels que les moules, sur la santé humaine en favorisant le développement de certaines pathologies liées au dysfonctionnement du pancréas comme le diabète qui est à même de favoriser le développement de différentes maladies métaboliques telles que l'obésité et les maladies cardiovasculaires.

Revue de la littérature

1. BIOSURVEILLANCE DU MILIEU COTIER MARIN : APPROCHE ANALYTIQUE

Il est maintenant bien établi que des contaminants chimiques résultant de l'activité humaine et nocifs pour les espèces vivantes (polluants) peuvent se retrouver en concentrations plus importantes dans des organismes aquatiques que dans le milieu environnant ([Goldberg 1975](#); [Andral et al. 2004](#)). Ce phénomène est appelé soit bioaccumulation, bioconcentration ou biomagnification. Les organismes marins accumulant ces polluants peuvent être soit des algues, des invertébrés, des poissons ou des mammifères.

Plusieurs éléments conduisent à s'intéresser à l'étendue de la bioaccumulation et aux substances dites bioaccumulables, en raison de la consommation par l'homme d'organismes contaminés comme les poissons ou les mollusques. En effet, ces derniers peuvent exposer le consommateur à des doses importantes de contaminants et conduire à différentes pathologies plus ou moins sévères.

1.1. Intérêt du suivi de la bioaccumulation de contaminants dans les organismes marins

De nombreux organismes marins accumulent les micropolluants à des concentrations nettement supérieures à celles retrouvées dans leur environnement ([Goldberg 1975](#)). De ce fait, la mesure des taux de contaminants chez ces organismes marins, en tant qu'outil d'évaluation de la contamination des milieux aquatiques, est très largement utilisée ([Claisse 1989](#); [Claisse et al. 1992](#); [Casas et Bacher 2006](#)). Parmi ces organismes, les espèces les plus utilisées sont les bivalves (moules, huîtres) et les poissons. En dehors de la simple évaluation de la contamination du milieu par les micropolluants, la mesure de la bioaccumulation des contaminants chez ces espèces marines permet également d'obtenir des informations concernant les variations géographiques et temporelles des rejets et de composés potentiellement toxiques dans le milieu naturel ([Goldberg 1975](#)).

1.2. Utilisations des bivalves comme outils de surveillance des milieux aquatiques

En 1975, Goldberg a proposé le principe de «bioindicateur quantitatif» qui permet de suivre, à l'échelle internationale, les concentrations des contaminants dans les organismes vivants afin de

surveiller le milieu environnant. Ce principe est basé sur le fait que les organismes marins, partie intégrante de la chaîne alimentaire, concentrent les contaminants, en relation avec les concentrations présentes dans le milieu ([Goldberg 1975](#); [Goldberg et Bertine 2000](#)).

Selon ([Goldberg 1975](#)), pour constituer un bon « bioindicateur quantitatif », l'espèce animale utilisée doit avoir les qualités suivantes:

- Elle doit concentrer le contaminant, sans effet léthal, aux concentrations rencontrées dans le milieu ;
- Elle doit être sédentaire afin d'être représentative de la zone d'étude ;
- Elle doit être abondante dans la zone étudiée ;
- Elle doit avoir une durée de vie suffisamment longue pour permettre l'échantillonnage de plusieurs classes d'âges ;
- Elle doit avoir une taille suffisante afin de donner une quantité de tissus adéquate pour l'analyse chimique ;
- Elle doit concentrer suffisamment pour permettre des dosages sans pré-concentration ;
- Il doit exister une corrélation entre la teneur en contaminants dans l'organisme et la concentration dans l'eau environnante, la concentration dans les tissus reflétant ainsi que la biodisponibilité du contaminant dans le milieu ;

Autant de critères ne se trouvent pas réunies dans une seule espèce et un compromis doit être recherché. C'est dans cet esprit que Goldberg (1975) a proposé le concept de « Mussel Watch », comme première étape dans une surveillance globale du milieu marin.

1.2.1. La moule, *Mytilus sp.*, en tant que bioindicateur

La moule, *Mytilus sp.*, est un bivalve marin utilisé en tant que bioindicateur de la pollution marine. En effet, ces bivalves présentent des caractéristiques qui en font de bons bioindicateurs en raison de :

- Leur large répartition géographique allant des régions tempérées aux régions subarctiques ;
- Leur mode de vie sessile ;
- Leur faculté d'accumuler des métaux présents dans l'environnement dans un facteur de concentration de l'ordre de 10^3 à 10^5 par rapport à l'eau environnante ;
- La stabilité de leur population ;

- Leur tolérance à différents stress ;
- La possibilité de les transplanter ;
- Leur consommation par l'homme qui en fait des vecteurs de contamination.

1.2.1.1. Morphologie et anatomie des *Mytilus sp*

La moule *Mytilus sp* (**Figure 1**) est caractérisée par une coquille pointue à sa partie céphalique que l'on nomme crochet et arrondie à sa partie postérieure. Les deux valves droite et gauche sont identiques et unies par un ligament abducteur le long de la charnière dorsale. L'intérieur des valves est bleuâtre et lisse. Le corps de l'animal et sa coquille sont reliés par les muscles adducteur et rétracteur du pied, et le muscle du siphon anal. La charnière est réduite et constituée de conchyoline. L'animal comprend deux lobes étroitement adhérent au corps dans sa partie dorsale, partiellement soudés dans la zone antérieure, ce qui forme le capuchon céphalique, et élabore dans la zone postérieure une boutonnière qui constitue le siphon exhalant.

Sur la face ventrale, les bords des deux lobes sont libres, délimitant la cavité palléale. En avant du bouton exhalant, on trouve le vélum qui est un tissu conjonctif et musculaire capable de s'étendre et de se rétracter. Le manteau a un rôle dans la circulation de l'eau, il participe à la respiration et accumule des réserves mais son rôle principal est d'assurer la formation de la coquille. Les muscles adducteurs s'opposent à l'action mécanique du ligament, abducteur, et par leur contraction assurent la fermeture des valves. Le pied est une saillie musculaire située au-dessous de la masse viscérale et comprenant la glande byssogène qui occupe sa plus grande partie où elle forme un sillon entouré, sur presque toute sa longueur, d'un épais manchon de cellules glandulaires. Ce sillon aboutit à une cavité byssogène débouchant à l'extérieur par le port pédieux. Le byssus est constitué de nombreux filaments terminés par un disque adhésif. Les branchies sont au nombre de deux et sont des organes de la nutrition et de la respiration.

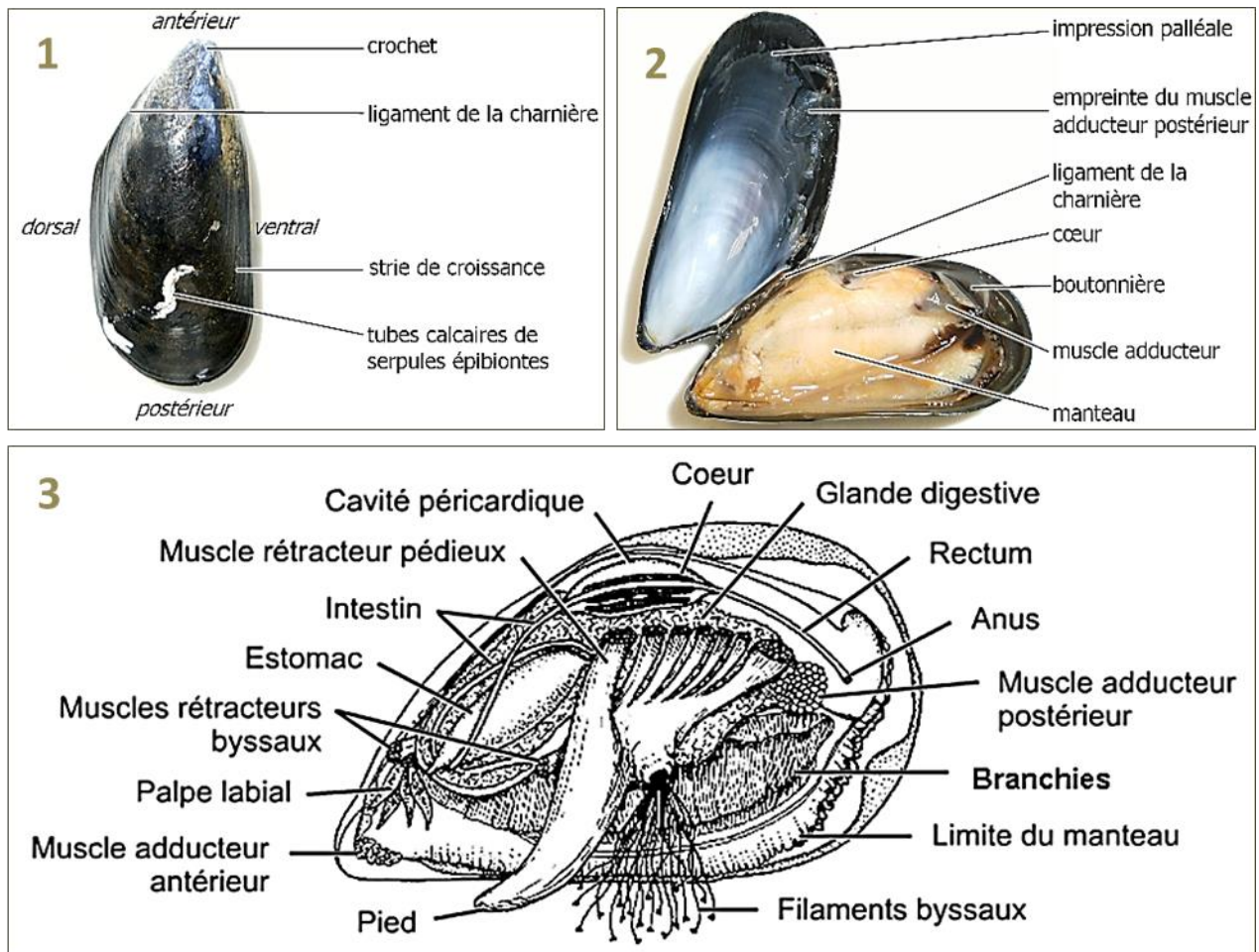


Figure 1 : Morphologie et anatomie de la moule, *Mytilus sp.*

1 : vue latérale de la larve gauche externe, 2 : vue latérale interne, 3 : principaux éléments de l'anatomie de la moule, *Mytilus sp.*

1.2.1.2. Mode de vie de la moule, *Mytilus sp.*

Les mollusques sont des animaux filtreurs, ils se nourrissent principalement du phytoplancton et d'autres matières organiques (**Figure 2**). La croissance de la moule est optimale dans un milieu où la nourriture est riche et abondante. La respiration chez les moules se fait en filtrant activement l'oxygène dissout dans l'eau à l'aide des branchies. Les moules vivent partout dans le monde, dans les eaux polaires, tempérées, peu profondes et légèrement saumâtres. Elles se trouvent également dans des milieux très profonds à forte salinité en haute mer.

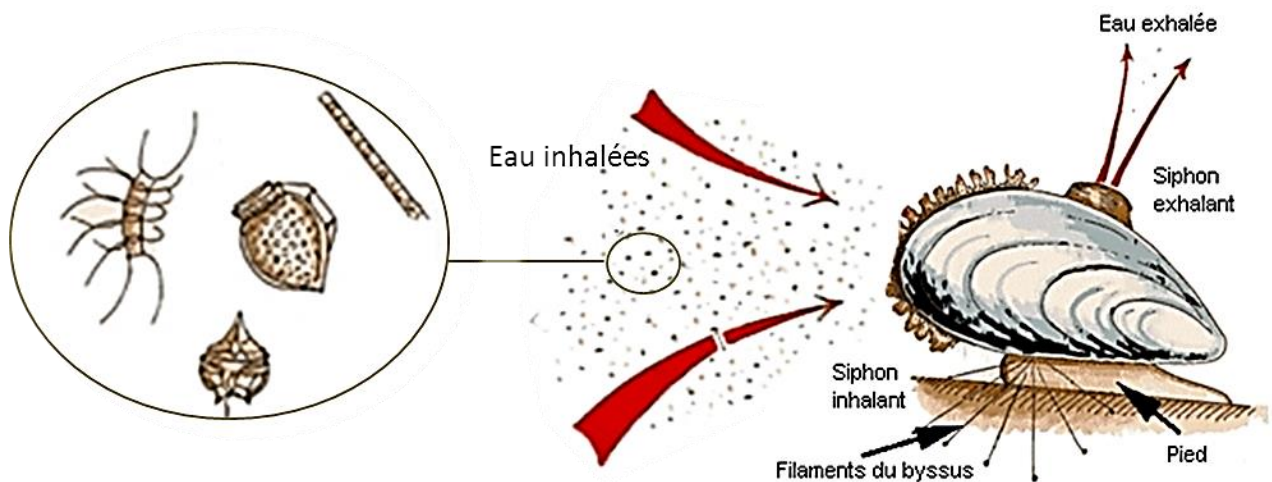


Figure 2 : Mode de vie de la moule *Mytilus* sp.

1.2.2. Stratégies utilisées dans les programmes de surveillance des milieux aquatiques

Les moules sont très largement utilisées dans divers programmes de surveillance visant à établir la variabilité spatiale et temporelle des contaminants dans l'environnement marin côtier ([Cantillo 1998](#)).

Les stratégies de surveillance développées sont diverses. L'utilisation de mollusques et de poissons relativement sédentaires est plus couramment développée dans les programmes de surveillance ([OSPAR 2008](#)) « Oslo-Paris ». L'utilisation de moules proposée sous le vocable «Mussel Watch» ([Goldberg 1975](#)) a été mise en place avec succès sous deux aspects:

- Biosurveillance passive (méthode *in situ*): utilisant les populations indigènes de moules sauvages ou cultivées (cas du RNO : Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin) ([Claisse 1989](#); [Claisse et al. 1992](#)).
- Biosurveillance active (méthode des transplants) : recourant aux transplants de moules provenant d'un site de référence (RINBIO : Réseau Intégrateurs Biologiques), sur un site d'étude pour un séjour de plusieurs mois dans l'eau ([Casas et Bacher 2006](#); [Andral et Stanisiere 1998](#)) .

Les Avantages et les inconvénients de chaque stratégie sont résumés dans le **Tableau I**.

Tableau I : Avantages et limites de la Biosurveillance passive et de la Biosurveillance active

Biosurveillance passive (méthodes <i>in situ</i>)	Biosurveillance active (méthode des transplants)
Avantages	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Niveaux d'accumulation généralement supérieurs aux seuils de détection car le temps d'exposition est plus long ▪ Faible risque de vandalisme et surveillance des stations non nécessaire ▪ Coût du transport et des analyses réduit ▪ Les résultats peuvent être obtenus en quelques jours 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Densité des sites, localisations et espèces au choix ▪ Taux de déposition calculé à partir du temps d'exposition ▪ Utilisation d'organismes provenant non contaminé ▪ Taux en polluants reliées directement à la pollution ▪ Les temps d'exposition des transplants sont plus longs
Limites	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Manque éventuel d'échantillons ▪ Faux positifs dus aux stress multiples ▪ Réponses sous l'influence d'autres facteurs 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Concentrations et niveaux d'accumulation indétectables sur une courte période ▪ Risque éventuel de vandalisme ▪ Coûts supplémentaires pour le matériel, le transport et la préparation et maintenance des transplants

1.3. Les contaminants chimiques recherchés chez les bioindicateurs

La recherche de polluants dans les tissus des organismes marins utilisés comme bioindicateurs peut nécessiter au préalable de déterminer la liste exhaustive des composés xénobiotiques déversés dans le milieu marin, altérant les écosystèmes marins et susceptibles d'être accumulés par les organismes. Ces polluants seront alors suivis en priorité dans le cadre d'un réseau de surveillance de la qualité des eaux littorales. Ils sont regroupés ont huit principales catégories de contaminants faisant l'objet de normes de rejet ou d'interdiction de rejet :

- Les détergents,
- Les hydrocarbures polyaromatiques,
- Les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques,
- Les métaux lourds,

- Les pesticides et antifouling (peinture dite « *antisalissure* » contenant des biocides destinés à empêcher les organismes aquatiques de se fixer sur la coque des navires ou sur d'autres objets immergés),
- Les composés organo-halogénés et organochlorés,
- Les composés organométalliques,
- Les radioisotopes.

Aux 8 grands types de polluants retenus précédemment, il faut ajouter les traces de pétrole brut, les nitrates et phosphates. Ces deux derniers composés doivent faire l'objet d'une surveillance particulière en milieu estuarien et lagunaire, en raison des phénomènes d'eutrophisation qui leur sont liés. Il est à noter que les nitrates et phosphates sont réglementairement mesurés dans les eaux sortant des stations d'épuration. Sur les organismes vivants (invertébrés essentiellement), seul le dosage du phosphore total permet d'apporter des informations pertinentes en termes de qualité du milieu marin.

Effets des contaminants sur les organismes marins

1.3.1. Les nutriments

Les éléments nutritifs comme les nitrates et les phosphates résultent de l'utilisation massive de fertilisants. Ces éléments sont apportés dans le milieu marin par les déversements d'eaux usées, les rejets industriels, le ruissellement, l'érosion terrestre ou par les échanges avec l'atmosphère ([Smith 2003](#); [Zhai et al. 2009](#)).

Le phosphore et l'azote jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la productivité primaire. Le confinement des eaux marines accentue les risques d'eutrophisation ([Tett et al. 2007](#)). Ses effets se traduisent à long terme par un changement dans la répartition des espèces (ex : les flagellés par rapport aux diatomées) ou par une inversion dans le rapport production/respiration. Cette eutrophisation est aussi à l'origine de prolifération intense (phénomène de "blooms") d'algues sécrétant des toxines qui causent des dommages aux populations piscicoles ou qui sont préjudiciables à la santé humaine ([Anderson et al. 2008](#)).

1.3.2. Les métaux

Si certains métaux (oligo-éléments) sont souvent indispensables au déroulement de processus biologiques, nombre d'entre eux peuvent s'avérer toxiques, lorsque leur concentration dépasse

un seuil, c'est le cas du Fe, Cu, Zn, Ni, Se, Mo et Mn ([Francesconi et Duvoisin 1998](#)). D'autres ne sont pas nécessaires à la vie et sont d'emblée néfastes quand leur concentration augmente ; c'est le cas pour Al, As, Cd, Cr, Hg, Pb et ([McLaughlin et al. 1999](#)).

1.3.2.1. L'Arsenic (As)

L'arsenic est un sous-produit de la métallurgie. Il existe sous différentes formes de composés inorganiques et organiques ([Sharma et Sohn 2009](#)). Dans l'eau, les formes inorganiques trivalente (As^{3+}) et pentavalente (As^{5+}) sont les plus communes ([Szincz et Forth 1988](#); [Rahman et al. 2012](#)).

Les organismes marins et certaines plantes sont capables de concentrer des quantités importantes d'As. La forme de stockage est constituée surtout par l'arsénobétaine, des complexes organo-arsenicaux, des arseno-sucres et des dérivés azotés ou phosphorés. Les dérivés inorganiques de l'As sont métabolisés en dérivés As^{3+} et As^{5+} , en acide monométhylarsénique (MMA) ou diméthylarsénique (DMA).

La toxicité d'As augmente en fonction inverse de sa vitesse d'élimination, donc du degré d'accumulation dans les tissus. Elle suit l'ordre suivant : arsenicaux organiques < As^{5+} < As^{3+} < As^0 . ([Szincz et Forth 1988](#); [Rahman et al. 2012](#)). Le mécanisme de toxicité d' As^{3+} est thiolooprive (bloque les groupements thiols de nombreuses enzymes) et exerce un blocage de l'oxydation du pyruvate en acétate au niveau de l'acide lipoïque. Il en résulte une accumulation d'acide pyruvique dans le sang. L' As^{5+} est un découpleur de la phosphorylation oxydative mitochondriale (arsenolyse) ([Poëy et Philiber 2000](#)).

1.3.2.2. Le Cadmium (Cd)

Le Cadmium est principalement un sous-produit de l'industrie métallurgique du zinc, sous forme de sulfure de Cd en association avec du sulfure de zinc, mais également du plomb, du cuivre ou des phosphates, aussi bien lors de l'extraction, que de la fonte ou du raffinage de ces minerais ([Andujar et al. 2010](#)).

Le Cd est une substance toxique cumulative dont la demi-vie dans l'organisme est d'environ 20 à 40 ans. Il est principalement stocké dans le foie et les reins ([Nordberg et Nordberg 1987](#)). L'intoxication chronique au Cd provoque principalement une tubulopathie rénale et pourrait être à l'origine d'une ostéomalacie et d'une ostéoporose diffuse. Le Cd est classé comme agent cancérigène certain pour l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer

(CIRC). Les dommages engendrés par l'exposition au Cd proviennent non seulement de l'inactivation de diverses molécules antioxydantes mais aussi de l'interférence du métal avec d'autres systèmes impliqués dans la régulation de l'homéostasie Redox et de l'homéostasie de métaux essentiels comme le zinc et le cuivre. L'exposition au Cd dans des pathologies associant un stress oxydant (cancers, maladies neurodégénératives, maladies rénales et osseuses, ...) peut conduire à les potentialiser ([Nzengue et al. 2011](#)). Le Cd provoque aussi un déséquilibre des activités anti-oxydantes en régulant négativement la synthèse des facteurs comme le glutathion réduit (GSH) et les métallothionéines (MTs) ([Jomova et Valko 2011](#)). C'est ce déséquilibre qui est à l'origine de l'augmentation du stress oxydant et qui explique la sensibilité et la forte mortalité cellulaire induite par le Cd ([Jomova et Valko 2011](#)).

1.3.2.3. Le Chrome (Cr)

Le Chrome à faible dose, est un élément essentiel présent dans les tissus sous forme Cr^{3+} , Il est nécessaire pour potentialiser la sécrétion de l'insuline ([Vincent 2010](#)). La toxicité du Cr est surtout due aux dérivés hexavalents qui sont très solubles dans l'eau et pénètrent facilement dans l'organisme par toutes les voies ([Proctor et al. 2002](#)).

Le poumon est l'organe cible du Cr dont l'action cancérogène bronchique est reconnue depuis plus de 30 ans ([Singh et al. 1998](#)). Une intoxication aiguë peut aussi provoquer une tubulonéphrite, quant à une intoxication chronique au Cr elle peut aussi favoriser le développement de lésions cutanées et des muqueuses avec atteintes respiratoires. Le Cr (VI) (chrome hexavalent ; 6^e état d'oxydation du Cr) pénètre dans les cellules grâce au système de transport des ions. Une fois à l'intérieur de la cellule il est réduit en Cr(III) (chrome trivalent ; 3^e état d'oxydation du Cr) par des agents chélateurs (**Figure 3**). Cette réaction de chélation génère des formes intermédiaires du Cr qui forme des adduits Cr-ADN, susceptible d'induire des dommages de l'ADN ([Goodale et al. 2008](#); [Jomova et Valko 2011](#)).

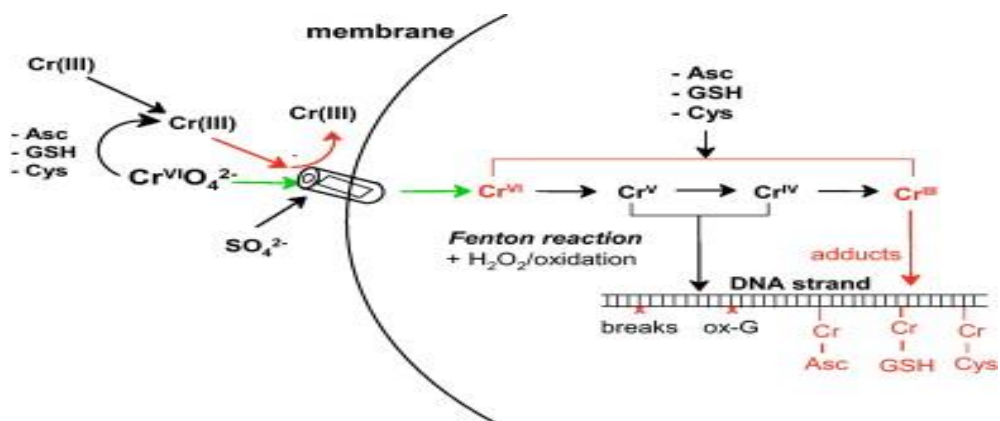


Figure 3 : Mécanismes d'absorption et dommages du Cr(VI) sur l'ADN (Jomova et Valko 2011)

1.3.2.4. Le Mercure (Hg) :

Le Mercure est le seul métal liquide à température ambiante. Grâce à ses propriétés physicochimiques, en particulier sa grande volatilité, le Hg d'origine naturelle (provenant du dégazage de la croûte terrestre) ou anthropique (mines, industries) circule dans l'ensemble des milieux naturels : air, eau, sol, sédiments.

En milieu aquatique, Hg est sous sa forme méthylée (MeHg) (Bensefa-Colas et al. 2011). Cette forme possède la capacité de s'accumuler dans les organismes (bioaccumulation) et de se concentrer tout au long de la chaîne alimentaire (bioamplification), en particulier chez les poissons et mammifères marins prédateurs (UNEP 2002; Bensefa-Colas et al. 2011). La toxicité aiguë du Hg chez les mollusques varie de 5 $\mu\text{g/L}$ à plus de 5 000 $\mu\text{g/L}$ (Marchand et Kantin 1997). Les larves et les embryons figurent parmi les plus sensibles. Hg est donc considéré comme un élément extrêmement toxique pour la vie aquatique puisque les doses létales les plus basses sont inférieures à 10 $\mu\text{g/L}$ à certains stades du développement d'espèces déjà constatées comme très sensibles (Wells et al. 1999). Les concentrations sans effet sont inférieures à 1 $\mu\text{g/mL}$. Pour des teneurs inférieures à 10 $\mu\text{g/L}$, différents effets sublétaux peuvent se manifester comme une perturbation de la respiration, un retard de croissance et des effets sur la reproduction.

La consommation de poissons et mammifères marins contaminés représente la principale source d'exposition humaine au MeHg. La concentration en Hg présente dans le poisson varie selon l'espèce entre 0,05 à 1,4 mg/kg (UNEP 2002). Les premiers accidents écologiques très sérieux sont illustrés par la dramatique intoxication de villageois survenue entre 1953 et 1956 dans la Baie de Minamata au Japon. Elle faisait suite à la consommation de poissons et coquillages

contaminés par le MeHg formé à partir du sulfate mercurique rejeté par une usine de production d'acétaldéhyde ([Bensefa-Colas et al. 2011](#)).

L'activité cytotoxique du Hg est liée à sa grande affinité pour le soufre, entraînant le blocage des fonctions thiol (-S-H) des protéines, des peptides (glutathion) ou des acides aminés soufrés (cystéine). ([Kim et Sharma 2003](#)). Hg inhibe aussi le système Redox en agissant sur les enzymes ayant Zn comme co-enzyme du fait d'une compétition entre ces deux métaux ; l'affinité du MeHg avec la fonction thiol du GSH bloque son oxydation en GSSG. ([Ahmad et al. 2012](#)).

1.3.2.5. Le Plomb (Pb)

Le plomb, grâce à ces propriétés physico-chimiques exceptionnelles est utilisé dans divers applications industrielles ([Brannvall et al. 1999](#)). L'activité des fonderies et des incinérateurs d'ordures ménagères, de la combustion de l'essence (anti-détonant) sont sources de contamination par le Pb. Ce dernier, à cause de son caractère persistant est très toxique ([Kumar et Scott Clark 2009](#)).

La toxicité des dérivés organiques du Pb est généralement supérieure à celle des formes inorganiques. Des effets sur le métabolisme respiratoire d'organismes marins ont été décrits ainsi que des effets sur le système nerveux. Plusieurs recherches ont prouvé que le Pb peut causer non seulement des troubles neurologiques, mais aussi hématologiques, immunologiques, gastro-intestinaux et perturber la fonction reproductive ([Patrick 2006](#)). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a fixé les concentrations inhibitrices du Pb pour la croissance des diatomées entre 1 et 4,4 µg/L. Le règlement européen CE 221/2002 fixe le seuil de qualité sanitaire réglementaire à 1,5 mg/kg d'alimentation.

Le mécanisme de toxicité du Pb est semblable à celui des autres métaux toxiques persistants (As, Cd et Hg). Le Pb cause des dommages sur les composants cellulaires par l'intermédiaire de production des niveaux élevés en espèces réactives de l'oxygène (ERO). Son caractère compétitif avec les oligo-éléments inhibe plusieurs enzymes du système Redox ([Jomova et Valko 2011](#)).

1.3.3. Les pesticides

Les pesticides constituent un groupe très hétérogène de substances chimiques adaptées à la lutte contre les plantes et les animaux indésirables : herbicides, fongicides, insecticides, acaricides, nématicides et rodenticides, principalement ([Cherin et al. 2012](#)).

Ces produits phytosanitaires possèdent tous une toxicité, d'intensité variable, pour l'homme. La toxicité aiguë des pesticides résulte d'une mauvaise utilisation, d'un usage accidentel des pesticides (accidents domestiques) ou d'une intoxication volontaire souvent gravissime. Les pesticides organophosphorés et les carbamates sont à l'origine des cas d'empoisonnements par les pesticides les plus fréquents. L'exposition se fait essentiellement par voie cutanéo-muqueuse et respiratoire. La voie d'exposition orale concernerait davantage la population générale par ingestion accidentelle ou intentionnelle de pesticides. Selon l'OMS, il y a chaque année dans le monde un million d'empoisonnements graves par les pesticides, à l'origine d'environ 220 000 décès par an ([Cherin et al. 2012](#)).

1.3.4. Les hydrocarbures halogénés

Les polychlorobiphényles (PCBs) sont des substances persistantes dans l'environnement largement répandues à la surface du globe à cause de leur large utilisation industrielle (lubrifiants, peintures, plastifiants, isolants électriques, ...) ([Nakari et Huhtala 2008](#)).

Les organismes aquatiques semblent plus sensibles que les autres aux PCBs ([Rahman et al. 2001](#)). Des échelons très divers des chaînes trophiques sont affectés par ces composés. La croissance des algues est inhibée alors que les mollusques semblent relativement résistants ([Björk et Gilek 1997](#)). Les PCBs sont également toxiques pour les poissons, notamment pour les jeunes. Chez les adultes, il se produit une bioaccumulation de PCBs en particulier dans les gonades ce qui peut altérer la fonction reproductive (immaturité sexuelle, troubles hormonaux) et engendrer des effets tératogènes ([Nakari et Huhtala 2008](#)).

1.3.5. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont des constituants naturels du charbon et du pétrole, ou qui proviennent de la combustion incomplète de matières organiques telles que les carburants, le bois, le tabac. Ils sont présents dans l'air, l'eau ou l'alimentation.

L'aspect génotoxique (mutagène) et cancérigène des HAPs est au premier plan de leurs propriétés toxiques. Les effets toxiques des HAPs sur le système de reproduction des organismes marins ont été démontrés en laboratoire et en milieu naturel, en particulier sur les poissons benthiques (poissons du bord de mer) ([Johnson et al. 2002](#)). Le benzo[a]pyrène, substance qui

se trouve dans un bon nombre de mélanges de HAPs en proportion relativement constante (environ 10%), est un cancérogène avéré ([IARC 2010](#)).

1.4. Limite de l'approche analytique basée sur les bioindicateurs

Les méthodes analytiques en vigueur dans les laboratoires d'analyses de routine font le plus souvent appel à des méthodes multi-résidus avec des seuils de détection de l'ordre du µg (variable selon les polluants recherchés) sans relation avec l'écotoxicité des substances. Les récents développements en chimie analytique montrent qu'il est actuellement possible, d'un point de vue technique, de mesurer plusieurs de ces molécules à l'état de trace avec des seuils de sensibilité très performants. Toutefois, cette approche fait appel à un appareillage conséquent (e.g. méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse) et reste encore très coûteuse dans une optique de surveillance en routine. De plus, l'approche analytique reste limitée au fait qu'elle ne permet de mesurer que des molécules déjà identifiées comme étant problématiques. En effet, certains contaminants analytiques peuvent avoir des demi-vies courtes et subir des transformations rendant leur détection aléatoire.

2. LES BIOMARQUEURS POUR LA SURVEILLANCE DE LA QUALITE DE L'ENVIRONNEMENT MARIN

Les biomarqueurs sont définis comme des mesures biologiques de réponse et d'effets de polluants sur des organismes aquatiques. C'est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant ([Galloway 2006](#); [Hagger et al. 2008](#)).

2.1. Les catégories des biomarqueurs

Il existe trois catégories de biomarqueurs ([Aitio et al. 2007](#); [Nordberg 2010](#)) :

* **Biomarqueur d'exposition** : indique que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme. Généralement, il est le résultat d'interactions avec des molécules naturelles ou avec des liquides biologiques. C'est par exemple le cas des adduits de l'ADN.

* **Biomarqueur d'effet** : indique, qu'après avoir pénétré, le polluant se répand dans les différents tissus, en exerçant des effets toxiques ou non. Les indices généraux de ce stress, dits «non

spécifiques», décrivent les effets provoqués par un grand nombre de facteurs de stress. Des biomarqueurs dits «spécifiques» peuvent donner des réponses à une classe particulière de xénobiotiques.

* **Biomarqueur de résistance** : est définie comme une diminution de la sensibilité aux xénobiotiques.

2.2. Les différents biomarqueurs de pollution chez les bivalves

Les biomarqueurs ont été identifiés comme des approches puissantes et rentables pour obtenir des informations sur la santé de l'environnement et sur les effets de polluants sur les ressources vivantes. Le concept de réponses des biomarqueurs, repose sur la connaissance des mécanismes biochimiques et physiologiques, qui précèdent des modifications visibles des organismes et des populations. Ainsi, une batterie de biomarqueurs, combinée avec une sélection d'analyses chimiques, pourrait être la base d'une approche holistique (approche globale) pour l'évaluation de la santé des écosystèmes ([Orbea et Cajaraville 2006](#); [Sureda et al. 2011](#); [Box et al. 2007](#)).

Les marqueurs les plus utilisés sont présentés en fonction de la précocité de la réponse (effets génotoxiques, atteintes sub-létales biochimiques, cytologiques et physiologiques).

2.2.1. Marqueurs de génotoxicité

La structure complexe du génome peut être modifiée par des agents dits «génotoxiques». Ces modifications peuvent être observées par l'analyse directe de la structure de l'ADN ou par la détection de leurs traductions fonctionnelles. Ces analyses chez des individus sauvages peuvent permettre d'évaluer la présence d'agents toxiques, et constituer de bons biomarqueurs de la qualité biochimique d'un individu, d'une population, voire d'un écosystème.

Certains xénobiotiques peuvent induire suivant les cas deux types d'altérations susceptibles d'être utilisées comme biomarqueurs. La première correspond à la formation de produits d'addition entre le xénobiotique et les nucléotides, appelés adduits. La deuxième correspond à des cassures au niveau d'un seul brin, ou des deux brins, d'ADN conduisant parfois à la formation de micronoyaux ([Dixon et al. 2002](#)). Un autre type de modification du génome, qui correspond à l'induction ou à la suppression de l'expression de certains gènes, appelés oncogènes, pouvant aboutir, tout comme les altérations précédemment citées, à la formation et au développement de tumeurs malignes ou de désordres physiologiques ([Romeo et al. 2003](#)).

2.2.2. Les métallothionéines

Parmi les réponses aux effets toxiques des ions métalliques, la surproduction des métallothionéines (MTs) a été observée chez certaines espèces après qu'elles aient été exposées à des doses sub-létales en métaux lourds, d'où l'idée d'utiliser ces protéines comme «marqueurs de pollution» ([Amiard et al. 2006](#); [Fasulo et al. 2008](#)). Les MTs sont des métalloprotéines, à faible poids moléculaire (<10 KDa), de 25 à 64 acides aminés. Les cystéines (Cys) représentent environ 30 % des acides aminés. Les interactions ioniques sont établies avec les Cys qui occupent des positions caractéristiques dans la séquence d'acides aminés ([Templeton et Cherian 1991](#); [Mao et al. 2012](#)). La captation ionique est due à la formation de complexes métal-thiolates. Les deux rôles les plus communément attribués aux MTs sont principalement, le contrôle de l'homéostasie intracellulaire des ions métalliques essentiels (Cu^{2+} et Zn^{2+}) et la détoxification de la cellule par rapport à un stress provoqué par les ions métalliques toxiques. Chez les moules et les huîtres, les MTs et les concentrations en métaux sont généralement bien corrélées ([Amiard et al. 2006](#); [Mao et al. 2012](#)). L'expression de MTs dépend aussi des facteurs biotiques et abiotiques, notamment l'état physiologique de l'animal lié à des variations saisonnières. La salinité influe aussi l'absorption de métaux et donc l'expression de MTs ([Mao et al. 2012](#)).

2.2.3. Le stress oxydant

En situation physiologique, il y a un équilibre entre la production des ERO, des espèces réactives de l'azote (ERN) et les systèmes de défenses anti-oxydantes. Les ERO, ERN et autres petites molécules réactives sont d'importants régulateurs de nombreux processus physiologiques et pathologiques ([Storey 1996](#); [De Almeida et al. 2007](#)). Les ERO et ERN comprennent entre autre le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (O), le monoxyde d'azote (NO), le peroxyde d'azote (ONOO^{\bullet}), le radical alcoyle (RO^{\bullet}), et les radicaux peroxydes (ROO^{\bullet}). Ce sont des espèces transitoires en raison de leur grande réactivité chimique avec l'ADN, les protéines, les glucides et les lipides ([Storey 1996](#)).

L'étude des différents systèmes liés au stress oxydant chez les organismes marins peut donner des informations importantes à propos de leur état physiologique et indirectement sur la qualité de l'environnement ([Livingstone 2001](#); [Pytharopoulou et al. 2008](#)). D'autres paramètres environnementaux indirectement liés à la pollution, comme la température et la salinité peuvent provoquer des changements importants de ces paramètres.

L'augmentation de la production d'ERO et ERN dans les organismes peut aussi résulter de la biotransformation des xénobiotiques organiques, puisqu'une grande quantité d'O₂^{•-} et H₂O₂ peut être générée au cours des réactions de biotransformations ([Cesaratto et al. 2004](#); [Zangar et al. 2004](#)).

Il existe de nombreux systèmes cellulaires de protection contre les effets des ERO et ERN. Un ensemble de composés, dits "piégeurs de radicaux libres" susceptibles de ralentir considérablement les réactions d'oxydation en chaîne, constitue une ligne de défense. Ce système de protection est à la fois cytosolique (glutathion, acide ascorbique) et membranaire (α -tocophérol, vitamine A) ([De Almeida et al. 2007](#)) (**Figure 4**). Le glutathion, en plus de son rôle de co-substrat dans les réactions de conjugaison, est un anti-oxydant très puissant. Le deuxième type de défense contre les ERO et les ERN est constitué par les systèmes enzymatiques. Il comprend les enzymes chargées d'éliminer les formes actives de l'oxygène comme la superoxyde dismutase (SOD) qui dismute l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est ensuite éliminé par la catalase ou une autre peroxydase comme la glutathion peroxydase ([De Almeida et al. 2007](#)). Cette dernière est aussi chargée d'éliminer les peroxydes organiques. Elle réagit avec les peroxydes en présence de glutathion réduit (GSH) ([Hebbel 1986](#)). Le glutathion oxydé (GSSG) résultant de la réaction est de nouveau réduit par la glutathion réductase avec consommation de NADPH ([Hasspieler et al. 1994](#)).

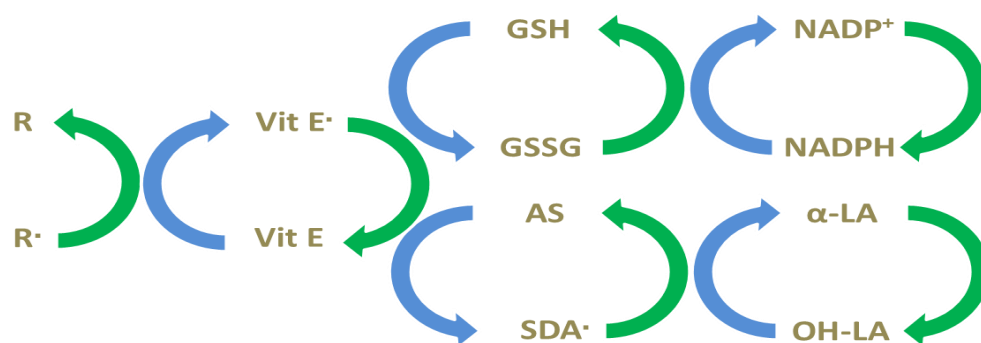


Figure 4 : Réaction d'oxydoréduction. Adapté de Ji JJ, *Free Radic Biol Med*, 1995 ([Ji 1995](#))

R•, radical libre ; Vit E, vitamine E ; Vit E•, radical de vitamine E ; ASC, ascorbate ; SDA•, semialdéhyde ascorbate ; α -LA, acide α -lipoïque ; OH-LA, dihydrolipoate.

2.2.4. La peroxydation lipidique

Les attaques radicalaires peuvent se produire de façon importante au niveau des membranes cellulaires riches en lipides, notamment les acides gras insaturés. Le processus de peroxydation lipidique (**Figure 5**) est une réaction en chaîne déclenchée par des attaques radicalaires des acides gras conduisant à la formation d'hydroperoxydes lipidiques (LOOH) ([Valko et al. 2006](#)). La peroxydation lipidique conduit à la formation de produits de dégradation tels que les alcanes et les aldéhydes principalement le dialdéhyde malonique (MDA). Ce dernier est mutagène sur les cellules bactériennes et de mammifères ; il est cancérigène chez le rat ([Marnett 1999](#)).

Plusieurs études ont montré la capacité de certains contaminants du milieu marin d'induire des stress oxydants cellulaires. Cependant, l'utilisation de marqueurs issus de la peroxydation lipidique reste relativement limitée. Des recherches complémentaires sont encore nécessaires afin de valider l'utilisation de cet outil comme biomarqueur.

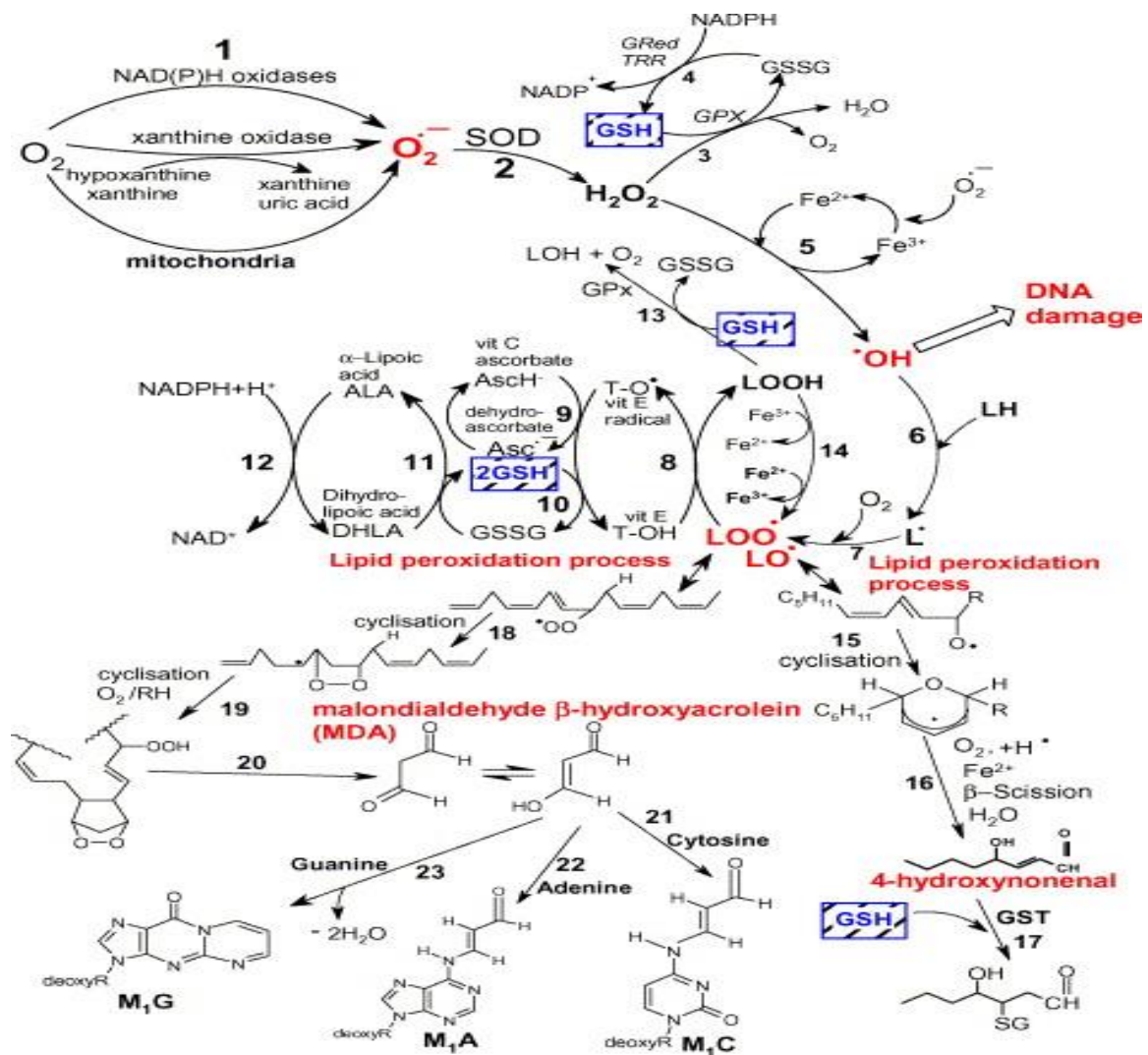


Figure 5 : Processus de la peroxydation lipidique et rôle du système de défense antioxydant dans la gestion du stress oxydant (Valko et al. 2007)

2.2.5. Les systèmes lysosomaux

La mesure des fonctions lysosomales permet d'intégrer de multiples facteurs de stress (Marigomez et Baybay-Villacorta 2003; Raftopoulou et Dimitriadis 2012). (Marigomez et al. 2005). Les lysosomes contiennent une trentaine d'enzymes différentes et peuvent séquestrer plusieurs types de contaminants (Raftopoulou et Dimitriadis 2010). Les complexes liposolubles, ou peu polaires, sont accumulés dans les lysosomes. La fragilité de la membrane lysosomale observée en présence de micropolluants peut s'expliquer par une augmentation des activités enzymatiques de détoxification qui sont susceptibles d'entraîner une bioactivation du polluant et une surproduction de radicaux libres qui endommageraient la membrane lysosomale. Plusieurs

paramètres peuvent être utilisés pour appréhender une atteinte du système lysosomal ([Raftopoulou et Dimitriadis 2012](#)):

- Changements du volume des lysosomes ;
- Accumulations de lipides et de lipofuschine (pigment considéré comme associé au stress et au vieillissement cellulaire) ;
- Déstabilisation de la membrane lysosomale altérant le fonctionnement cellulaire ;
- Inhibition des pompes à protons, qui permettent de maintenir le pH acide nécessaire au bon fonctionnement des hydrolases.

La moule représente aujourd'hui le matériel privilégié pour l'utilisation de ce biomarqueur lysosomal. Des études expérimentales réalisées sur différentes espèces de moules, ([Kagley et al. 2003](#)) ont permis d'observer de fortes modifications du système lysosomal (réduction de la stabilité des membranes lysosomales, dépôts de lipofuschine et accumulation de lipides insaturés dans les lysosomes et le cytoplasme) chez des moules exposées à une importante pollution urbaine.

2.3. Limites de l'approche biomarqueurs chez les bioindicateurs

A l'instar de leur utilisation chez l'homme pour évaluer un risque vis-à-vis de la santé, plusieurs auteurs proposent l'intégration des biomarqueurs dans des démarches d'évaluation du risque environnemental ([Hagger et al. 2008](#)) tandis que d'autres mettent l'accent sur leur limites ([Forbes et al. 2006](#)).

Les principales limitations des mesures de biomarqueurs dans l'évaluation de la qualité des écosystèmes sont principalement, la difficulté à discriminer entre réponses adaptatives «naturelles» et réponses au stress chimique, à extrapoler des réponses d'une échelle d'organisation biologique à une autre (cellule-individu-population-communauté) et d'une espèce à une autre.

Le manque de connaissances sur la biochimie, la physiologie et le comportement des organismes aquatiques sentinelles utilisés et sur l'amplitude des réponses attendues dans un contexte physiologique normal, limite en effet souvent l'intérêt des biomarqueurs comme signature d'un stress pouvant être dû à des causes biotiques ou abiotiques, d'origine naturelle ou anthropologique.

Un autre verrou pratique concernant la mise en œuvre et l'interprétation des biomarqueurs comme indicateurs d'exposition au stress chimique porte sur la concordance des phases de réponses du biomarqueur avec la présence de la pollution que l'on veut mesurer. Ainsi, certains biomarqueurs intégreront mal des variations temporelles de la contamination. La mesure de leur modulation sera dépendante d'un échantillonnage adapté aux épisodes de pollution. Certains marqueurs de génotoxicité et de perturbation endocrinienne sont par exemple susceptibles «d'adaptation», et de décroître avec la durée d'exposition. De même, la plupart des biomarqueurs se révèlent réversibles avec le temps lorsque l'exposition cesse ou diminue.

3. CONTAMINATION CHIMIQUE DES ALIMENTS MARIN ET MALADIE METABOLIQUES CHEZ L'HOMME

3.1. Contexte et enjeux

La pollution chimique environnementale pourrait jouer un rôle important dans diverses pathologies. Au cours de ces dernières décennies, la prévalence de diverses affections chroniques comme l'asthme ou les allergies a beaucoup augmentée et a été associée à une augmentation de la pollution de l'air ([Ho et al. 2007](#)). Si la relation entre certains polluants et cancers est avérée, il n'en est pas de même pour d'autres pathologies lourdes comme le syndrome métabolique conduisant au diabète de type 2, à l'obésité et à des maladies cardiovasculaires ([Ambolet-Camoit et al. 2010](#); [Pierre et al. 2011](#); [Barouki 2011](#); [Ambolet-Camoit et al. 2012](#); [Polyzos et al. 2012](#)).

3.2. Polluants Organiques persistant (POPs) et maladies métaboliques

L'incidence et la prévalence des maladies métaboliques atteint des proportions que l'on peut qualifier d'épidémiques dans la plupart des pays développés et sont en constante augmentation dans les pays en voie de développement qui ne sont pas épargnés par ce grave problème de santé publique ([Thayer et al. 2012](#)). L'analyse classique de cette maladie repose sur le constat d'un déséquilibre croissant entre une alimentation trop énergétique et une dépense physique insuffisante, aggravé chez certains sujets par une susceptibilité génétique et par des facteurs psychosociaux. A ces facteurs de risque déjà identifiés, s'ajoute désormais le rôle des polluants présents dans l'environnement et dans l'alimentation (métaux lourds et toxiques, bisphénol A, phtalates, pesticides, PCB, ...) ([Nalbone et al. 2011](#)).

Des études épidémiologiques récentes montrent que l'exposition chronique à de faibles doses de polluants organiques persistants (POPs) pourrait jouer un rôle important, mais encore mal caractérisé, dans différentes pathologies, dont les maladies métaboliques ([Boyles et al. 2011](#); [Howell et Mangum 2011](#)). Une étude réalisée en 2006 sur plus de 2 000 sujets, a mis en évidence une corrélation entre la quantité de 6 POPs trouvés dans le sérum de 80 % des participants et la prévalence du diabète ([Lee et Jacobs 2006](#)). Une étude similaire réalisée dans une population japonaise a conclu à une augmentation des maladies métaboliques avec la concentration sanguine de plusieurs contaminants environnementaux : dioxines, PCBs et PCDFs ([Uemura et al.](#)

2009). Plus récemment, une association a été montrée entre la concentration en bisphénol A, les maladies cardiovasculaires et le diabète (Lang et al. 2008).

3.3. Métaux toxiques et maladies métaboliques

La capacité des métaux à perturber la sécrétion de l'insuline a aussi été rapportée dans les années 1970. La synthèse la plus récente et la plus complète a été publiée en 2009 (Chen et al. 2009), le lien est clairement démontré entre diabète et métaux (Cd, Hg et As) (Figure 6). Le fait que ce lien subsiste après ajustement sur l'Indice de Masse Corporel (IMC) signifie que l'induction de diabète n'est pas une simple conséquence de l'obésité mais repose sur des mécanismes spécifiques où le stress oxydant prend une part importante. Parmi les mécanismes cellulaires impliqués dans la cytotoxicité des métaux lourds, on retiendra essentiellement l'altération du statut Redox avec une augmentation de la production de radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et l'activation des voies pro-apoptotiques et pro-inflammatoires dont les rôles ont été soulignés dans le diabète et le syndrome métabolique (Chen et al. 2009; Flora 2011; Valko et al. 2005).

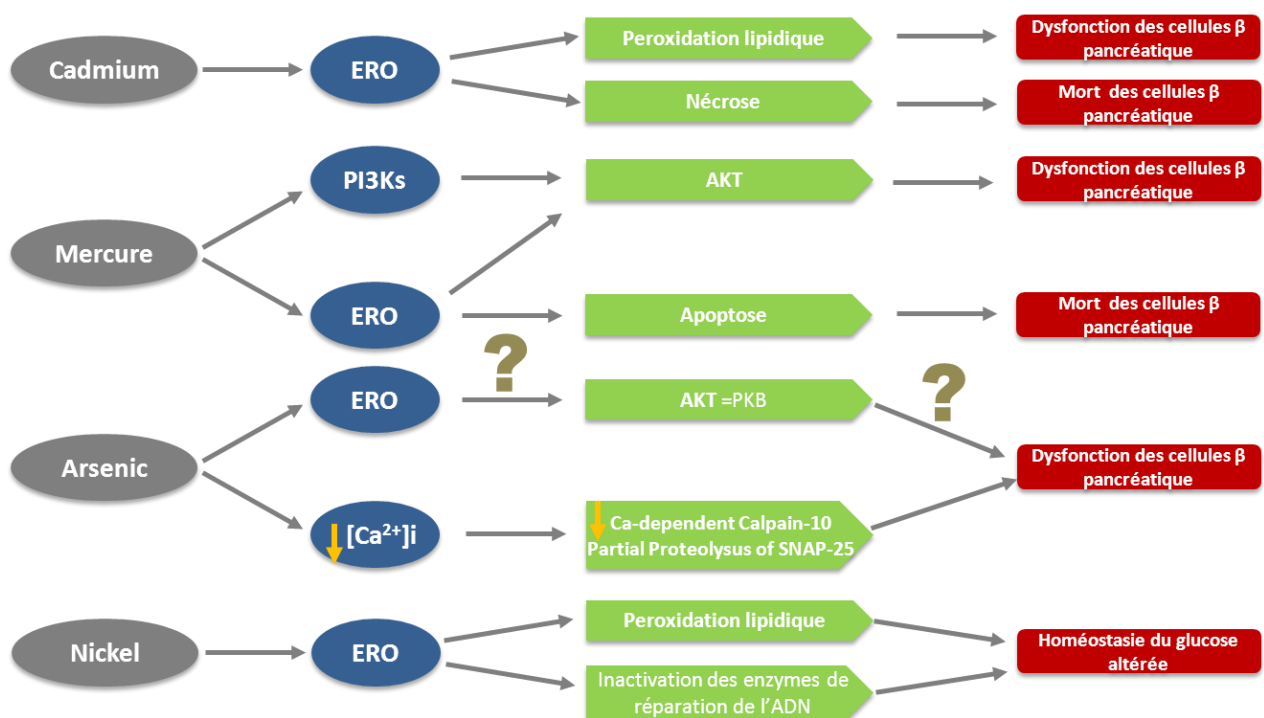


Figure 6 : Représentation schématisée des effets des métaux toxiques sur la signalisation cellulaire induisant différents effets toxiques sur les cellules β pancréatiques. D'après (Chen et al. 2009)

Définition du model d'étude et objectifs

La surveillance de la qualité des aliments d'origine marine destinées à la consommation humaine doit s'adapter aux nouveaux enjeux liés à la présence de nombreux nano ou micropolluants et de pathogènes émergents, qui ont tendance à s'accumuler dans les différents maillons de la chaîne alimentaire.

Le tissu adipeux est le lieu de stockage principal des POPs ([Barouki 2011](#); [Nalbone et al. 2011](#); [Cho et al. 2011](#); [Francesconi 2007](#)). En raison de leur forte lipophilie, de leur caractère persistant et bioaccumulable, les POPs se trouvent souvent dans le tissu adipeux des organismes aquatiques ([Cho et al. 2011](#)). Or, les poissons et fruits de mer sont riches en lipides et constituent une source d'acide gras poly-insaturés, principalement acides gras oméga 3, dans l'alimentation humaine ([Guil-Guerrero et al. 2011](#)). Face à ce constat, il est possible que d'autres contaminants lipophiles s'accumulent dans le tissu adipeux de fruit de mer et de poissons. On peut donc se demander quelle est l'incidence à court, moyen et long terme sur la santé humaine que pourraient entraîner la consommation de fruits de mer et de poissons vivant dans un environnement marin et côtier contaminé.

La réponse à cette question doit prendre en considération plusieurs paramètres essentiels tels que : i) concentrations des polluants accumulés ; ii) origine, style de vie de l'espèce consommée et position de cette dernière dans la chaîne trophique ; iii) valeur nutritionnelle de l'espèce consommée ; iiiii) et enfin mode et style du consommateur.

Le travail de Thèse a consisté à comparer deux sites côtiers marins situés sur la côte atlantique marocaine situés dans la région d'El Jadida: l'un se trouve à proximité de la zone industrielle de Jorf Lasfar (JL) (plateforme d'extraction de phosphate, port maritime, centrale thermique au charbon), l'autre est localisé à Oualidia (OL), site touristique balnéaire. Des moules commercialisées en surface de grande distribution (Casino, Fontaine-Lès-Dijon, Dijon, France) ont été utilisées comme contrôle négatif faute d'avoir pu se procurer des moules d'origine marocaine destinées à la consommation qui auraient constitué le témoin le mieux approprié.

Une stratégie basée sur plusieurs niveaux a été mise en œuvre au cours du travail de Thèse :

- Approche analytique pour caractériser les contaminants et préciser la valeur nutritionnelle de l'espèce consommée,
- Approche *in vivo* sur des rats recevant par gavage des extraits lipidiques de moules,

- Approche *in vitro* sur cellules β -pancréatiques murines MIN-6 pour mesurer l'incidence potentielle des extraits lipidiques sur l'activité de ces cellules.

Les modèles *in vivo* sont bien adaptés pour travailler sur tous types d'extraits (extraits totaux, mélanges de particules et de molécules aux propriétés physicochimiques différentes), extraits hydrosolubles (constitué de mélanges de molécules hydrosolubles) et liposolubles (constitués de mélanges de molécules liposolubles) et présentent un intérêt physiologique et nutritionnel. Toutefois, ces modèles *in vivo* sont souvent mal adaptés pour une surveillance régulière, voire de routine en raison de leur durée importante.

Pour cela, des modèles *in vitro* faisant appel à des cellules jouant des rôles essentiels dans le métabolisme des lipides et des glucides, dont les altérations contribuent aux maladies métaboliques, présentent de nombreux avantages pour l'évaluation rapide des activités biologiques d'extraits hydrosolubles ou liposolubles. Ces modèles, permettent de révéler des anomalies du métabolisme lipidique et/ou glucidique et sont adaptés pour identifier la part prise par le stress oxydant, l'inflammation et l'activation de la mort cellulaire. Ce type de tests présente aussi un intérêt éthique dans la mesure où il constitue une alternative à l'expérimentation animale. Cette approche *in vitro* répond ainsi aux exigences du règlement de l'Union Européenne qui stipule de réduire l'expérimentation animale.

Parmi les modèles cellulaires permettant d'aborder l'impact de contaminants sur le métabolisme glucidique et lipidique, figurent les cellules β des ilots pancréatiques, responsables de la sécrétion de l'insuline, une hormone clé de l'homéostasie glucidique. La lignée cellulaire utilisée (MIN-6) de par son rôle, nous donne l'avantage de mesurer différents effets cytotoxiques incluant le pouvoir perturbateur endocriniens des contaminants.

Matériel et Méthodes

1. MODELE MOULES

1.1. Les Moules

La moule Méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis*, a été l'espèce biologique utilisée, en raison des facilités d'approvisionnement, de sa capacité de concentrer les polluants et de la bonne connaissance de cette espèce. Les moules que nous avons utilisé lors de cette étude appartiennent à la systématique suivante :

- Embranchement : Mollusques.
- Classe : Bivalves.
- Ordre : Lamellibranches.
- Super famille : Mytilidae.
- Famille : Mytilidae.
- Genre : Mytilus.
- Espèce : *Mytilus galloprovincialis*

1.2. Description de la zone d'étude

Les sites d'échantillonnages sont situés sur la partie médiane de la côte atlantique marocaine (**Figure 7**). La région d'El Jadida comptait environ 1.103.032 habitants (en 2004) ; elle est considérée comme le futur deuxième pôle industriel au Maroc (plus de 148 unités industrielles), concentrés en deux grands complexes industriels : Parc industriel Jorf Lasfar et complexe industriel d'El Jadida ([Maanan 2008](#)).

Le parc industriel Jorf Lasfar est le premier du genre au Maroc avec 500 ha destiné aux industries lourdes (métallurgie, chimie-parachimie et logistique industrielle). Ce parc est équipé d'un port à vocation minéralière et énergétique, d'une capacité de plus de 25 millions de tonnes de trafic maritime. Cette zone industrielle génère plus de 314 000 m³ par jour de rejet d'eaux usées dans les eaux côtières d'El Jadida ([Maanan 2008](#)).

La température moyenne annuelle est de 18°C (max : 40°C ; min : 5°C). La pluviométrie moyenne annuelle ne dépasse généralement pas les 317 mm. Le taux de l'humidité atmosphérique est très élevé partout dans la région (environ 650 mm). Cette particularité est due certainement à l'influence marine, qui contribue à l'adoucissement du climat. Les vents dominants sont généralement de Nord, Nord-Ouest, produisant le long de la côte des courants géotropiques et

au large des côtes des remontées d'eaux « phénomène d'upwelling » riches en nutriments. Ces eaux riches en nutriment sont déplacées par le mouvement des marées vers les lagunes, en soutenant la production biologique et l'amélioration du rendement de l'aquaculture ([Maanan 2008](#)). Les lagunes d'Oualidia et Sidi Moussa, l'estuaire Oum Er-Bia, plages de Haouzia et Sidi Bouzid, la falaise de Jorf Lasfar, font de la zone côtière d'El Jadida un site de géodiversité et biodiversité par excellence.

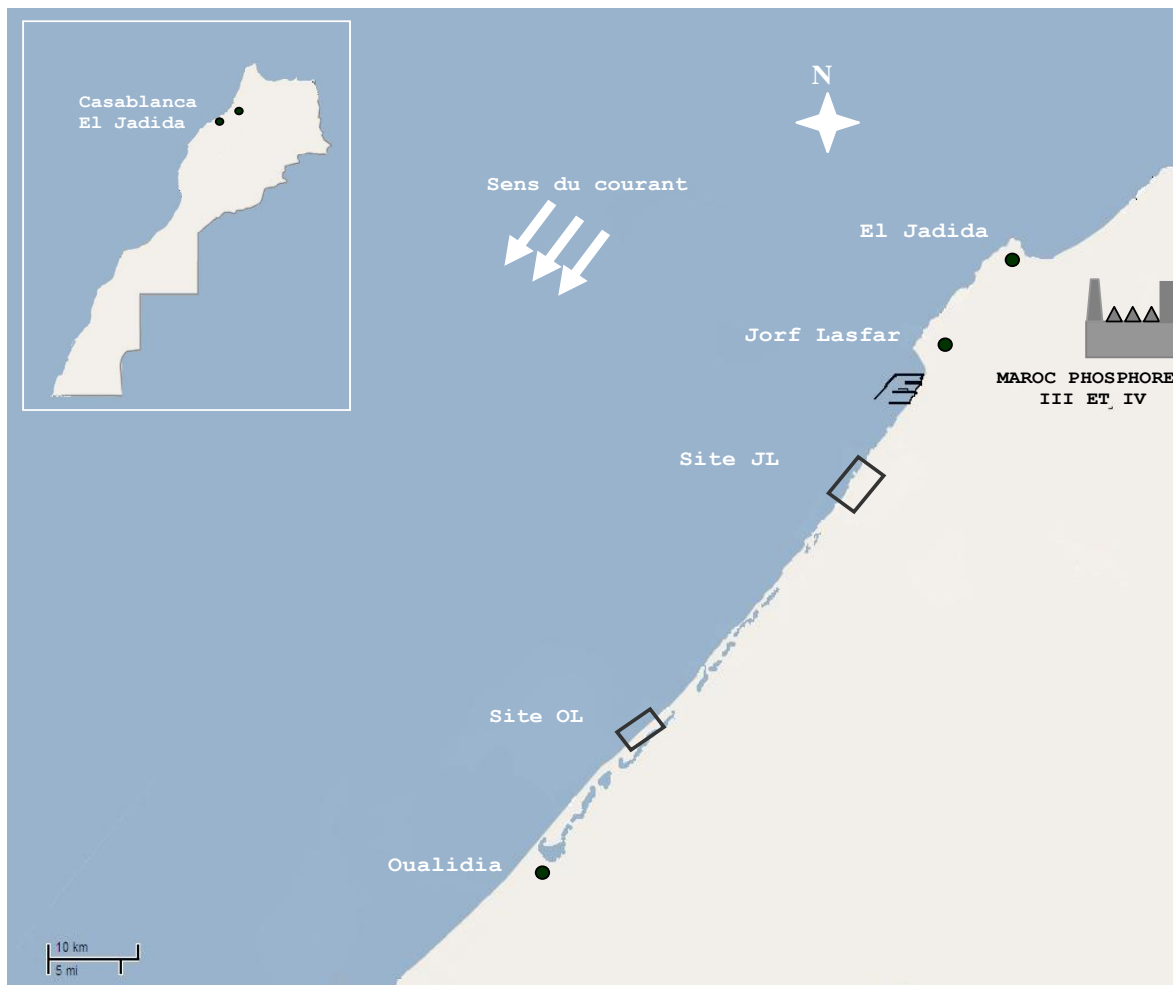


Figure 7 : Localisation des sites d'études (Jorf Lasfar) JL et Oualidia (OL) sur la côte atlantique Marocaine

1.2.1. Site Jorf Lasfar

Situé sur le littoral atlantique Marocain, à 25 km au sud-ouest d'EL Jadida, il est à proximité du parc industriel Jorf (complexe chimique d'industrie Maroc-Phosphore III et IV de phosphate, le central thermique, port, Etc.) (**Figure 8**). La température de l'eau et la salinité sont respectivement de 14,4-26,1 °C et de 29,2- 34,8 ‰ ([Maanan 2008](#)).



Figure 8 : Photo aérienne du site Jorf Lasfar (JL) prise par Google earth

1.2.2. Site Oualidia

Le site Oualidia est situé sur le littoral atlantique Marocain, il se trouve à 45 km au sud de JL et à 10 km au nord de la ville Oualidia (**Figure 9**). C'est un site agricole et touristique réputé pour ses lagunes d'ostréiculture et saliculture. La température de l'eau et la salinité sont respectivement de 13.9-21.7 °C et de 30,1-34,7 ‰ ([Maanan 2008](#)).



Figure 9 : Photo aérienne du site Oualidia (OL) prise par Google earth

1.3. Prélèvement des Moules

Sur les deux sites, des moules de tailles similaires (5 à 6 cm) ont été prélevées à la main pendant la marée basse, au mois de novembre 2010. Elles ont été rincées à l'eau de mer sur les lieux de prélèvement, puis placées dans des sachets en polyéthylène et enfin transportées au laboratoire dans des glacières à 4 °C et stockées à -28°C jusqu'à utilisation.

1.4. Séchage des moules

Environ un kilogramme de moules de taille homogènes $5,5 \pm 0,5$ cm ont été décoquillées, égouttées, pesées, puis séchées dans une étuve portée à 60°C de façon à obtenir une préparation stable. Les échantillons sont pesés pendant des intervalles de temps réguliers (12 h), jusqu'à l'obtention d'une masse constante. La chair de moules séchée est broyée dans un mortier en porcelaine jusqu'à obtention d'une poudre de moules bien homogène.

1.5. Dosage des métaux lourds (Cd, Cr, et Pb)

Le dosage du Cd, Cr et Pb a été effectué par spectrométrie d'absorption atomique. Un gramme de poudre de moules ou 400 µg/mL des extraits lipidiques, ont été ajoutés aux 10 mL d'acide nitrique (HNO₃) concentré (Merck, *Parc tertiaire de la Meinau, Strasbourg; qualité Suprapur*) et 4 mL d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré (Merck, *Parc tertiaire de la Meinau, Strasbourg ; qualité Suprapur*) dans un matras. Le mélange a été mis au repos pendant 12 h, puis placé dans un système de minéralisation assisté par énergie micro-ondes : MultiWave 3000 (Anton Paar) : chauffage de 5 min 30 sec à 175 ° C et maintien à 175 ° C pendant 4 min 30 sec). Le volume de chaque minéralisât a été complété à 20 mL avec de l'eau ultra pure. Un essai à blanc sans moule a été traité puis analysé dans les mêmes conditions. Les métaux (Cd, Cr et Pb) ont été analysés comme décrit par ([Vaidya et Rantala 1996](#)) à l'aide spectrophotomètre d'Absorption Atomique par électrothermie à correction Zeeman : SpectrAA 220Z (VARIAN).

1.6. Extraction des lipides totaux

L'extraction des lipides totaux a été réalisée selon la méthode de Folch ([Folch et al. 1957](#)). Deux cents vingt-cinq grammes de tissus de moules congelés à -28 °C ont été suspendus dans de 2,5 L de solvants d'extraction (Chloroforme/Méthanol, 2v/1v) et homogénéisés pendant 30 sec à 890 g avec ULTRA-TURRAX. Pour accélérer la séparation des deux phases, 0,2 volume par volume de solution aqueuse de chlorure de potassium à 0,8% (p/v) ont été ajoutés. Le mélange a été agité environ 1 h puis transvasé dans une ampoule à décanter. Après séparation des deux phases, la

phase organique a été filtrée puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le résidu obtenu, constitué de lipides totaux, a été dissous dans l'éthanol absolu et stocké à -28 ° C.

1.7. Caractérisation du profil lipidique des moules

Le profil lipidique des moules (*M. galloprovincialis*) en acide gras, phospholipides, cholestérol, dérivés oxydés du cholestérol (oxystérols) et phytostérols a été caractérisé par différentes techniques.

1.7.1. Dosage des acides gras

L'analyse du profil lipidique des moules en acides gras a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) selon la technique de Orban ([Orban et al. 2000](#)).

1.7.1.1. Méthylation au boron trifluoride-méthanol (BF3)

Cent µL d'extraits lipidiques (40 mg/mL) ont été mis à sec sous l'azote dans des tubes en téflon. Un mL de soude méthanolique (0,5 N) a été ajouté, l'ensemble a été chauffé dans un bain de sable à 80°C pendant 15 min. Après refroidissement, 2 mL de BF3 MeOH (14%) ont été ajoutés et l'ensemble a été chauffé de nouveau à 80°C pendant 15 min. Après refroidissement, 2 mL de NaCl saturée ont été ajoutés, suivi par 1 mL d'Hexane. Deux phases ont été obtenues, la phase supérieure a été récupérée, elle contient les esters méthyliques.

1.7.1.2. Analyse des esters méthylés par chromatographie en phase gazeuse

Les esters méthylés ont été analysés par CPG (*Perkin Elmer Clarus 500*) équipé d'un auto-injecteur et d'un détecteur à ionisation de flamme. Les conditions opérationnelles sont les suivantes: colonne capillaire en silice fondue DB5 (30 m 0,32 mm x 0,5 µm épaisseur de film). Le gaz vecteur est de l'hélium (7 mL/min). La programmation de température est comme suit : 85°C durant 1 min, suivie d'une augmentation de 30°C/min jusqu'à 160°C puis augmentation de 2°C/min jusqu'à 220°C. L'acide pentadécylrique (C15:0) est utilisé comme standard interne. L'identification des acides gras est basée sur la comparaison des indices de rétention expérimentaux.

1.7.2. Séparation et analyse des phospholipides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Les phospholipides ont été séparés et identifiés par chromatographie en phase liquide haute performance, couplé à un spectromètre de masse, (LC-MS/MS, 1200/QQQ 6460 *Agilent*

technologies). La colonne utilisée est de type Zorbax RX-Sil (100 mm x 2,1 mm, 1,8 µm, *Agilent Technologies*). Le gradient de séparation est constitué d'un tampon A (Chloroforme/Méthanol 8V/2V et acétate d'ammonium 5 mM) et d'un tampon B (Chloroforme/Méthanol/ Eau ; 6V/3,4V/6 et acétate d'ammonium 5mM). La vitesse d'élution est de 0,2 mL/min. L'analyse des phosphatidylcholine (PC) et Lysophosphatidylcholine (LPC) est effectuée en mode balayage des ions précurseur « Precursor ion » avec un rapport m/z=184. La phosphatidyléthanolamine (PE) et la Lysophosphatidyléthanolamine (LPE) ont été analysés en mode perte de neutre =141 « Neutral loss».

1.7.3. Dosage du cholestérol, dérivés oxydés du cholestérol (oxystérols) et phytostérols par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Le profil lipidique des extraits lipidiques de moules en cholestérol, dérivés oxydés du cholestérol (oxystérols) et phytostérols a été analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) ([Iuliano et al. 2003](#); [Desrumaux et al. 2005](#)).

1.7.3.1. Saponification à froid

Vingt µL d'extraits lipidiques dilués dans une solution du chloroforme / méthanol (2/1, v / v) ont été ajoutés à 100 µL d'epicoprostanol (50 µg/mL) et 7-hydroxycholestérol (1 µg/mL) (Sigma, St Louis, MO, USA) (en tant que standard interne pour le cholestérol et les oxystérols, respectivement). Trois cents µL du BHT (hydroxytoluène butylé)/Méthanol (50 mg/mL) ont été ajoutés pour réduire l'oxydation des oxystérols au cours du processus de purification. La saponification a été faite par ajout de 500 µL de potasse méthanolique (1M). Le mélange a été incubé pendant 2 h à température ambiante et à l'abri de la lumière.

1.7.3.2. Extraction de l'insaponifiable

L'échantillon saponifié a été refroidi dans un bain de glace, ensuite 2 mL de acide éthanoïque / eau (1/9V) ont été ajoutés, suivi par 4 mL d'Hexane. Après agitation, le mélange a été centrifugé à 1800 tours/min à 4°C pendant 5 min, la phase organique a été récupérée.

1.7.3.3. Dérivation

La phase organique récupérée a été évaporée à sec sous l'azote. Le résidu sec obtenu a été dissout dans 50 µL de N, O-bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide (BSTFA) et triméthylchlorosilane (TMCS) (4V/1V) (*Pierce, Rockford, Illinois, USA*). Le mélange a été incubé

pendant 60 min à 60 ° C et évaporé à sec. Les résidus secs obtenus sont des Triméthylsilyle éthers ; ils ont été repris dans 100 mL d'hexane.

1.7.3.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les stérols (cholestérol, oxystérols, phytostérols) ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse GC 6890 couplé à un détecteur à spectrométrie de masse 5973 (*Agilent Technologies*). La chromatographie a été effectuée en utilisant une colonne HP-5MS capillaire en silice fondue (25 m × 0,25 mm × 0,25 µm, *Agilent Technologies*). Les stérols ont été identifiés par spectrométrie de masse en mode TIC « Total Ion Chromatography », et quantifiés en mode SIM « selected Ion Monitoring ». 368 m/z (cholestérol), 370 m/z (épicoprostanol); 456 m/z (Oxystérols) ; 463 m/z (7β-hydroxycholestérol); et 472 m/z (7-ketocholesterol).

2. CARACTERISATION *IN VIVO* DE LA TOXICITE DES EXTRAITS LIPIDIQUES DE MOULES CHEZ LE RAT

2.1. Le modèle animal : le rat

Les rats utilisés (n=20) sont de souche « Wistar » (centre d'élevage et expérimental TIT Mellil, Institut Pasteur, Casablanca, Maroc), de masse moyenne $74,47 \pm 3,00$ grammes, ont été répartis en 5 lots de quatre rats (**Figure 10**). Avant le traitement, les rats ont été acclimatés aux conditions expérimentales du laboratoire pendant 5 j. Le traitement des rats avec les extraits lipidiques de moules a été fait par intubation gastrique à l'aide d'une sonde de gavage, aux concentrations 1,4 et 2,8 mg/100 g de poids vif, une fois toutes les 24 h pendant 14 j. Les rats du lot control ont été gavés dans les mêmes conditions avec de l'eau.

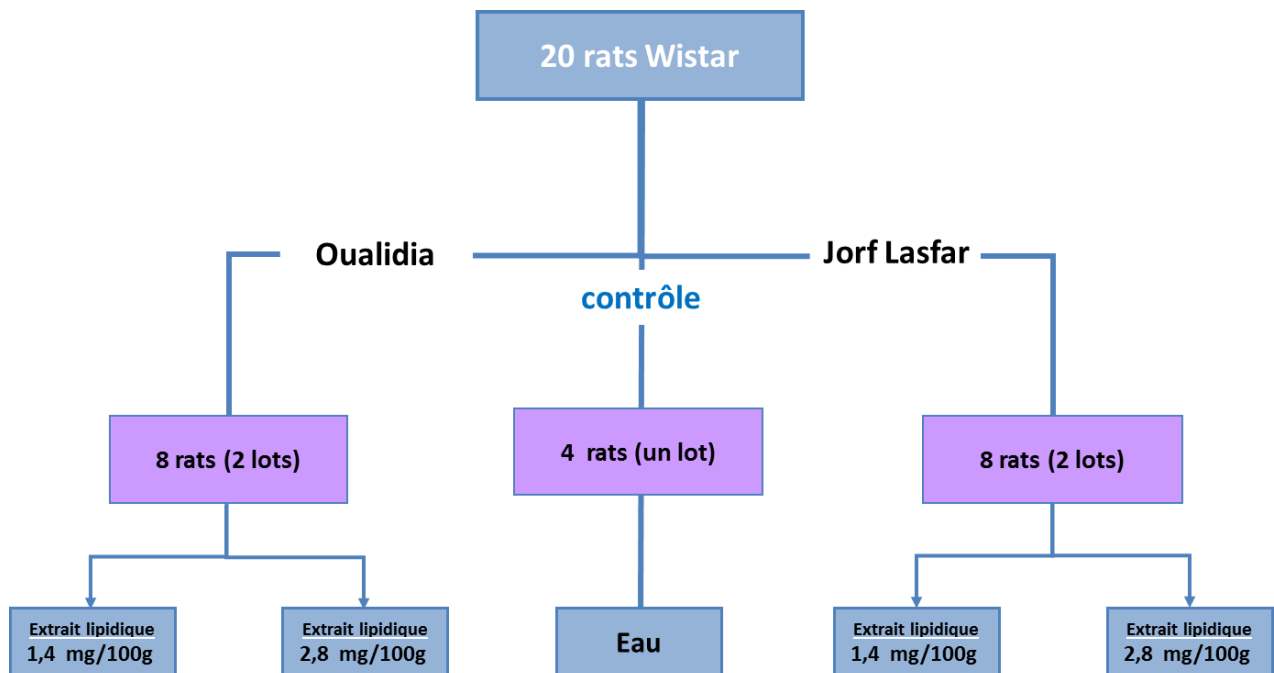


Figure 10 : Schéma de traitement des rats

2.2. Le sacrifice des animaux :

A la fin de la période du traitement, les animaux ont été mis à jeun pendant 12 h. Les rats ont été anesthésiés (chloroforme), le thorax a été ouvert et le sang a été prélevé par ponction intracardiaque à l'aide d'une seringue et aiguille). Pour chaque rat, le sang a été recueilli dans 3 tubes différents :

- Un tube sec sans anticoagulant pour le dosage du cholestérol total (Chol-T), du HDL-cholestérol (HDL-Chol), des triglycérides (TG) et de l'acide urique ;
- Un tube contenant du fluorure de sodium et de l'oxalate de potassium pour le dosage sanguin du glucose, de l'urée et de la créatinine ;
- Un tube contenant de l'héparinate de lithium pour la détermination de l'activité des différentes enzymes.

Le sang a été immédiatement centrifugé à 4 ° C (2 500 trs/min pendant 20 min), le plasma recueilli a été réparti dans 2 tubes et conservé à -28 ° C jusqu'à utilisation pour l'analyse des paramètres biochimiques. Les organes des animaux ont été retirés et conservés à - 28 ° C pour d'éventuelles explorations.

2.3. Analyse des paramètres plasmatiques chez le rat

L'analyse des paramètres plasmatiques a été effectuée suivant des méthodes enzymatiques et/ou colorimétriques par un auto-analyseur (*Express Plus Bayer, Bayer Diagnostics*). Tous les dosages ont été effectués à l'aide de kits commerciaux (Laboratoire d'analyse médicale, Hôpital Hassan II, Settat, Maroc).

2.3.1. Mesure de la glycémie

La glycémie a été déterminée par technique enzymatique colorimétrique (*Glucose L-Q, Spinreact, S.A.U*) (**Figure 11**). Le principe de cette technique est basé sur la capacité de la glucose oxydase à catalyser l'oxydation du glucose en acide gluconique, avec formation d'une molécule de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). En présence de peroxydase, la peroxyde d'hydrogène réagit avec un accepteur chromogène d'oxygène : le phénol, 4-aminophenazone (4-AP) et forme une molécule quinone imine qui absorbe à 505 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose dans le plasma ([Trinder 1969](#)).

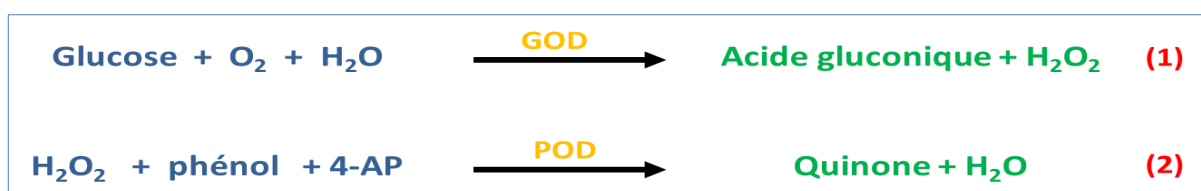


Figure 11 : Principe du dosage du glucose (GOD : glucose oxydase ; POD : peroxydase ; 4-AP : 4-aminophenazone)

2.3.2. Dosage de la créatinine de l'urée et de l'acide urique

La créatinine a été mesurée par méthode cinétique colorimétrique (*Creatinine FS, DiaSys Diagnostic Systems GmbH*). En milieu alcalin, la créatinine forme un complexe coloré avec l'acide picrique qui absorbe à 492 nm. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de la créatinine ([Newman et Price 1999](#)).

L'urée a été mesurée par méthode enzymatique (*Urea FS, DiaSys Diagnostic Systems GmbH*). En présence d'eau et d'uréase, l'urée est hydrolysée pour produire de l'ammonium et des bicarbonates. L'ammonium produit dans la première réaction associé à l' α -oxoglutarate et au NADH en présence de glutamate déshydrogénase forme du glutamate et du NAD (**Figure 12**). Les ions ammonium, en présence de sallylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité de l'absorbance (340 nm) est proportionnelle à la concentration en urée. ([Newman et Price 1999](#)).

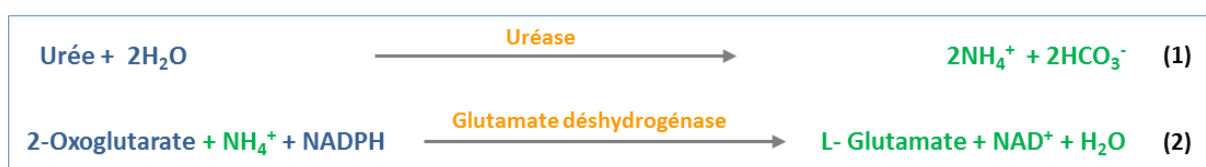


Figure 12 : Principe du dosage de l'urée

L'acide urique a été mesuré par méthode enzymatique colorimétrique (*Uric acid FS, DiaSys Diagnostic Systems GmbH*). En présence de l'uricase, l'acide urique est oxydé en allantoiné et génère une molécule de peroxyde d'hydrogène (**Figure 13**). Cette dernière réagit avec 4-aminoantipyrine et l'acide 2,4,6-tribromo-3-hydroxybenzoïque (TBHBA) pour former une molécule quinone imine qui absorbe à 505 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration d'acide urique dans le plasma ([Thomas 1998](#)).

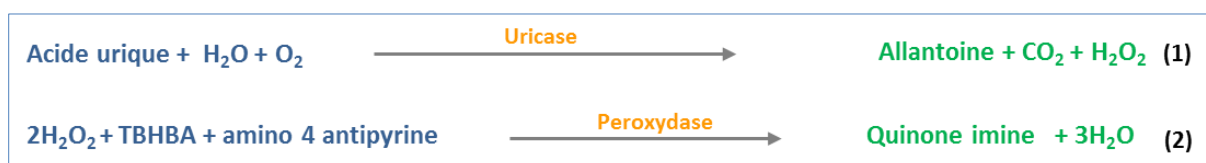


Figure 13 : Principe du dosage de l'acide urique (TBHBA : acide 2,4,6-tribromo-3-hydroxybenzoïque)

2.3.3. Etude du Bilan lipidique

2.3.3.1. Les triglycérides

Les triglycérides ont été mesurés par une méthode enzymatique (**Figure 14**), colorimétrique en utilisant la glycérol-3-phosphateoxidase (GPO) (Triglycerides FS, *DiaSys Diagnostic Systems GmbH*), quantifiant le glycérol libéré après action de la lipase selon les réactions suivantes :

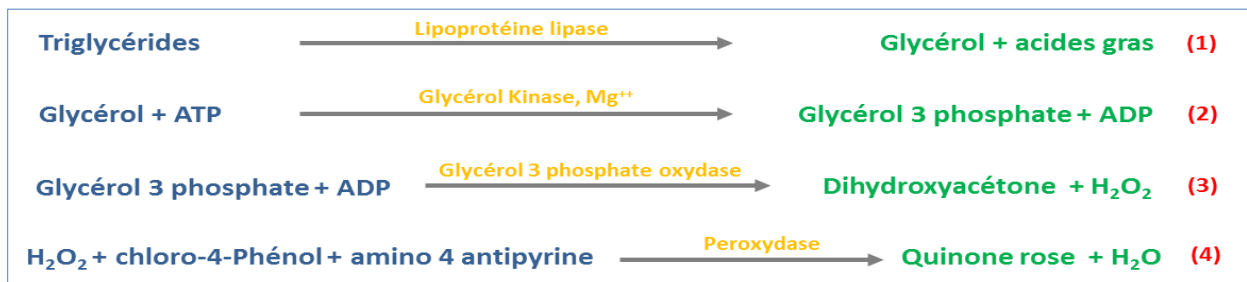


Figure 14 : Principe du dosage des triglycérides

L'intensité de la coloration de la quinone imine mesurée à 500 nm est proportionnelle à la quantité de triglycérides contenue dans le plasma ([Rifa et al. 1999](#)).

2.3.3.2. Cholestérol total

Le cholestérol total a été quantifié par méthode enzymatique colorimétrique «CHOD-PAP» (*Total cholesterol FS, DiaSys Diagnostic Systems GmbH*) (**Figure 15**). La quantification du cholestérol est réalisée après hydrolyse enzymatique et oxydation. L'indicateur colorimétrique est la quinone imine résultant de l'action de la peroxydase sur la 4-aminoantipyrine en présence de phénol et de peroxyde d'hydrogène ([Rifa et al. 1999](#); [Artiss et Zak 1997](#)).



Figure 15 : Principe du dosage du cholestérol

2.3.3.3. HDL-Cholestérol et LDL-Cholestérol

Le HDL-Cholestérol a été déterminé par la même méthode que celle utilisée pour le cholestérol total après précipitation des lipoprotéines légères (LDL et VLDL) par l'acide phosphotungstique en présence de MgCl₂. La concentration sérique en LDL-Cholestérol a été obtenue suivant la formule de Friedwald : **LDL-Cholestérol (mmol/L) = Cholestérol Total - (HDL-Cholestérol +**

Triglycérides /2,2). ([Rifa et al. 1999](#); [Artiss et Zak 1997](#)). Cette formule ne peut s'appliquer que si les TG sont < 4,6 mmol/L.

2.3.4. Protéines totales

Les protéines totales sont quantifiées par la méthode colorimétrique de Biuret (*DiaSys Diagnostic Systems GmbH*).

2.3.5. L'albumine

L'albumine a été déterminée par méthode colorimétrique de (*DiaSys Diagnostic Systems GmbH*). Cette technique est basée sur la propriété du vert de bromocrésol à se lier à l'albumine pour produire un complexe coloré. L'absorbance du complexe à 628 nm est directement proportionnelle à la concentration d'albumine dans l'échantillon ([Thomas 1998](#)).

2.3.6. Exploration de la fonction hépatique

2.3.6.1. Les transaminases

Les transaminases sont largement distribuées dans divers tissus. L'ASAT (Aspartate Amino Transferase) est particulièrement abondante au niveau du cœur, du foie, des muscles squelettiques, des reins (par ordre décroissant). L'ALAT (Alanine Amino Transferase) se retrouve essentiellement au niveau hépatique. L'ALAT et ALAT sont des indicateurs de souffrance cellulaire. La détermination quantitative de l'ALAT et l'ASAT dans le plasma des rats a été effectuée dans l'UV (*DiaSys Diagnostic Systems GmbH*) optimisée selon les recommandations de l'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) ([Thomas 1998](#)). Le principe de ce test est basé sur les réactions suivantes :

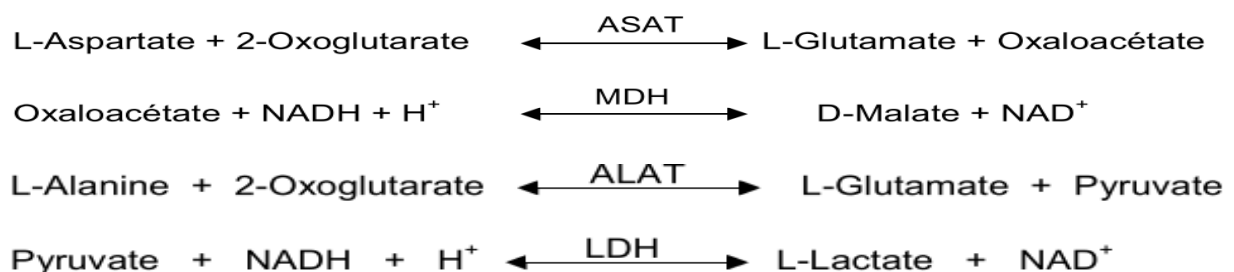


Figure 16 : Principe du dosage des transaminases

(ASAT: Aspartate Amino Transferase; MDH: Malate Deshydrogenase; ALAT: Alanine Amino Transferase; LDH: Lactate Deshydrogenase)

2.3.6.2. La Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline a été mesurée par méthode photométrique cinétique selon les recommandations de la Fédération Internationale de Chimie Clinique (*DiaSys Diagnostic Systems GmbH*) ([Thomas 1998](#)).

3. CARACTERISATION DE LA TOXICITE DES EXTRAITS LIPIDIQUES DE MOULES SUR LES CELLULES B PANCREATIQUES MURINES (MIN-6)

3.1. Modèle cellulaire : cellules β pancréatiques murines (MIN-6)

3.1.1. Caractéristiques des cellules MIN-6

La lignée cellulaire β pancréatique murine MIN-6 (*Mouse Insulinoma*) a été établie à partir de cellules β pancréatiques tumorales (*insulinome*) de souris transgéniques, transformées par le virus SV40 et porteurs du gène promoteur de l'insuline humaine connecté à un gène hybride exprimant l'antigène T du virus SV40 ([Miyazaki et al. 1990](#)) (*Institute for Medical Genetics, Kumamoto University Medical School Kumamoto 862, Japan*). Les cellules MIN-6 ont les mêmes caractéristiques morphologiques que des cellules β pancréatiques de souris normales. La sécrétion de l'insuline par les MIN-6 répond d'une manière physiologique, après stimulation au glucose à des concentrations allant de 5 à 30 mM ([Ishihara et al. 1993](#); [Miyazaki et al. 1990](#)).

3.1.2. Culture et traitements des cellules MIN-6

Les cellules MIN-6 ont été cultivées en boîtes de pétri de 10 cm etensemencées à la densité de 2.10^6 cellules par boîte. Le milieu de culture utilisé est du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (à complément inactivé), 100 U/mL de pénicilline, 100 μ g/mL de streptomycine, 100 μ g/mL L-glutamine. Ce milieu de culture contient soit 5 mM de glucose (condition normo-glycémique), soit 25 mM de glucose (condition hyperglycémique). Les cellules sont cultivées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. Le milieu de culture est changé trois fois par semaine.

Quatre cents milligrammes d'extraits lipidiques de moules (mis à sec sous l'azote dans des tubes en téflon) ont été solubilisés dans 1 mL d'éthanol absolu. A ce mélange, 9 mL du milieu de culture ont été ajoutés pour former une solution mère (SM) de 40 mg/mL. La SM a été ensuite diluée au 1/10 pour préparer une solution fille de 4 mg/mL. A partir de cette solution (4mg/mL), des dilutions de 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16 ont été faites pour obtenir des solutions aux concentrations 2, 1, 0.5 et 0.25 mg/mL. Ces solutions ont servi aux traitements des cellules MIN-6 aux concentrations 400, 200, 100, 50 et 25 μ g/mL. Dans ces solutions, la concentration maximale en éthanol est de 0,1%.

Les cellules MIN-6 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à la densité de 2.10^5 cellules/mL/puits. Après 24 h d'incubation (environ 60 % de confluence), les cellules MIN-6 ont été traitées avec les différents extraits lipidiques de moules (ES, OL et JL aux concentrations : 0, 25, 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pendant 48 h. Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire).

3.2. Mesure de prolifération des cellules MIN-6

Afin d'évaluer l'effet des extraits lipidiques de moules sur la prolifération des cellules MIN-6, plusieurs méthodes ont été utilisées.

3.2.1. Numération et morphologie cellulaire

Le nombre total des cellules mortes et vivantes a été déterminé par coloration au Bleu Trypan. Ce dernier est un réactif chromophore (couleur bleue) chargé négativement qui colore en bleu les cellules mortes.

Après 48 h de traitement avec des extraits lipidiques, les cellules adhérentes et non adhérentes ont été récoltées et centrifugées à 900 trs/min, pendant 5 min, le culot obtenu est resuspendu dans un 1 mL du milieu de culture. Le nombre total des cellules mortes et vivantes a été déterminé après coloration au Bleu Trypan sur un compteur automatique (*TC20 automated cell counter, Bio-Rad*).

La morphologie des cellules MIN-6 (taille, contours du cytoplasme et regroupement des cellules en amas) a été étudiée en plaques 24 puits après 24 h de traitement avec les extraits lipidiques de moules à l'aide d'un microscope à contraste de phase équipé d'une caméra (*Axiovert 40 CFL, Zeiss*). Les images ont été digitalisées grâce à une caméra AxioCam (*Zeiss*).

3.2.2. Mesure de la confluence par coloration au Crystal Violet

La confluence des cellules MIN-6 a été mesurée par la technique de ([Kueng et al. 1989](#)), par coloration au Crystal Violet (colorant spécifique du noyau).

Les cellules MIN-6 ont été cultivées en plaques 24 puits à la densité de 2.10^5 cellules/mL/ puits. Après 48 h de traitement avec les extraits de moules, le milieu de culture a été éliminé, les puits ont été ensuite rincés avec du PBS 1X pour éliminer les cellules non adhérentes, puis 200 μL de solution de coloration (Crystal Violet 0,5 %, Méthanol 25 %) ont été ajoutés. Après 5 min d'incubation à température ambiante, l'excès du colorant a été éliminé, les cellules ont été de

nouveau rincées et séchées à température ambiante. Le colorant, fixé par le noyau des cellules, a été extrait par addition de 1 mL de solution de solubilisation (citrates de sodium (0,1 M), éthanol (50 %)). Après 10 min d'incubation sous agitation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 540 nm avec un spectrophotomètre lecteur de plaques (*MRX Revelation, Dynex Technologies*). Les mesures ont été réalisées en triplicate.

3.2.3. Evaluation de l'activité du succinate déshydrogénase avec le test MTT

Le test MTT est basé sur la capacité réductrice de la succinate déshydrogénase des cellules métaboliquement actives. Le MTT (3 - [4,5-diméthylthiazol-2-yl] -2,5-diphényltétrazolium bromure) est un sel de tétrazolium soluble dans l'eau, capable de traverser les membranes cellulaires. Dans les mitochondries et sous l'action de la succinate déshydrogénase, le cycle de tétrazolium est clivé en produisant du formazan, de couleur pourpre et insoluble (**Figure 17**). Des données plus récentes suggèrent que la réduction du MTT en formazan peut aussi être médiée par la NADH ou NADPH dans les cellules et à l'extérieur de la mitochondrie ([Berridge et Tan 1993](#)). La membrane des cellules est imperméable aux cristaux de formazan pourpres causant ainsi leur accumulation intracellulaire ([Fotakis et Timbrell 2006](#)). L'addition d'un détergent solubilise les cristaux de formazan. Le nombre de cellules métaboliquement actives est directement proportionnel à la quantité de formazan solubilisé qui est mesurable par colorimétrie. Ce test prend simultanément en compte la prolifération cellulaire et la viabilité ([Mosmann 1983](#)).

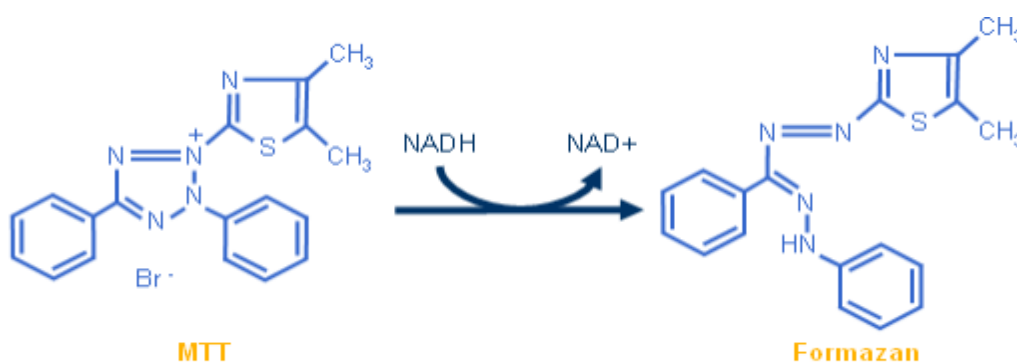


Figure 17 : Réduction du MTT en formazan

Le MTT a été préparé à la concentration de 0,5 mg/mL dans du tampon PBS stérilisé par passage sur filtre de 0,22 µm ; il a été conservé à +4 ° C à l'abri de la lumière.

Les cellules MIN-6 ont été cultivées dans des plaques à 96 puits à la densité de 4.10⁴ cellule/puits. Après 48 h de traitement avec les extraits lipidiques, le milieu de culture a été

enlevé, les puits ont été ensuite rincés avec du PBS 1X. Ensuite, 100 µl du MTT (0,5 mg/mL) ont été ajoutés dans chaque puits, une incubation a été ensuite réalisée pendant 3 h à 37°C sous atmosphère humide et en présence de 5 % (v/v) de CO₂. La formation des cristaux de bleus de formazan a été suivie par observation sous microscope à contraste de phase. Le MTT a été éliminé et les puits ont été rincés deux fois avec du PBS 1X. Le formazan formé a été solubilisé avec 200 µL de solution acide/Isopropanol (0,1N HCL dans l'isopropanol absolu) sous agitation pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque (*MRX Revelation, Dynex Technologies*). Les mesures ont été réalisées en triplicate.

3.2.4. Dosage de l'activité lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytosolique soluble. Les cellules dont la membrane a été rompue libèrent leur contenu cytosolique (y compris la LDH) dans le milieu extracellulaire. Par conséquent, l'activité de la LDH peut être utilisée comme un indicateur de l'intégrité des membranes cellulaires et sert de moyen pour évaluer la cytotoxicité générale résultante de composés chimiques de l'environnement ou des facteurs toxiques ([Bonfoco et al. 1995](#)).

La mesure de l'activité LDH dans le milieu de culture a été effectuée par dosage enzymatique colorimétrique (*LDH Cytotoxicity Assay, Cayman Chemical, USA*). Ce test de cytotoxicité mesure l'activité de la LDH présente dans le milieu de culture en utilisant un modèle de réaction en deux étapes : dans la première étape, la LDH catalyse la réduction de NAD⁺ en NADH par oxydation du lactate en pyruvate. Dans la seconde étape de la réaction, la diaphorase utilise le NADH nouvellement formé pour catalyser la réduction d'un sel de tétrazolium en formazan très coloré qui absorbe à 490-520 nm.

Pour chaque puits de boîte de culture, deux prélèvements de 50 µL de surnageant ont été effectués. A chaque échantillon de 50 µL de surnageant (déposé dans une plaque de 96 puits de type ELISA) ont été ajoutés 50 µL de réactif du kit contenant:

- du lactate (substrat de l'enzyme),
- de l'iodotétrazolium (colorant),
- de la diaphorase/NAD⁺ (catalyseur).

En présence de la LDH, le lactate est transformé en pyruvate et la NAD est alors transformée en NADH. En présence de NADH, le colorant jaune (iodotétrazolium) est transformé en formazan

(rouge). Après 2 h d'incubation à 37 ° C et à l'abri de la lumière, la quantification de la réaction a été effectuée par la mesure de la densité optique à 492 nm par spectrophotométrie au lecteur de plaque (*MRX Revelation, Dynex Technologies*). Les mesures ont été réalisées en triplicate. L'activité de la LDH a été normalisée par rapport au nombre total des cellules dans chaque puits et exprimée en mU/10⁶ cellules.

3.2.5. Evaluation de l'intégrité de la membrane cytoplasmique par coloration avec l'iodure de Propidium et analyse par cytométrie en flux

L'intégrité de la membrane cytoplasmique peut être évaluées par coloration avec l'iodure de propidium (IP) et analyse par cytométrie en flux ([Bierknes et al. 1989](#); [Ormerod et al. 1993](#)). L'IP diffuse à travers une membrane dégradée, il est exclu par une membrane intacte ([Jones et Senft 1985](#); [Steinkamp et al. 2000](#)). L'IP ($\lambda_{\text{Excitation Max}} = 538 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Emission Max}} = 617 \text{ nm}$) est un fluochrome qui s'intercale entre les acides nucléiques en émettant une fluorescence rouge.

Les cellules MIN-6 ont été cultivées en plaques 24 puits à la densité de 2.10⁵ cellules/mL/puits. Après 48 h de traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes ont été collectées par trypsination et resuspendues dans 1 mL de PBS ; 5 µg/mL d'IP (*Sigma*) ont été ajoutés dans chaque tube. L'analyse a été réalisée sur un cytomètre en flux Galaxy (*Partec*) équipé d'un laser bleu émettant à 488 nm à la puissance de 15 mW en prenant en compte 10 000 cellules. La fluorescence de l'IP a été sélectionnée par un filtre passe-bande 590 ± 20 nm. Les données ont été analysées avec le logiciel FloMax (*Partec*). Le pourcentage de cellules à membrane cytoplasmique détériorée correspond aux cellules IP positives. Les mesures ont été réalisées en triplicate.

3.2.6. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Le cycle cellulaire évalué par cytométrie en flux permet de détecter 3 phases (**Figure 18**). Durant la première phase (phase G0/G1), la cellule est en dehors du cycle (quiescente : G0) ou croit et devient plus large (G1), il y a synthèse des protéines permettant la division de la cellule. A partir d'une certaine taille, elle entre dans la deuxième phase (S), dans laquelle débute la synthèse de l'ADN. Dans la troisième phase (G2), la cellule se prépare à la division cellulaire (Mitose : M).

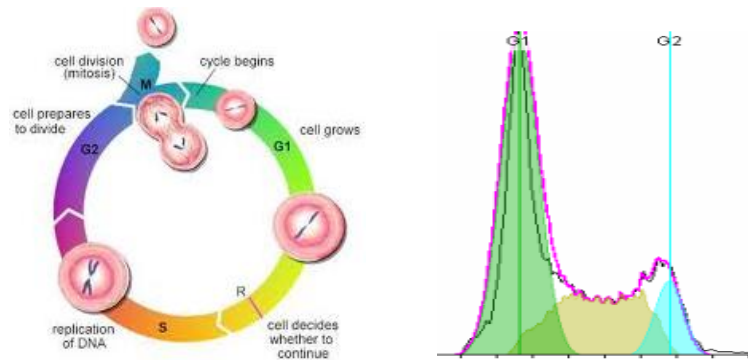


Figure 18 : Représentation du cycle cellulaire et modèle de Dean & Jett.

La méthode d'analyse du cycle cellulaire, par cytométrie en flux, est basée sur l'émission de la fluorescence des noyaux marqués à l'IP ([Larsen et al. 1986](#)). L'IP est un fluochrome qui s'intercale de façon stochiométrique entre les acides nucléiques en émettant une fluorescence rouge. Ainsi, en présence de RNases, la fluorescence de l'IP est proportionnelle à la quantité d'ADN.

Les cellules ont été détachées de leur support par trypsination, rincées deux fois au PBS puis fixées à l'éthanol froid (-20°C) pendant 12 h. Les cellules fixées ont été ensuite rincées deux fois avec du PBS et incubées avec 10 µg/mL de RNase A (*Sigma*) et 50 µg/mL d'IP pendant 1 h à 37°C. La fluorescence de l'IP a été quantifiée sur un cytomètre en flux Galaxy en prenant en compte 10 000 cellules. L'acquisition des données a été faite avec le logiciel FloMax ; les analyses ont été réalisées avec le logiciel *FlowJo* (*Tree Star Inc.*) suivant le modèle de Dean-Jett Fox (**Figure 18**). Le modèle de Dean & Jett aussi appelé « SOBR (sum of broadened rectangle) method » repose sur des algorithmes sophistiqués évaluant les phases G0/G1 et G2+M par des courbes gaussiennes et la phase S par un polynôme. Les mesures ont été réalisées en duplicate.

3.3. Effet sur les organites cellulaires

3.3.1. Mesure du potentiel trans-membranaire mitochondriale avec *DIOC₆(3)*

Le potentiel de la membrane interne mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) est essentiel pour maintenir la fonction physiologique de la chaîne respiratoire (production d'ATP / phosphorylation oxydative). La détermination de son état est largement utilisée pour caractériser la capacité métaboliques et la mort cellulaire à un stade précoce ([Chen 1988](#)). Une différence de potentiel existe de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Elle est créée par les pompes à protons qui réalisent un gradient électrochimique ($\Delta\Psi_m$) entre l'espace intermembranaire et la matrice,

provoquant une polarisation entre les deux faces de la membrane interne, celle du côté matriciel étant négative par rapport à l'autre (plus de 100 mV). Ce gradient assurera le fonctionnement de l'ATP synthase ([Huttemann et al. 2008](#)) qui dissipe ce gradient en permettant la rentrée de protons et libère l'énergie nécessaire à la phosphorylation de l'ADP en ATP.

Le potentiel de la membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) peut être mesuré par coloration au DIOC₆(3) (3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide) et cytométrie en flux ([Schlattner et al. 2001](#)). Le DIOC₆(3) ($\lambda_{\text{Excitation Max}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Emission Max}} = 501 \text{ nm}$) est un fluochrome cationique, lipophile, son accumulation dans la mitochondrie dépend du $\Delta\Psi_m$ et l'intensité de sa fluorescence est proportionnelle au $\Delta\Psi_m$ ([Bunting et al. 1989](#)).

Les cellules MIN-6 ont été cultivées dans des plaques 24 puits à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules par puits. Après 48 h de traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes ont été mises en suspension dans 1 mL du PBS. Afin d'évaluer les modifications du potentiel de membrane mitochondrial, 50 nM du DIOC₆(3) (*Molecular Probes, Life Technologies*) ont été ajoutés. Après 15 min d'incubation à 37 °C, l'analyse a été réalisée sur un cytomètre en flux Galaxy. Les données ont été analysées avec le logiciel FloMax en prenant en compte 10 000 cellules. Le pourcentage des cellules avec des mitochondries dépolarisées correspond au pourcentage de cellules DIOC₆(3) négatives. Les mesures ont été réalisées en triplicate.

3.3.2. Détection des lysosomes à membrane déstabilisée par coloration à l'Acridine Orange

La déstabilisation de membrane lysosomale peut être étudiée par coloration à l'acridine orange (AO) et analyse en cytométrie de flux ([Yuan et al. 2002](#)). L'AO ($\lambda_{\text{Excitation Max}} = 502 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission Max}} = 525 \text{ nm}$) est une sonde lipophile, cationique, capable de traverser la membrane cytoplasmique et celle des organites cellulaires ([Han et Burgess 2010](#)). L'AO est un colorant métachromatique qui se caractérise par sa capacité à émettre une fluorescence verte en milieu basique et une fluorescence orange/rouge en milieu acide. La quantité de fluorescence orange/rouge sera donc proportionnelle au volume et à la quantité de compartiments acides dans la cellule. La perméabilisation de la membrane lysosomale se caractérise par une diminution de la fluorescence orange/rouge ([Malvitte et al. 2008](#); [Nylandsted et al. 2004](#)).

Les cellules MIN-6 ont été cultivées en plaques 24 puits à la densité de $2 \cdot 10^5$ cellules par puits. Après 48 h de traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes ont été récupérées dans 1

mL de PBS. Afin d'évaluer les cellules à membrane lysosomales perméables, la suspension cellulaire a été incubée en présence de 1 µg/mL d'AO (*Sigma*) pendant 15 min à 37°C. L'analyse a été réalisée sur un cytomètre en flux Galaxy ; les signaux fluorescents rouge et vert ont été sélectionnés respectivement par un filtre passe-bande à 630 nm et 520 ± 20 nm. Pour chaque échantillon, la fluorescence a été quantifiée pour 10 000 cellules sur une échelle logarithmique. Les données sont analysées avec le logiciel FloMax. Les mesures ont été réalisées en triplicate.

3.3.3. Evaluation de la fonction peroxysomale

3.3.3.1. Etudes de l'expression d'ABCD3/PMP70 (Peroxisomal Membrane protein) par immunofluorescence indirecte

Le transporteur ABCD3 (*ATP-binding cassette transporter D3*) / PMP₇₀ (*70-kDa peroxisomal membrane protein*) est un constituant majeur de la membrane peroxysomale. Il assure un rôle important dans la fonction cellulaire et dans le métabolisme lipidique ([Schrader et Fahimi 2008](#); [Wanders et Waterham 2006](#)). Les peroxysomes sont impliqués dans le processus de β-oxydation des acides gras à très longue chaîne ([Nguyen et al. 2008](#)). L'altération de fonction peroxysomale peut induire des modifications lipidiques délétères. PMP70 peut être identifié par immunofluorescence indirecte et quantifié par cytométrie en Flux ([Baarine et al. 2009](#)).

Les cellules ont été cultivées dans des plaques 24 puits à la densité de 2.10⁵ cellules/puits. Pour l'analyse par immunofluorescence, les cellules ont été cultivées sur lamelles de verre de 14 mm, placées dans des plaques de culture de 24 puits. Après 48 h de traitement avec les différents extraits lipidiques OL et JL et ES, les cellules ont été fixées avec du p-formaldehyde à 2% dilué en PBS pH 7.4 pendant 10 min à 21 ° C. Les cellules ont été ensuite lavées par 2mL de PBS et perméabilisées avec 0,5 mL de « FACS permeabilising solution 1X» (*BD-Biosciences*) pendant 10 min à 21°C. Un lavage des cellules avec 2 mL de PBS a été effectué. Pour bloquer les sites aspécifiques, les cellules ont été suspendues dans 1 mL de «blocking buffer» (PBS, 0.05% saponine; *Sigma*), 10% sérum de veau foetale (*PAN™ Biotech GmbH*) pendant 20 min à 21°C. Après lavage des cellules avec 1 mL de PBS, 100 µL d'anticorps polyclonal de lapin (*Zymed*) dirigé contre ABCD3/PMP70 et dilué au 1/300 dans le Blocking buffer ont été ajoutés. Après 1 h d'incubation à 21°C. Les cellules ont été lavées deux fois avec un 1 mL du blocking buffer et 100 µL d'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (1/300 dans du Blocking buffer) sont ajoutés. Après 30 min d'incubation à température ambiante, les cellules ont été lavées 2 fois avec 1 mL du PBS et

resuspendues dans 1 mL de PBS 1X. L'analyse a été réalisée sur un cytomètre en flux Galaxy. La fluorescence verte de l'Alexa Fluor 488a été collectée par un filtre passe-bande 520 ± 10 nm. Pour chaque échantillon la fluorescence a été quantifiée sur 10 000 cellules sur une échelle logarithmique. Les données ont été analysées avec le logiciel FloMax (Partec) et FlowJo softwares. Pour analyser l'aspect de l'immunomarquage peroxysomal (nombre de peroxysomes, topographie), l'immunomarquage a été réalisé sur lamelles et ces dernières ont été observées avec un microscope à fluorescence (Axio Scope A1, Zeiss). Les images ont été digitalisées grâce à une caméra AxioCam (Zeiss).

3.3.3.2. Etude de la Catalase

Mesure de l'activité catalase

Pour évaluer l'activité catalase, 10^6 cellules ont été récoltées après traitement avec les extraits lipidiques dans des conditions normo-glycémiques (5 mM) et hyper-glycémiques (25mM). Les cellules ont été mélangées avec 1 mL de PBS contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics Inc). Pour rompre les membranes cellulaires, 5 cycles de décongélation/congélation dans l'azote liquide ont été effectués, suivie d'une sonication à froid. L'homogénat obtenu a été centrifugé à 14 000 trs/min pendant 30 min à 4°C. Le surnageant constitue la solution enzymatique. L'activité enzymatique de la catalase a été mesurée par une méthode colorimétrique (Amplex Red Catalase Assay, Life Technologies). En effet, dans un 1^{er} temps, la catalase réagit avec H_2O_2 en produisant H_2O et O_2 (Mueller et al. 1997). Dans un 2^{eme} temps, le réactif Amplex Red réagit avec le reste des molécules H_2O_2 non dégradées par la catalase. En présence de peroxidase, un composé fluorescent est produit : la résorufine (Figure 19) (Zhou et al. 1997; Mohanty et al. 1997).

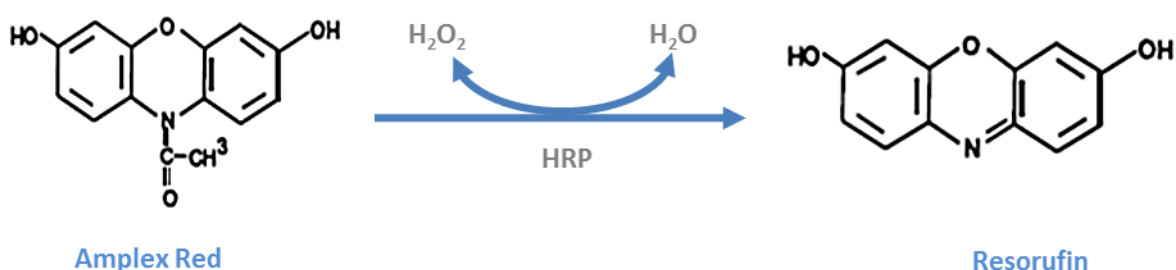


Figure 19 : Principe du dosage de l'activité catalase (HRP : horseradish peroxidase)

Une forte activité catalase se traduit par une petite quantité de résorufine formée. L'activité de la catalase est déduite en soustrayant la fluorescence observée dans l'essai catalase de l'essai

témoin non catalase. La résorufine a une absorbance et un maximum d'émission de fluorescence à 571 nm et 585 nm, respectivement. L'activité catalase a été normalisée par rapport au nombre total des cellules pour chaque essai et elle est exprimée en mU/ 10⁶ cellules.

Détection de la catalase par immunofluorescence indirecte et analyse en cytométrie en flux

Les cellules ont été cultivées dans des plaques 12 puits à la densité de 4.10⁵ cellules/puits. Après 48 h de traitement avec les différentes doses extraits lipidiques OL et JL et ES, les cellules ont été trypsinées avec une solution de 0,05% trypsine-0,02% EDTA (*Sigma*). Les cellules ont été centrifugées à 1 000 trs/min pendant 5 min, le culot a été récupéré et suspendu dans du PBS. Environ 10⁶ cellules ont été récupérées et fixées avec 1 mL du PFA à 2%. Après 10 min d'incubation à température ambiante, les cellules ont été lavées avec 2 mL de PBS. Pour rendre les membranes cellulaires perméables, 0,5 mL de solution FACS permeabilising 1X ont été ajoutés. Après 10 min d'incubation à température ambiante, un lavage des cellules avec 2mL de PBS a été à nouveau effectué. Les cellules ont été mises dans 1 mL de la solution blocking buffer (0,05% de saponine, 10% du SVF, PBS) pendant 30 min à température ambiante. Les cellules ont été ensuite lavées avec 1 mL de PBS et centrifugées à 1 500 trs/min pendant 5 min. Les cellules ont été ensuite mises en présence d'un anticorps monoclonale de souris anti-catalase (*Abcam*) dilué dans le Blocking buffer à raison de 2 µg/mL. Après 60 min d'incubation à température ambiante, les cellules ont été lavées deux fois avec un 1 mL de blocking buffer et mise en présence d'un anticorps polyclonal secondaire Alexa Fluor 488 (F(ab') fragment de lapin anti-souris IgG (H+L)) (*Life Technologie*) dilué au 1:300 dans du Blocking buffer. Après 60 min d'incubation à température ambiante, les cellules ont été lavées 2 fois avec 1 mL du PBS et resuspendues dans 1 mL de PBS 1X. L'analyse a été réalisée sur un cytomètre en flux Galaxy. La fluorescence verte de l'Alexa Fluor 488 a été recueillie par un filtre passe-bande 520 ± 10 nm. Pour chaque échantillon, la fluorescence a été quantifiée sur 10 000 cellules sur une échelle logarithmique. L'acquisition des données a été faite avec le logiciel FloMax et analysée avec le logiciel FlowJo. Les mesures ont été réalisées en duplicate.

3.4. Analyse du stress oxydant

3.4.1. Dosage du Glutathion réduit par méthode colorimétrique

Le glutathion réduit (GSH) est le principal thiol intracellulaire à faible poids moléculaire qui joue un rôle essentiel dans la défense cellulaire contre le stress oxydant dans les cellules de mammifères.

Le GSH a été quantifié par une méthode colorimétrique en utilisant ApoGSH™ Glutathione Colorimetric Detection Kit (*BioVision*). Le principe du dosage est basé sur le système de recyclage du glutathion par la glutathion réductase et DTNB (5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (Figure 20), qui réagissent pour produire de l'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque (couleur jaune). Par conséquent, la concentration de GSH peut être déterminée en mesurant l'absorbance à 412 nm. Le GSSG généré peut être réduit en GSH par la glutathion réductase, et réagit de nouveau avec DTNB. Ce système de recyclage améliore considérablement la sensibilité de détection du glutathion total.

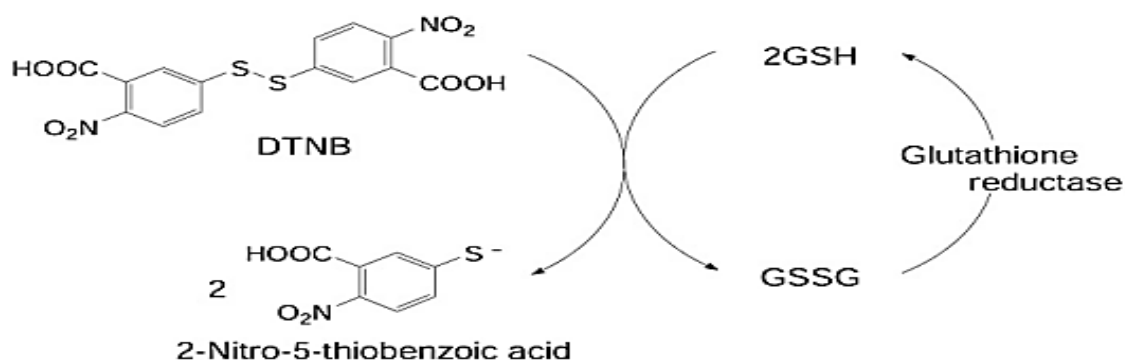


Figure 20 : Principe du dosage du glutathion total

Les cellules ont été cultivées en plaques 12 puits à la densité de $4 \cdot 10^5$ cellules/puits. Après 48 h de traitement avec les extraits lipidiques, les cellules ont été trypsinées, centrifugées et le culot a été resuspendu dans du PBS. 10^6 cellules ont été récupérées dans du PBS froid et centrifugées à 700 g pendant 5 min à 4°C. 80 μ L de la solution Glutathione Reaction Buffer froide ont été ajoutés. Après 10 min d'incubation à température ambiante, 20 μ L d'acide sulfosalicylique (précipitation des protéines) à 5% ont été ajoutés, l'ensemble a été mélangé, centrifugé à 8000 g pendant 10 min et le surnageant a été collecté ; il forme le lysa cellulaire qui a servi au dosage du GSH.

Sur une plaque 96 puits, 20 μL de lysa cellulaire ont été ajoutés à un mélange composée de 20 μL de « NADPH Generating Mix» et 140 μL de « Glutathione Reaction Buffer ». Après 10 min d'incubation à température ambiante, la réaction a été déclenchée par ajout du substrat de glutathion réductase DTNB. Après 10 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 405 nm par spectrophotométrie au lecteur de plaque (*MRX Revelation, Dynex Technologies*). Les concentrations de GSH dans les échantillons ont été déterminées en utilisant la courbe standard du glutathion réalisée dans les mêmes conditions expérimentales. Les teneurs en GSH ont été normalisées et exprimées en $\mu\text{g}/10^6$ cellules. Les mesures ont été réalisées en triplicate.

3.4.2. Détection des anions superoxydes par coloration à la Dihydroethidine

L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) intracellulaire peut être détecté par coloration à la Dihydroethidine (DHE) ([Rothe et Valet 1990](#)). La DHE est un composé non fluorescent pouvant diffuser à travers la membrane cytoplasmique et qui, sous l'action de $\text{O}_2^{\bullet-}$, s'oxyde rapidement (**Figure 21**) en éthidium fluorescent ($\lambda_{\text{Excitation Max}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Emission Max}} = 575 \text{ nm}$). L'éthidium va ensuite se fixer de façon covalente au niveau des bases azotés de l'ADN ([Rothe et Valet 1990](#)). Ceci permet sa rétention dans la cellule et donc sa détection par cytométrie en flux.

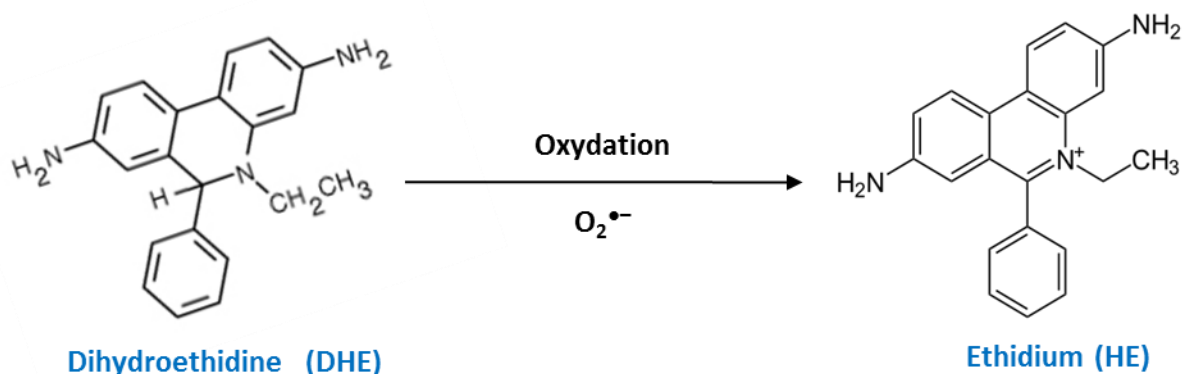


Figure 21 : Oxydation du Dihydroethidine (DHE) en Ethidium (HE)

Les cellules MIN-6 ont été cultivées en plaques 24 puits à la densité de $2 \cdot 10^5$ cellules/puits. Après 48 h de traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes ont été récupérées par trypsination dans 1 mL de PBS. La DHE (*Life Technologies*) a été préparée initialement à une concentration de 10 μM dans du DMSO et utilisée à une concentration finale de 2 μM pour 10^6 cellule/mL de PBS. Les cellules ont été incubées pendant 15 min à 37 ° C. L'analyse a été réalisée

sur un cytomètre en flux Galaxy. Le signal fluorescent a été collecté par un filtre passe-bande à 570 ± 20 nm, en prenant en compte 10 000 cellules. Les données ont été analysées avec le logiciel FloMax. Les mesures ont été réalisées en triplicate.

3.4.3. Détection du monoxyde d'azote par le 4,5-Diaminofluorescein diacetate

Le monoxyde d'azote (NO) peut être détecté par coloration au 4,5-Diaminofluorescein diacetate (DAF-2). Ce dernier est un fluorochrome sensible couramment utilisés pour la détection du NO ([Kojima et al. 1998](#); [Nakatsubo et al. 1998](#)). Le DAF-2 en présence d'oxygène réagit avec NO et principalement avec le trioxyde d'azote (N_2O_3) pour produire le très fluorescent triazolofluorescein (Figure 22) (DAF-2T) ($\lambda_{Excitation\ Max} = 485$ nm et $\lambda_{Emission\ Max} = 535$ nm). L'augmentation de la fluorescence qui rend compte de l'accumulation de DAF-2T, et donc de la quantité de NO, est mesurée par cytométrie en flux.

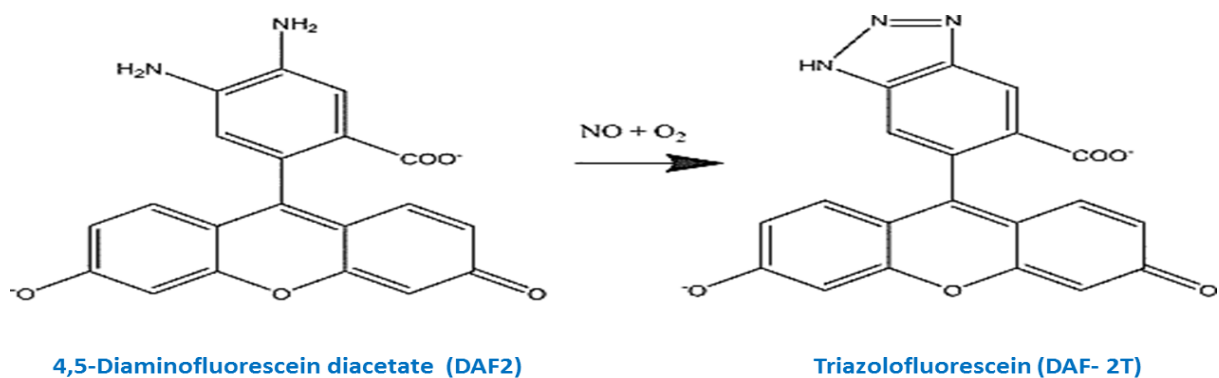


Figure 22 : Oxydation du 4,5-Diaminofluorescein diacetate en Triazolofluorescein

Les cellules MIN-6 ont été cultivées en plaques 24 puits, à la densité de 2.10^5 cellules/ puits. Après 48 h de traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes ont été collectées par trypsination et récupérées dans 1 mL du PBS. Le DAF-2 (AXXORA) a été préparé à une concentration initiale de 5 mM dans DMSO et utilisé à une concentration finale de $10 \mu M$ pour 1×10^6 cellule/mL. En présence du DAF-2, les cellules sont incubées pendant 15 min à $37^\circ C$. L'analyse a été réalisée sur un cytomètre en flux Galaxy en prenant en compte 10 000 cellules. Le signal fluorescent été sélectionné par un filtre passe-bande à 525 ± 20 nm. Les données ont été analysées avec le logiciel FloMax en prenant en compte 10 000 cellules. Les mesures ont été réalisées en triplicate.

3.4.4. Détection du peroxyde d'hydrogène par coloration à la Dihydrorhodamine 123

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) intracellulaire peut être détecté par la Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) ([Rothe et al. 1988](#)). C'est un fluochrome lipophile, non fluorescent qui pénètre facilement dans les compartiments intracellulaires ([Rothe et Valet 1994](#)). En présence de H_2O_2 , la DHR 123 s'oxyde en RH123 (Rhodamine 123) (**Figure 23**). RH123 molécule cationique, fortement fluorescente ($\lambda_{Excitation\ Max}= 505\text{ nm}$; $\lambda_{Emission\ Max}= 529\text{ nm}$) et incapable de traverser les membranes cellulaires ([Shahidul Islam et Tanaka 2004](#)). L'intensité de la fluorescence émise par RH123 reflète le niveau de concentration des molécules d' H_2O_2 intracellulaires.

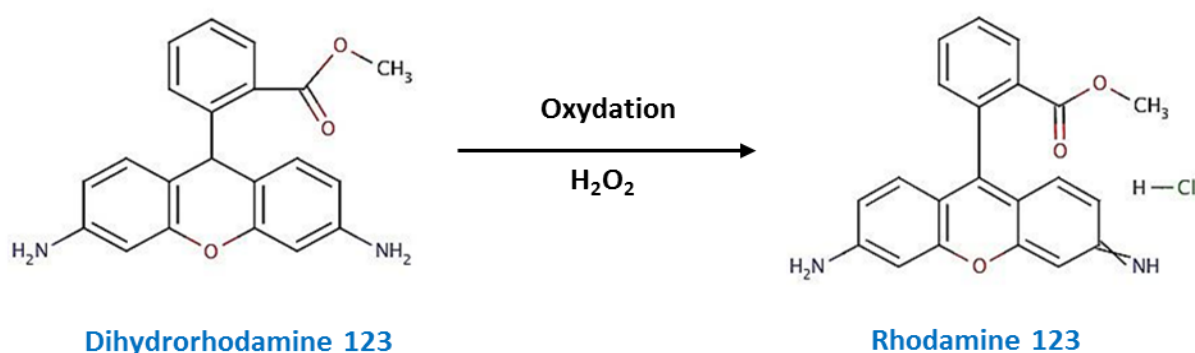


Figure 23 : Oxydation de Dihydrorhodamine 123 (DHR123) en Rhodamine 123 (Rh123)

Les cellules MIN-6 ont été cultivées en plaques 24 puits à une densité cellulaire de 2.10^5 /puits. Après 48 h de traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes ont été récupérées par trypsination dans 1 mL du PBS. La DHR123 (*Sigma*) a été préparée initialement à une concentration de 2 mM en DMSO et utilisée à une concentration finale de 6 μ M pour 10^6 cellules/mL de PBS. En présence de DHR 123, les cellules ont été incubées pendant 15 min à 37°C. L'analyse a été réalisée sur cytomètre en flux Galaxy. Le signal fluorescent a été collecté par un filtre passe-bande à $520 \pm 20\text{ nm}$, en prenant en compte 10 000 cellules. Les données ont été analysées avec le logiciel FloMax. Les mesures ont été réalisées en triplicate.

3.4.5. Détection du 4-hydroxy-2-nonéanal par immunofluorescence indirecte et analyse par cytométrie en flux

Le 4-hydroxy-2-nonéanal (4-HNE) est le produit majeur formé par la peroxydation lipidique ([Esterbauer et al. 1991](#); [Khatoun et al. 2012](#)). Le 4-HNE peut être détecté par immunofluorescence et analyse par cytométrie en flux ([Toyokuni et al. 1995](#)).

Les cellules ont été cultivées en plaques 12 puits à la densité de $4 \cdot 10^5$ cellules/puits. Après 48 h de traitement par les différents extraits lipidiques, les cellules ont été récupérées par trypsination, centrifugées à 1 000 trs/min pendant 5 min et le culot obtenu a été resuspendu dans du PBS. Environ 10^6 cellules ont été fixées avec 1 mL du PFA à 2%. Après 10 min d'incubation à température ambiante, les cellules ont été lavées avec 2mL de PBS. Afin de perméabiliser la membrane cytoplasmique, 0,5 mL de solution FACS permeabilising 1X ont été ajoutés. Après 10 min d'incubation à température ambiante, un lavage des cellules avec 2 mL du PBS a été effectué. Les sites non spécifiques ont été bloqués avec le blocking buffer (0,05% de saponine, 10% du SVF, PBS) pendant 30 min à température ambiante. Le 4-HNE intracellulaire a été détecté par un anticorps monoclonale de souris anti 4-HNE (*Abcys*) dilué dans du Blocking buffer (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Après 60 min d'incubation à température ambiante, les cellules ont été lavées deux fois avec du blocking buffer et mise en présence d'un anticorps secondaire Alexa Fluor 488 préparé au 1:300 dans du Blocking buffer. Après 60 min d'incubation à température ambiante, les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS et resuspendues dans 1 mL de PBS 1X. L'analyse a été réalisée sur un cytomètre en flux Galaxy. La fluorescence d'Alexa Fluor 488 a été recueillie par un filtre band pass à 520 ± 10 nm. Pour chaque échantillon la fluorescence a été quantifiée sur 10 000 cellules sur une échelle logarithmique. L'acquisition des données a été faite avec le logiciel FloMax et ces dernières sont analysées avec FlowJo. Les mesures ont été réalisées en duplicate.

3.5. Caractérisation de la mort cellulaire

3.5.1. Analyse de la morphologie nucléaire par coloration au Hoechst 33342

Le Hoechst 33342 (2'-[4-éthoxyphényl]-5-[4-méthyl-1-piperaziny]-2,5'-bi-1H-benzimidazole) est utilisé pour colorer les noyaux des cellules vivantes ou fixées. Il traverse facilement la membrane cytoplasmique et s'intercale entre les bases Adénine-Thymine (A-T) de l'ADN ([Sandhu et al. 1985](#)). Il est excité par la lumière UV à 350 nm et émet une fluorescence bleu/cyan à une longueur d'onde de 461 nm. Les cellules apoptotiques sont caractérisées par une condensation de la chromatine et/ou une fragmentation nucléaire ([Kim et al. 2011](#)).

Pour chaque condition expérimentale, les cellules décollées ont été récupérées, de même que les cellules adhérentes après décollage à l'aide de la trypsine. Les cellules ont été resuspendues et fixées dans du paraformaldéhyde à 2% à une densité de $5 \cdot 10^5$ cellules/mL. À l'aide d'une Cytospin 2 (*Shandon*), $5 \cdot 10^4$ cellules ont été déposées sur des lames dégraissées puis colorées avec du Hoechst 33242 (1 µg/mL) pendant 5 min. La morphologie nucléaire a été analysée sous microscope à fluorescence (*AxioScope A1, Zeiss*). Pour chaque échantillon, 300 cellules ont été analysées et comptées. Les mesures ont été réalisées en triplicate.

3.5.2. Détection des cellules en phase Sub-G1

L'analyse du cycle cellulaire peut faire apparaître un pic sub-G1 (pic précédent les cellules en G0/G1 détectées par cytométrie en flux). Ce pic sub-G1 est représentatif d'une population cellulaire apoptotique, caractérisée par une fragmentation internucléosomale de l'ADN ([Ormerod et al. 1992](#)). En effet, lors du protocole opératoire mis en œuvre pour l'étude du cycle, les cellules sont perméabilisées avec de l'éthanol à -20 ° C créant des micropores dans la membrane cytoplasmique. Ces micropores permettent la pénétration de l'IP qui pourra aller s'intercaler dans l'ADN. Au cours des « lavages » successifs des cellules, les micropores laissent échapper dans le milieu extracellulaire de petits fragments d'ADN résultant de l'apoptose. Les cellules apoptotiques se retrouvent alors avec un contenu en ADN fortement diminué, mais néanmoins marquées par l'IP, générant ainsi le pic sub-G1.

3.6. Dosage de l'insuline

La sécrétion d'insuline est la fonction principale des cellules β pancréatiques. Elle est évaluée par un test immunoenzymatique: Mercodia Rat insulin Elisa (*Mercodia*). Ce dosage immunoenzymatique repose sur une technique de type « sandwich direct », dans laquelle deux anticorps monoclonaux sont dirigés contre deux déterminants antigéniques distincts de l'insuline.

Après 48 h de traitement avec différentes doses d'extraits lipidiques, le milieu de culture a été enlevé et les cellules ont été rincées deux fois en PBS. Les cellules ont été ensuite pré-incubées pendant 60 min dans 500 μ L de solution de bicarbonate Kreb's Ringer sans glucose (115 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.6 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 20 mM NaHCO₃, 16 mM HEPES; pH 7.40) à 37 °C, 5% CO₂ humidifié et 95% d'air ([Tuo et al. 2011](#); [Kawai et al. 2001](#); [Nakatsubo et al. 1998](#)). Les cellules ont été ensuite rincées avec de la solution bicarbonate. La stimulation de la sécrétion d'insuline basale a été faite en incubant les cellules de nouveau avec la solution bicarbonate de Kreb's Ringer contenant du glucose (5 ou 25 mM). Après 60 min d'incubation, les solutions bicarbonate de Kreb's Ringer avec glucose ont été récupérées et centrifugées à 10 000 trs/min pendant 10 min à 4 ° C. Le dosage d'insuline a été effectué dans cette solution.

Pendant l'incubation, les molécules d'insuline de l'échantillon se lient, d'une part, aux anticorps anti-insuline fixés sur la plaque et réagissent, d'autre part, avec les anticorps anti-insuline présents dans la solution de « peroxydase conjugué ». Un rinçage simple élimine les anticorps marqués non liés. Le conjugué a été détecté par réaction avec la 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). La réaction a été arrêtée par ajout d'acide chlorhydrique 0,5 mol/L. Cette solution fournit un point d'évaluation colorimétrique, qui sera lu par spectrophotométrie à 450 nm. Le taux d'insuline a été normalisé par rapport au nombre total des cellules dans chaque puits et exprimé en ng/10⁶ cellules.

4. ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne \pm SEM. L'analyse statistique des données a été réalisée avec le test ANOVA (Analyse de variance) à un seul facteur. Les résultats fournis permettent d'évaluer la qualité de l'ajustement du modèle aux données. L'ANOVA a été suivie d'un post-test de Tukey (HSD), (HSD : honestly significant difference) test de comparaison multiple.

Résultats

1. ETUDES DES BIOMARQUEURS DE POLLUTION CHEZ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

1.1. Teneurs en métaux lourds dans la poudre et extraits lipidiques de moules

Le dosage des métaux lourds et plus particulièrement le Cd, Cr, et Pb ont été réalisés dans les tissus secs de moules sauvages, issues de deux sites, situés sur la partie médiane de la côte atlantique marocaine (**Figure 7**) : JL (site potentiellement pollué par des rejets chimiques), OL (site agricole). Des moules destinées à la consommation et commercialisées en grande surface (Casino, Fontaine-Lès-Dijon, Dijon, France) et provenant d'Espagne (ES) ont été utilisées comme contrôle négatif faute d'avoir pu se procurer des moules d'origine marocaine destinées à la consommation qui auraient constitué le témoin le mieux approprié

Les résultats obtenus (**Figure 24**) montrent des teneurs en Cd, Cr et Pb nettement plus élevées chez *Mytilus galloprovincialis* issues du site JL par rapport OL. Quant aux moules ES les teneurs obtenues restent nettement inférieures à celles retrouvées dans les moules sauvage OL et JL.

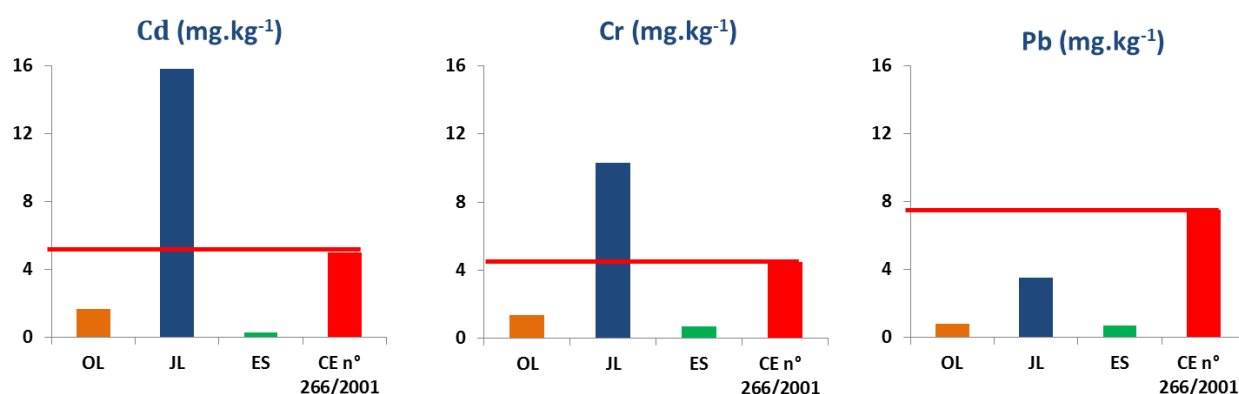


Figure 24 : Teneurs en métaux lourds (mg.kg⁻¹ de tissus secs) chez les moules

Les teneurs en métaux lourds dans le tissu sec des moules issues de la zone industrielle Jorf Lasfar (JL) sont de l'ordre de 15,8 (Cd) ; 10,3 (Cr) et 3,5 mg.kg⁻¹ (Pb). Ces teneurs sont élevées par rapport à celle trouvées dans le tissu secs des moules issues du site d'Oualidia (OL) qui se trouve à environ 45 Km au sud du site JL ; elles sont de l'ordre de 1,7 (Cd), 1,4(Cr) et 0,8 mg.kg⁻¹ (Pb). Quant aux moules comestibles commercialisées en grande surface, leurs teneurs en métaux lourds sont négligeables de l'ordre de 0,3 (Cd) ; 0,7 (Cr) et 0,7 mg.kg⁻¹ (Pb). Ces teneurs sont

nettement inférieure à celles trouvées dans les moules sauvage OL et JL situés sur la côte atlantique marocaine.

Les teneurs en métaux lourds dans les extraits lipidiques de moules sont sous forme de trace.

1.2. Profil lipidiques des moules

Nous avons analysé le profil lipidique des moules issues de la côte atlantique marocaine (JL, OL) et des moules commercialisées en grande surface (ES). Cette analyse a consisté à détecter et quantifier les différents profils lipidiques en acide gras, phospholipides, cholestérol, dérivés oxydés du cholestérol (oxystérols) et phytostérols.

1.2.1. Profil lipidique en acide gras

L'analyse du profil lipidique des moules en acides gras est effectuée par chromatographie en phase gazeuse.

Les acides gras ont été qualifiés et quantifiés par comparaison des indices de rétentions expérimentaux avec les indices de rétention des standards internes. Les principaux acides gras identifiés ont été classés en trois catégories distinctes (**Figure 25**): acides gras saturés (SAFAs), acides gras mono-insaturés (MUFAs) et acides gras poly-insaturés (PUFAs). Une présentation détaillée des profils lipidiques des principaux acides gras est donnée dans le **Tableau II**. L'ensemble des résultats est présenté en % par rapport au total des principaux acides gras identifiés.

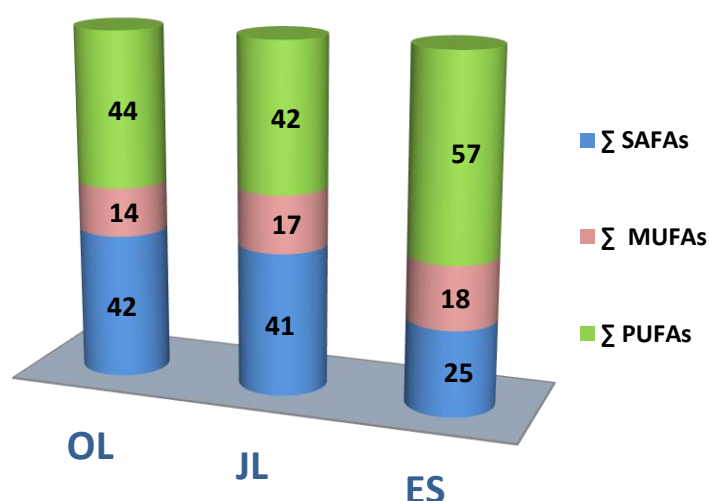


Figure 25 : Pourcentage des trois classes des principaux acides gras chez les moules (*Mytilus galloprovincialis*)

SAFAs: saturated fatty acids, **MUFAs:** Monounsaturated fatty acids, **PUFAs:** polyunsaturated fatty acids

Les profils lipidiques en acides gras chez les moules sauvages issues des deux sites JL et OL situés sur la côte atlantique marocaine sont similaires : 41 et 42 % (SFAs), 17 et 14 % (MUFAs), 42 et 44% (PUFAs) (**Figure 25**). Ces profils lipidiques changent chez les moules ES : 25 % (SFAs), 18 % (MUFAs) et 57 % (PUFAs) (**Figure 25**).

Tableau II : Pourcentages des principaux acides gras identifiés chez les moules

			OL	JL	ES	OL	JL	ES
AG			%					
Ac.	Myristique	C 14:0	4.6	4.7	3.7	11.2	11.3	15.0
Ac.	Palmitique	C 16:0	26.5	25.9	12.2	63.8	63.0	49.5
Ac.	Stéarique	C 18:0	4.3	4.6	2.2	10.4	11.2	8.7
Ac.	arachidique	C 20:0	3.7	3.3	2.6	8.9	8.0	10.6
Ac.	béhénique	C 22:0	2.4	2.7	4.0	5.8	6.5	16.2
∑ SAFAs			41.6	41.2	24.7	100	100	100
Ac.	Palmitoléique	C 16:1	6.1	7.9	7.1	43.8	47.7	39.3
Ac.	Oléique	C 18:N-9	2.1	2.1	1.8	15.2	12.8	9.8
Ac.	Vaccénique	C 18:N-7	2.7	3.5	5.3	19.5	21.4	29.1
Ac.	Gadoléique	C 20:1	2.8	2.8	2.1	19.8	17.0	11.4
Ac.	Cétoléique	C 22:1N-11	0.2	0.2	1.9	1.8	1.2	10.3
∑ MUFAs			14.0	16.5	18.1	100	100	100
Ac.	Linoléique	C 18:2N-6	2.4	2.2	1.3	5.4	5.2	2.2
Ac.	gamma-linoléique	C 18:3N-6	1.8	1.3	1.7	4.0	3.1	2.9
Ac.	alpha linoléique	C 18:3N-3	3.6	3.0	3.4	8.2	7.2	6.0
Ac.	Eicosadiénoïque	C 20:2N-6	0.7	0.5	0.4	1.6	1.2	0.7
Ac.	Dihomo-γ-linoléique	C 20:3N-6	0.4	0.2	0.3	0.9	0.5	0.5
Ac.	Arachidonique	C 20:4N-6	2.4	3.2	4.0	5.4	7.5	7.0
Ac.	Icosapentaénoïque	C 20:3N-3	0.3	0.3	0.4	0.7	0.6	0.6
Ac.	Icosapentaénoïque	C 20:5N-3	12.3	14.7	28.5	27.5	34.9	49.8
Ac.	Adrenique	C 22:4N-6	0.3	0.5	1.1	0.7	1.1	2.0
Ac.	Cuplanodonique	C 22:5N-6	0.5	0.5	0.3	1.1	1.2	0.5
Ac.	Docosapentaénoïque	C 22:5N-3	1.0	1.1	1.8	2.2	2.6	3.1
Ac.	Docosahexaénoïque	C 22:6N-3	18.7	14.7	14.0	42.1	34.8	24.5
∑ PUFAs			44.5	42.3	57.2	100	100	100
(∑ PUFAs + ∑ MUFAs) / ∑ SAFAs			1,40	1,42	3,05			

L'acide palmitique (C 16:0) est le principale acide gras saturés (SAFAs) identifiés chez toutes les moules, il représente environ 27 % (OL), 26 % (JL) et 12% (ES) des acides gras totaux. Les teneurs élevées en acides gras saturés chez les moules JL et OL par rapport à ES sont dues principalement à leur forte concentration en acide palmitique.

L'acide palmitoléique (C16:1) est le principale MUFAs, il représente 6 % (OL), 8 % (JL) et 7% (ES) des acides gars totaux. Deux acides gras prédominent dans la classe des PUFAs et font partie de la famille des oméga-3. Le premier est l'acide icosapentaénoïque (C20:5N-3) avec 12 % (OL), 15 % (JL) et 29 % (ES) du total AGs. Le second est L'acide docosahexaénoïque (C 22:6N-3) appelé communément DHA, il représente 19 % (OL), 15 % (JL) et 14 % (ES) du total des acides gras (Tableau II).

1.2.2. Profil lipidique en phospholipides

Les phospholipides ont été séparés et identifiés par chromatographie liquide et spectrométrie de masse. Les résultats obtenus (**Tableau III**) montrent un profil lipidique qui change en fonction de l'origine des moules. En effet, les teneurs en phosphatidylcholine (PC) chez les moules sont respectivement de 170,7 et 119,6 µg/g tissus secs pour les moules JL et OL ; chez les moules ES, elles ne dépassent pas 9 µg/g tissus secs.

Tableau III : Composition en phospholipides (µg.g-1tissus secs) de moules

Phospholipides en µg/g de tissu sec	ES	JL	OL
Phosphatidylcholine (PC)	9,0	170,7	119,6
Phosphatidylethanolamine (PE)	3,6	0,19	0,047
Lyso-phosphatidylcholine (LPC)	1,9	3,9	3,3
Lyso-Phosphatidyléthanolamine (LPE)	1,5	1,7	0,58

1.2.3. Profils lipidiques en stérol chez les moules

Les stérols (cholestérol, oxystérols et phytostérols) ont été détectés et quantifiés dans les tissus de moules par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les proportions en stérols dans les tissus de *Mytilus galloprovincialis* sont présentées **Tableau IV**. Au total, environ 10 stérols ont été identifiés avec des proportions qui changent selon l'origine des moules.

Le cholestérol est le principal stérol dominant avec des proportions similaires chez les moules issues des trois sites 43% (ES), 44% (JL) et 45% (OL) des stérols totaux identifiés dans le tissu des moules. Le brassicastérol, stérol présent chez certains phytoplanctons (diatomées) a été identifié aussi dans les tissus de moules avec des proportions aussi importantes que le cholestérol, environ 26 % (ES), 50,5% (OL) et 21,5% (JL) des stérols totaux identifiés dans le tissu des moules. Le 22-déhydrocholestérol (20-DHC) est le troisième stérol identifié sous formes de ces deux isomères (cis et trans), le t-22-DHC est l'isomère le plus abondant avec des proportions de 9% (ES), 11,7% (JL) et 11,5% (OL), versus 1,6 % (ES), 3% (JL) et 2% (OL) de l'isomère cis-22DHC.

Le 24-méthylène-cholestérol est le deuxième phytostérol présent aussi en proportion importante dans le tissu des moules avec 12% (ES) et 9% (OL, JL) des stérols totaux identifiés. D'autres phytostérols (24-norcholestadienol, campestérol, sitostérol, β -cholestanol et stigmastérol) ont été identifiés dans le tissu des moules dont les proportions varient entre 0,6% et 3% des stérols totaux identifiés.

L'analyse des oxystérols dans les extraits de moules révèle essentiellement chez les moules JL et OL une forte augmentation de 7-cétocholestérol issu d'une auto-oxydation du cholestérol suggérant un stress environnemental important chez ces dernières, en particulier chez les moules JL (**Tableau V**).

Tableau IV : Proportions des principaux stérols identifiés dans le tissu de moules

Composition en stérols en %	ES	JL	OL
24-Norcholestadienol	2,77	2.6	1.8
Cis-22-Dehydroxycholesterol (c-22-DHC)	1.6	2.8	2.0
Trans-22-Dehydroxycholesterol (t-22-DHC)	9.0	11.7	11.5
Cholestérol	42.9	44.2	45.3
β -cholestanol	1.2	1.7	2.0
Brassicastérol	26.3	20.5	21.5
24-méthylène-cholestérol	12.3	9.0	9.3
Campesterol	1.7	3.0	2.9
Stigmasterol	0.6	1.5	1.2
sitostérol	1.7	3.0	2.7

Tableau V : Composition en cholestérol et dérivés oxydés (oxystérols) de moules

Cholestérol et dérivés en $\mu\text{g/g}$ tissus secs	ES	JL	OL
7 α -Hydroxycholestérol	$1,6 \cdot 10^{-1}$	1,2	$5,3 \cdot 10^{-1}$
7 β -Hydroxycholestérol	$2,9 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$1,3 \cdot 10^{-1}$
7-Cétocholestérol	$1,2 \cdot 10^{-2}$	<u>$9,8 \cdot 10^{-1}$</u>	<u>$5,1 \cdot 10^{-1}$</u>
Cholestérol	$4,9 \cdot 10^1$	$5,5 \cdot 10^1$	$3,1 \cdot 10^1$

2. CARACTERISATION DE LA TOXICITE DES EXTRAITS LIPIDIQUES DE MOULES SUR LES PARAMETRES PLASMATIQUES CHEZ LE RAT

2.1. Effet du traitement sur la protéinémie, la créatinine, l'urée et l'acide urique:

L'effet des extraits lipidiques de moules JL et OL sur la glycémie, la protéinémie, la créatinine, l'urée et l'acide urique sont présentés dans le **Tableau VI**.

Tableau VI : Paramètres glycémiques et rénaux chez les rats traités avec les extraits lipidiques de moules

Paramètres	Contrôle	OL (1,4 mg/100 g de poids vif)	JL (1,4 mg/100 g de poids vif)	OL (2,8 mg/100 g de poids vif)	JL (2,8 mg/100 g de poids vif)
Glycémie (mmol/L)	6,8 ± 1,0	8,4 ± 1,4	8,7 ± 1,0	10,4 ± 2,3	10,9 ± 2,6**
Urée (mmol/L)	5,2 ± 2,0	6,4 ± 2,6	7,0 ± 1,2	7,3 ± 2,6	7,7 ± 1,3
Créatinine (µmol/L)	71 ± 5,6	73 ± 6	109 ± 13**	99 ± 11**	108 ± 8**
Acide Urique (mmol/L)	222 ± 37	243 ± 59	279 ± 54	293 ± 72	343 ± 39
Protéines totales (g/L)	70 ± 8	66 ± 10	51 ± 18	67 ± 11	63 ± 7
Albumine (g/L)	37 ± 5	42 ± 8	27 ± 8	39 ± 9	38 ± 8

(Nombre d'animaux par lot ; N=4). Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par l'ANOVA suivie du post-Test de Tukey (HSD : honestly significant difference). (*) P<0,05, (**) P<0,01.

La glycémie est légèrement augmentée chez les rats traités avec les concentrations 1,4 mg d'extraits lipidiques OL et JL par rapport aux rats contrôle qui ont une glycémie (6,8 ± 1 mM). Avec les concentrations 2,8 mg d'extrait lipidique JL, le taux du glucose dans le plasma des rats a significativement augmenté (p > 0.05) pour atteindre une concentration de 10,9 ± 2,6 mM. Une augmentation non significative de la glycémie (10,4 ± 2,3 mM) est observée dans le plasma des rats traités avec la concentration 2,8 mg d'extrait lipidique OL.

Aucune variation en taux d'urée et d'acide urique n'a été constatée dans le plasma des animaux traités avec les extraits lipidiques JL et OL. Il en est de même pour la protéinémie et les taux d'albumine dans le plasma des animaux. Les résultats du dosage de la créatinémie montrent que les teneurs totales en créatinine dans le plasma des rats augmentent en fonction de la concentration des extraits lipidiques de moule JL. En revanche, avec les moules du site OL, on note une variation moins importante du taux de créatinine plasmatique chez les rats traitées avec la concentration 2,8 mg d'extrait lipidique.

2.2. Effet du traitement sur les transaminases et la phosphatase alcaline.

Les résultats des taux plasmatiques en aspartate aminotransférase (ASAT), alanine aminotransférase (ALAT) et phosphatase alcaline sont présentés **Tableau VII**.

Tableau VII : Paramètres hépatiques chez les rats traités avec les extraits lipidiques de moules

Paramètres	Contrôle	OL (1,4 mg/100 g de poids vif)	JL (1,4 mg/100 g de poids vif)	OL (2,8 mg/100 g de poids vif)	JL (2,8 mg/100 g de poids vif)
ASAT	45 ± 7	119 ± 58	97 ± 21	173 ± 41**	124 ± 29**
ALAT	64 ± 15	125 ± 58	142 ± 23**	143 ± 12**	119 ± 14**
ALK.PHOS U/L	165 ± 17	189 ± 46	181 ± 54	186 ± 22	174 ± 30

(Nombre d'animaux par lot ; N=4). ASAT : aspartate aminotransférase, ALAT : l'alanine aminotransférase, ALK.PHOS : alcaline phosphatase ; Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par l'ANOVA suivie du post-Test de Tukey (HSD : honestly significant difference). (*) P<0,05, (**) P<0,01.

Aucune variation significative des concentrations de la phosphatase alcaline n'a été observée dans le plasma des animaux en fonction des concentrations des extraits lipidiques de moules OL et JL administrés. Les résultats de dosage des concentrations plasmatiques en transaminases montrent une variation moins importante en ASAT et ALAT dans le plasma des rats traités avec les concentrations 1,4 mg d'extraits lipidiques OL et JL. Toutefois, cette variation en taux des transaminases plus importante chez les animaux traités avec les concentrations 2,8 mg.

2.3. Effet du traitement sur le bilan lipidique:

Les résultats des triglycérides (TG), cholestérol total (CT), Cholestérol des lipoprotéines de haute densité (C-HDL), cholestérols des lipoprotéines basse densité (C-LDL), et du rapport CT/C- HDL, sont regroupés dans le **Tableau VIII**.

Nous notons une augmentation significative de la triglycéridémie chez les rats traités avec les concentrations 2,8 mg JL et OL par rapport aux rats contrôle. En ce qui concerne CT, une légère augmentation non significative est notée dans le plasma des rats traités avec les extraits lipidiques OL et JL par rapport au contrôle. Toutefois, la concentration en C-HDL est nettement plus élevée (P<0,05) chez les rats traités par rapport au contrôle. Quant aux taux de C-LDL, aucun changement n'est observé dans le plasma des rats traités OL et JL. Le rapport CT/C-HDL, est significativement

plus élevé ($P < 0,05$) chez les contrôles comparativement aux rats traités avec les extraits lipidiques OL et JL.

Tableau VIII : Bilan lipidique chez les rats traités avec les extraits lipidiques de moules

Paramètres	Contrôle	OL 1,4	JL 1,4	OL 2,8	JL 2,8
TG (mmol/L)	1,8 ± 0,3	2,7 ± 0,5	2,3 ± 0,6	3,4 ± 0,4**	3,3 ± 0,6**
CT (mmol/L)	5,4 ± 1,5	6,6 ± 2,4	6,1 ± 2,1	7,4 ± 0,9	7,7 ± 1,3
C- HDL (mmol/L)	1,0 ± 0,2	2,6 ± 0,8**	2,4 ± 1,1**	3,3 ± 0,6**	3,3 ± 0,9**
C- LDL (mmol/L)	4,1 ± 1,4	3,5 ± 2,4	3,3 ± 1,1	3,4 ± 1,0	3,7 ± 0,8
CT/C- HDL	5,4 ± 1,2	2,7 ± 1,3	2,8 ± 0,9**	2,3 ± 0,5**	2,4 ± 0,3**

(Nombre d'animaux par lot ; N=4). TG : triglycérides, CT/C-HDL : rapport cholestérol total (CT)/cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL-C), C- LDL : lipoprotéines de basse densité. Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par l'ANOVA suivie du post-Test de Tukey (HSD : honestly significant difference). () $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$.*

3. CARACTERISATION DE LA TOXICITE DES EXTRAITS LIPIDIQUES DE MOULES SUR LES CELLULES BETA PANCREATIQUES MURINES (MIN-6)

Afin de préciser les effets des extraits lipidiques de moules sur les cellules β pancréatiques murines (MIN-6), différentes méthodes de biochimie, d'imagerie et cytométrie en flux ont été utilisées. Les effets des extraits lipidiques de moules (OL et JL) ont été évalués sur :

- La prolifération et l'induction de la mort cellulaire,
- Le dysfonctionnement des organites : mitochondries, lysosomes, peroxyosomes,
- Le stress oxydant et la peroxydation lipidique,
- La sécrétion d'insuline : principale fonction des cellules β pancréatiques MIN-6.

3.1. Prolifération des cellules MIN-6

La prolifération des cellules MIN-6 a été étudiée en conditions normo-glycémique (Glucose = 5 mmol/L) et hyper-glycémique (glucose = 25 mmol/L). Dans ces conditions, les cellules MIN-6 ont été cultivées dans des plaques 24 puits à $2 \cdot 10^5$ cellules/puits, pendant 72 h. La numération des cellules MIN-6 est effectuée toutes les 24 h par coloration Bleu Trypan et comptage sur compteur automatique (*Bio-Rad*). La prolifération des cellules MIN-6 a été suivie par numération du nombre total des cellules (mortes et vivantes). Les résultats obtenus sont présentés **Figure 26**.

La prolifération des cellules MIN-6 est faible en condition normo-glycémique par rapport à la condition hyper-glycémique. En effet, le nombre total de cellules MIN-6 cultivées en condition hyperglycémique (glucose : 25 mmol/L) a doublé pendant 24 h, alors qu'il faut 48 h pour que les cellules MIN-6 doublent en condition normoglycémique (glucose : 5 mmol/L).

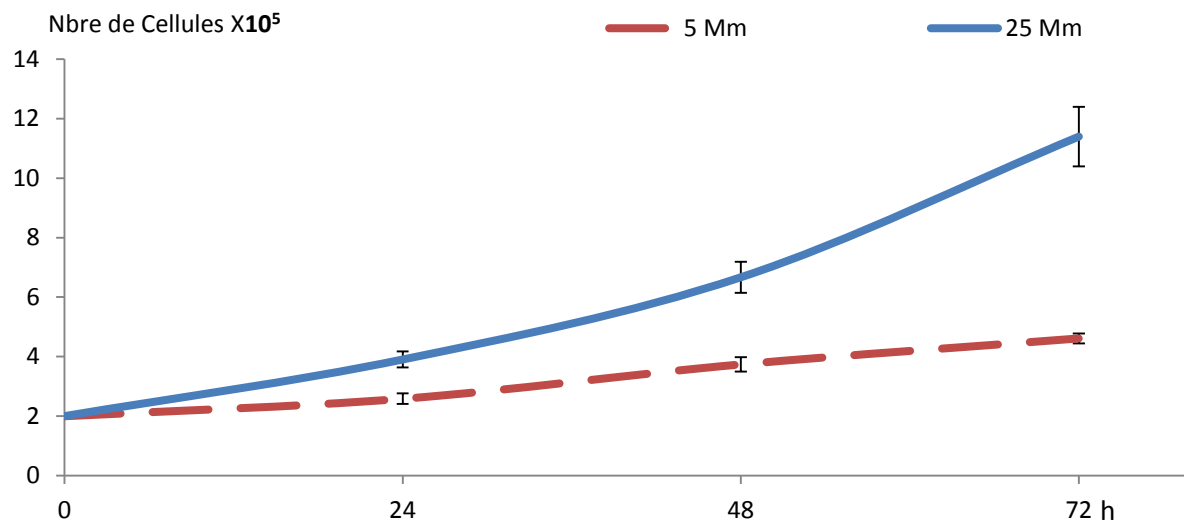


Figure 26 : Courbe de croissance des cellules MIN-6 en fonction du taux de glucose

Les cellules MIN-6 ont été cultivées en conditions normo-glycémique (5 mM) et hyper-glycémique (25 mM) pendant 72 h. Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne \pm SEM. L'analyse des données est faite par ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$.

3.2. Effets des extraits lipidiques sur la prolifération des cellules MIN-6

3.2.1. Comptage des cellules MIN-6 par coloration au Bleu Trypan

Le nombre total de cellules MIN-6 a été déterminé par coloration au Bleu Trypan et comptage automatique (*TC20 automated cell counter, Bio-Rad*). Les cellules MIN-6 ont été cultivées pendant 48 h en présence de différents extraits lipidiques (OL, JL et ES) utilisés à différentes concentrations (25, 50, 100, 200 et 400 µg/mL), ceci dans des conditions normo-glycémique (glucose : 5 mmol/L) et hyper-glycémique (glucose : 25 mmol/L). Les résultats obtenus, sont présentés **Figure 27** et calculés par la formule : $R_c(\text{Essai}) = \text{Moyenne essai} / \text{Moyenne contrôle}$.

Dans les conditions normo-glycémiques, le nombre total des cellules MIN-6 traitées par les extraits lipidiques de moules OL et JL baisse de manière significative ($P < 0.01$). Cette diminution est plus marquée avec les extraits lipidiques JL dès la concentration 50 µg/mL. En effet, le R_c (JL) est de $0,64 \pm 0,05$; $0,53 \pm 0,02$ et $0,32 \pm 0,03$ aux concentrations respectives 100, 200 et 400 µg/mL alors que le R_c (OL) est de $0,74 \pm 0,06$; $0,56 \pm 0,02$ et $0,49 \pm 0,08$ aux concentrations respectives de 100, 200 et 400 µg/mL. De même, le 7KC (20 µg/mL) utilisé en tant que contrôle positif de toxicité, a baissé significativement la prolifération ($R_c = 0,53 \pm 0,08$).

Des effets similaires ont été observés en conditions hyper-glycémiques. Les extraits lipidiques OL et JL impactent négativement la prolifération des cellules MIN-6. Le R_c (JL) est de $0,75 \pm 0,02$; $0,55 \pm 0,04$; $0,49 \pm 0,09$ et $0,37 \pm 0,02$ correspondant aux concentrations 50, 100, 200 et 400 µg/mL. Dans la même gamme de concentrations, le R_c (OL) est de $0,76 \pm 0,04$; $0,65 \pm 0,04$; $0,53 \pm 0,06$ et $0,51 \pm 0,06$. Le 7KC (20 µg/mL) en condition hyper-glycémique n'a aucun effet sur la prolifération des cellules MIN-6.

En revanche, les extraits lipidiques ES n'ont aucun effet sur la prolifération des cellules MIN-6, quelles que soient les conditions de culture (normo ou hyperglycémique).

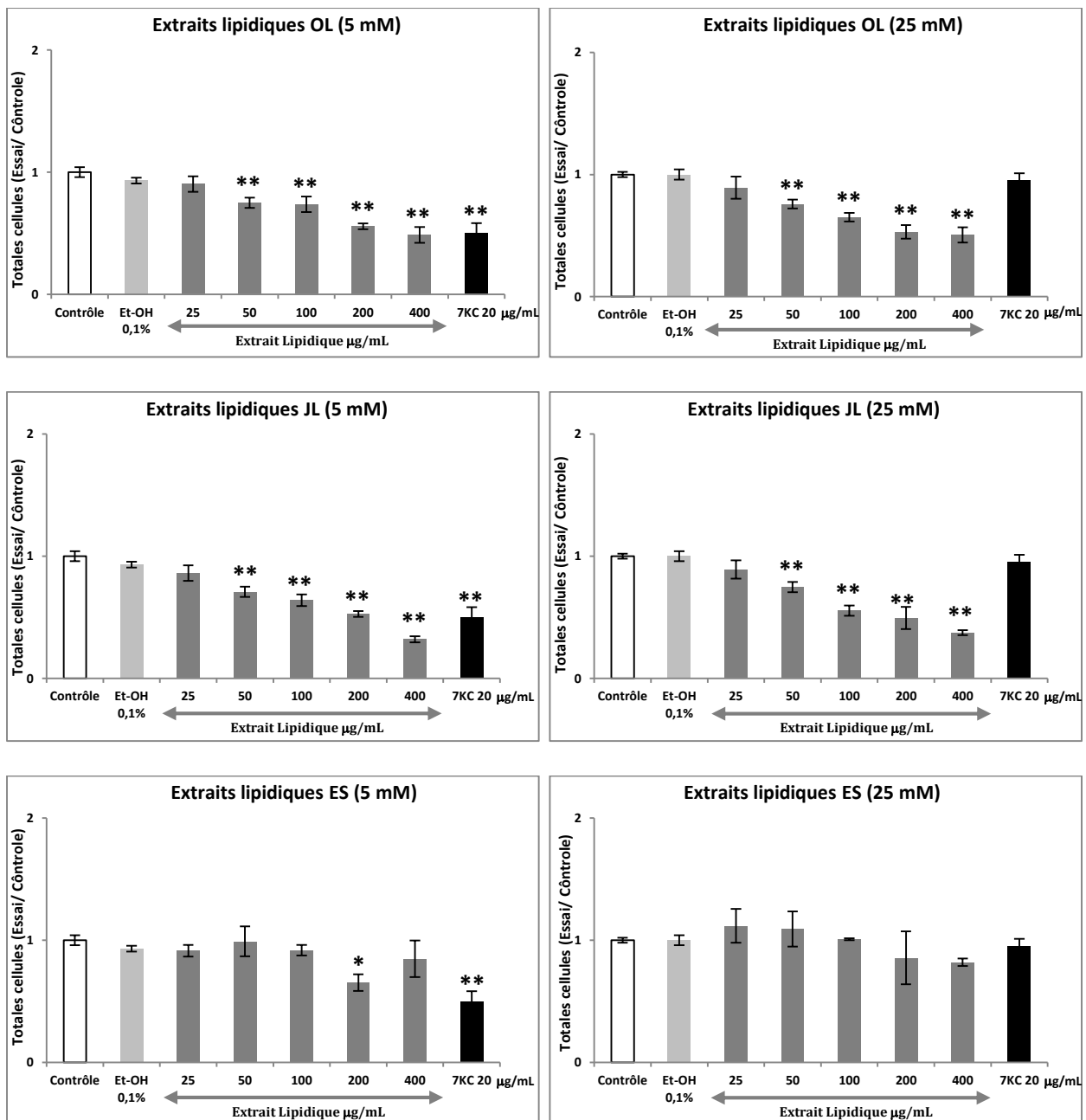


Figure 27 : Numération des cellules MIN-6 en présence de différents extraits lipidiques de moules

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique (5mM) et hyper-glycémique (25 mM) pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES, solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) P<0,05, (**) P<0,01.

3.2.2. Morphologie des cellules MIN-6

L'effet des différents traitements des extraits lipidiques de moules sur la morphologie des cellules MIN-6 (taille, contours du cytoplasme et regroupement des cellules en amas) a été analysée après 24 h de traitement, l'aspect morphologique des cellules cultivés en plaques 24 puits a été analysé au microscope à contraste de phase équipé d'une caméra (*Axiovert 40 CFL, Zeiss*). Les images obtenues sont présentés **Figure 28** (condition normo-glycémique) et **Figure 29** (condition hyper-glycémique).

Sous microscope à contraste de phase, les cellules MIN-6 non traitées, sont assez nombreuses et regroupées en amas. Ces cellules se caractérisent par des tailles assez grandes et des formes polyédriques, avec des prolongements cytoplasmiques assez bien développés.

En fonction des concentrations d'extraits lipidiques JL et OL utilisés, les cellules MIN-6 ont un aspect morphologique différent de celui observé chez les cellules MIN-6 non traitées (contrôle). Par ailleurs, plus les concentrations utilisées en extraits OL et JL sont élevées, plus le nombre de cellules MIN-6 est faible (confluence diminuée). L'effet le plus marquant est observé sur les cellules MIN-6 traitées en conditions normo-glycémique pour les concentrations 200 et 400 µg/mL JL et OL. Les cellules sont alors dispersées, de tailles variables généralement petites et de formes arrondies (perte d'adhésion). Les prolongements cytoplasmiques (observés chez les cellules contrôles) sont réduits. Un aspect morphologique similaire a été observé sur cellules MIN-6 traitées avec 7KC (20 µg/mL).

En conditions hyper-glycémiques, des modifications moins importantes de l'aspect morphologique ont été observée sur MIN-6 traitées par les extraits OL et JL. En effet, aux concentrations (200 et 400 µg/mL), les cellules MIN-6 sont toujours dispersées mais avec une taille plus importante qu'en condition normo-glycémique. Les prolongements sont moins arrondis.

En revanche, les extraits lipidiques ES, ne semblent avoir aucun effet sur l'aspect morphologique des cellules MIN-6 quelles que soient les conditions de culture (normo ou hyperglycémique).

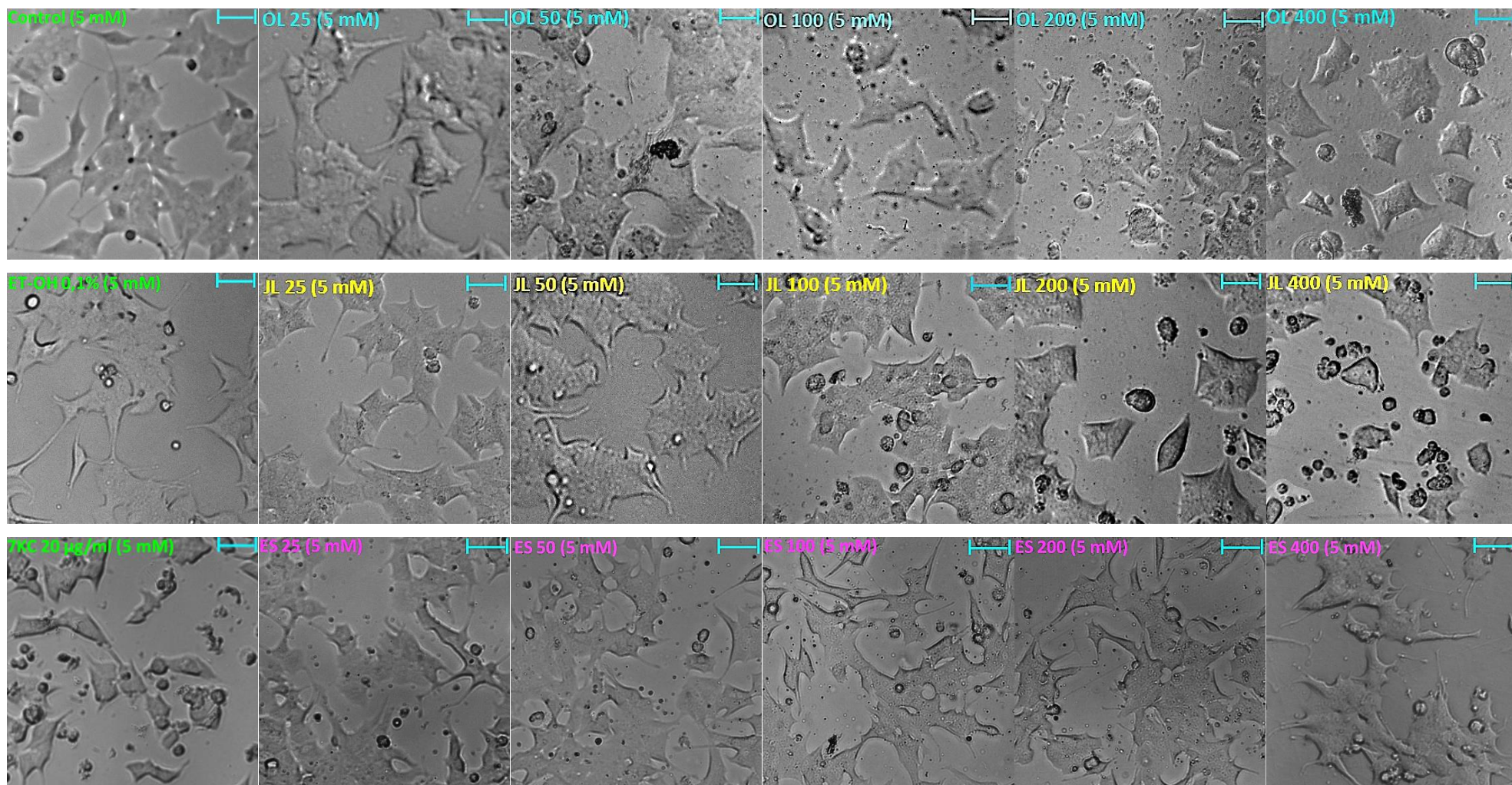


Figure 28 : Analyse par microscopie à contraste de phase de la morphologie des cellules MIN-6 (condition normo-glycémique : 5 mM)

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en condition normo-glycémique (5mM) pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Ensuite, elles ont été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES, solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire).

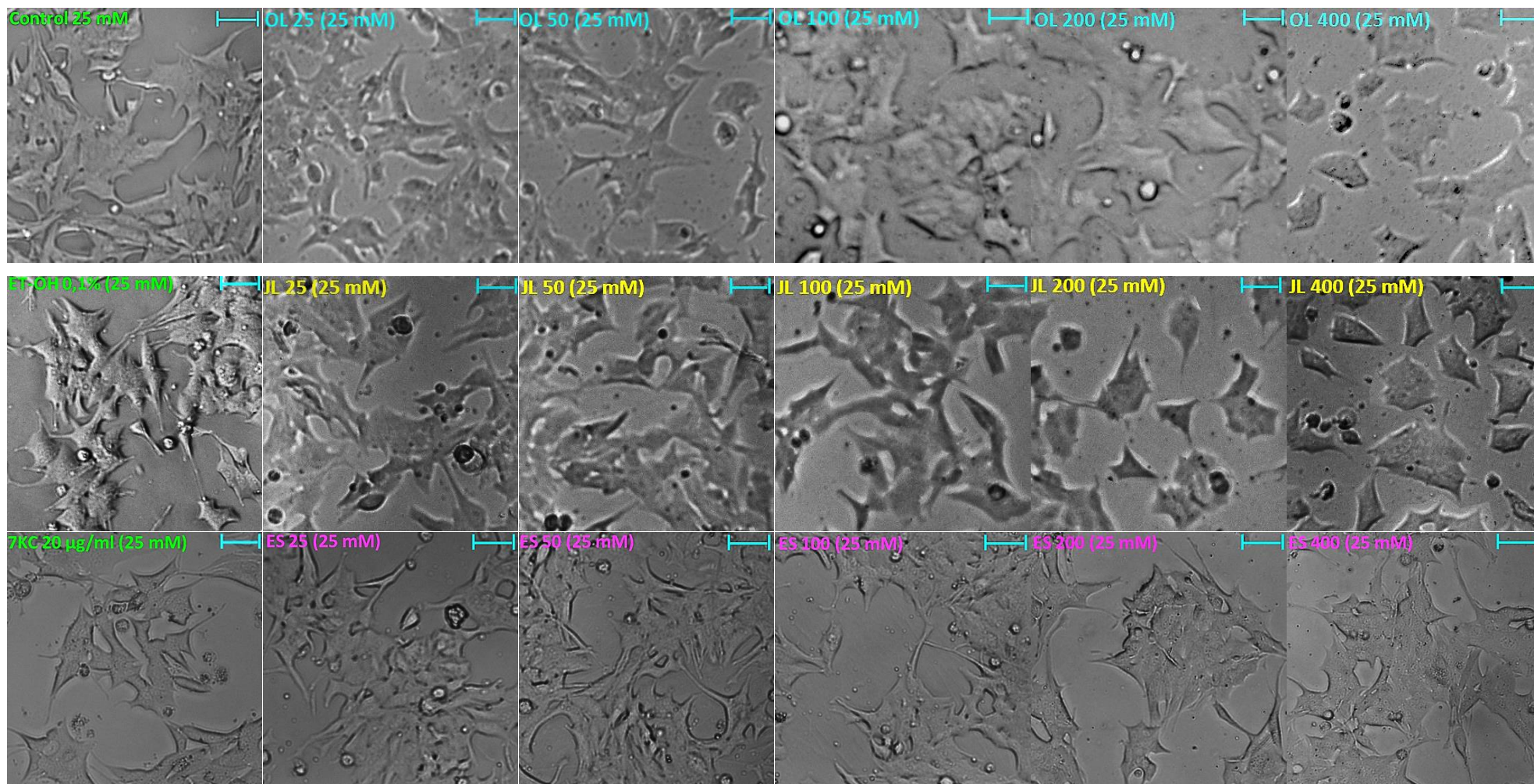


Figure 29 : Analyse par microscopie à contraste de phase de la morphologie des cellules MIN-6 (condition hyper-glycémique : 25 mM)

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en condition hyper-glycémique (25 mM) pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Ensuite, elles ont été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 μg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES, solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 μg/mL) a été utilisé en tant que molécule de référence (inducteur de mort cellulaire).

3.2.3. Evaluation de la confluence cellulaire par coloration au Crystal Violet

L'effet des extraits lipidiques de moules sur la confluence des cellules MIN-6 a été mesuré par coloration au Crystal Violet. Les cellules MIN-6 ont été cultivées en plaques 24 puits à la densité de 2.10^5 cellules/puits, pendant 48 h en présence d'extraits lipidiques OL, JL et ES, utilisés à différentes concentrations (25, 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ceci dans des conditions normo-glycémique et hyper-glycémique. Les résultats obtenus, sont présentés **Figure 30**, sous forme de Moyenne \pm SEM en étant calculé selon la formule suivante : $R_c(\text{Essai}) = \text{Moyenne essai}/\text{Moyenne contrôle}$.

En condition normo-glycémique, les extraits lipidiques de moules JL diminuent la confluence des cellules MIN-6. Cette baisse est significative ($P < 0.01$) à partir de la concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits JL. En Effet, le R_c (JL) est respectivement de $0,91 \pm 0,03$; $0,79 \pm 0,02$ et $0,58 \pm 0,01$, aux concentrations 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, alors qu'il faut des concentrations ≥ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits OL pour réduire significativement ($P < 0.01$) la confluence des cellules MIN-6. Toutefois, cette baisse de l'état de confluence reste moins marquée que celle observée avec les extraits JL. Aucun effet des extraits ES sur la confluence n'a été détecté. Le 7 KC (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a réduit la confluence des cellules MIN-6.

En condition hyper-glycémique, l'état de confluence des cellules MIN-6 en fonction des différents traitements par les extraits lipidiques OL, JL et ES a suivi les mêmes tendances que celles observées en conditions normo-glycémiques.

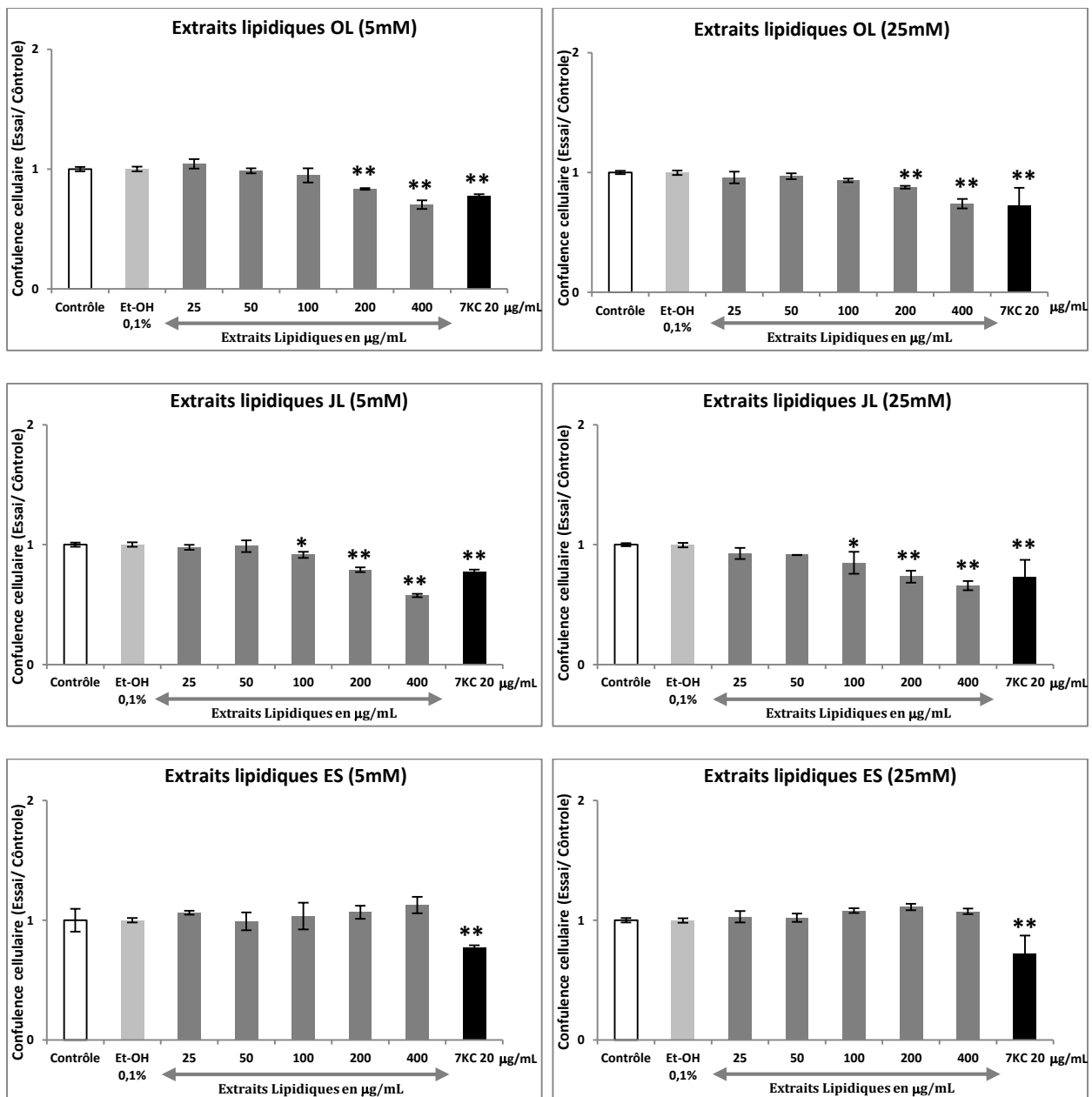


Figure 30 : Analyse par coloration au Crystal violet de la confluence des cellules MIN-6

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 μg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES, solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 μg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) P<0,05, (**) P<0,01.

3.2.4. Evaluation de l'activité succinate déshydrogénase : test MTT

Le test MTT a permis de mesurer l'impact des extraits lipidiques de moules sur la capacité métabolique des cellules MIN-6. Ces dernières ont été cultivées en plaques 96 puits à la densité de 4.10^4 cellules/puits, pendant 48 h en présence des extraits lipidiques OL, JL et ES, utilisés à différentes concentrations (25, 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dans des conditions normo-glycémique et hyper-glycémique. Les résultats obtenus, sont présentés dans la **Figure 31**, sous forme de Moyenne \pm SEM calculés selon la formule suivante : **$R_c(\text{Essai}) = \text{Moyenne essai}/\text{Moyenne contrôle}$** .

En condition normo-glycémique, la capacité métabolique des cellules MIN-6 a significativement baissé ($P < 0.01$) dès la concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits lipidiques de moules OL et JL. Cette baisse est plus marquée sur MIN-6 traitées par les extraits lipidiques JL et s'accroît à mesure que la concentration en extrait lipidique augmente. En Effet, le R_c (JL) est de $0,83 \pm 0,09$; $0,45 \pm 0,02$ et $0,36 \pm 0,03$; le R_c (OL) est de $0,84 \pm 0,03$; $0,66 \pm 0,05$ et $0,54 \pm 0,01$ aux concentrations respectives de 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En revanche, le test MTT ne révèle aucun effet des extraits lipidiques ES excepté à la concentration de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ qui a augmenté significativement la capacité métabolique.

Dans les mêmes conditions, le 7KC (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a réduit la capacité métabolique des cellules MIN-6, ($R_c = 0,78 \pm 0,02$).

En condition hyper-glycémique, l'effet des extraits lipidiques OL et JL sur la capacité métabolique des cellules MIN-6 est détectée dès la concentration 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Néanmoins ces effets restent moins forts que ceux observés dans les conditions normo-glycémiques. En effet, le R_c (JL) est de $0,72 \pm 0,07$; $0,6 \pm 0,1$; $0,57 \pm 0,05$ et $0,43 \pm 0,05$; le R_c (OL) est de $0,72 \pm 0,06$; $0,68 \pm 0,06$; $0,64 \pm 0,11$ et $0,55 \pm 0,08$ respectivement aux concentrations de 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

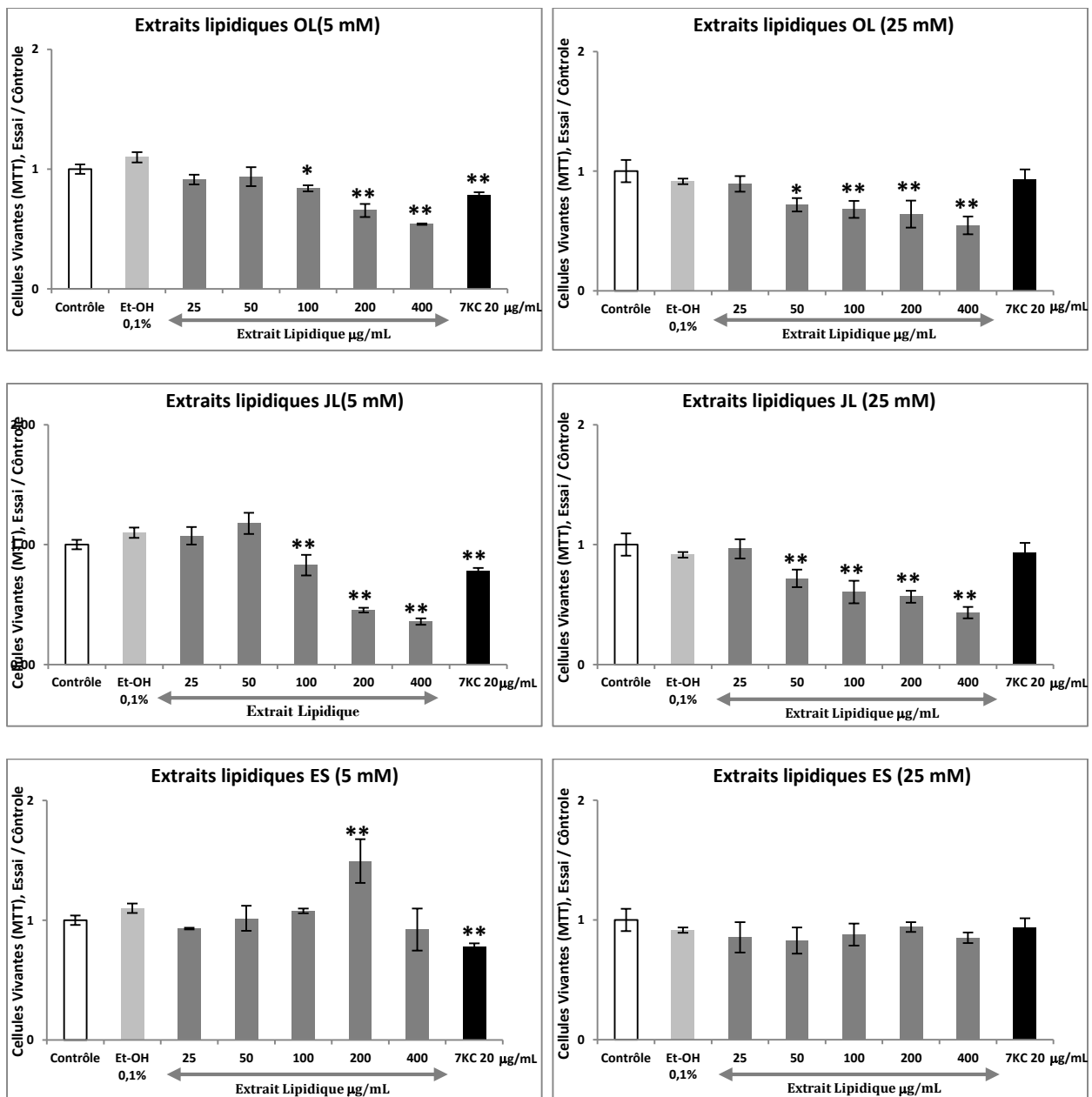


Figure 31 : Evaluation de l'activité de la succinate déshydrogénase : test MTT

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES, solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). L'activité succinate déshydrogénase a été mesurée par le test MTT. Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) P<0,05, (**) P<0,01.

3.2.5. Evaluation de l'activité lactate déshydrogénase

Le test de l'activité lactate déshydrogénase (LDH) a permis de mesurer les effets cytotoxiques des extraits lipidiques de moules sur MIN-6. L'activité LDH a été mesurée dans le milieu de culture. Les MIN-6 ont été cultivée en plaques à 24 puits à la densité de $2 \cdot 10^5$ cellule/puits, pendant 48 h en présence des différents extraits lipidiques (OL, JL et ES) utilisés à différentes concentrations (25, 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ceci dans des conditions normo-glycémique et hyper-glycémique. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 32**. L'activité LDH est exprimée en $\text{mU}/10^6$ cellules.

En condition normo-glycémique, dès la concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits lipidiques JL et OL, l'activité LDH a augmenté significativement ($P < 0.01$). Cette augmentation est plus importante avec les extraits JL par rapport à OL. En effet, l'activité LDH mesurée dans le surnageant des cellules MIN-6 traitées aux concentrations 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits JL est respectivement de : 69 ± 2 ; 91 ± 3 et 143 ± 3 $\text{mU}/10^6$ cellules, contre seulement 41 ± 6 $\text{mU}/10^6$ cellules dans les contrôles. Dans la même gamme de concentrations, l'activité LDH dans le surnageant des cellules MIN-6 traitées avec les extraits lipidiques OL est de 58 ± 5 ; 71 ± 7 et 86 ± 4 $\text{mU}/10^6$. En revanche, seule la concentration 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extrait ES a augmenté significativement ($P < 0.05$) l'activité LDH dans le surnageant des cellules MIN-6. Une forte activité LDH a été observée dans le surnageant des cellules MIN-6 traitées par le 7KC (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Toutefois, cette activité reste inférieure à celle observée avec la concentration 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits JL.

En condition hyper-glycémique, les extraits de moules (OL, JL et ES) ont des effets plus marqués sur l'activité LDH qu'en condition normo-glycémique. Les extraits JL ont augmenté significativement l'activité LDH ($P < 0.01$) dès la concentration 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'activité LDH dans le surnageant des cellules MIN-6 traitées avec les extraits lipidique OL a suivi la même tendance que celle observée en condition normo-glycémique. Les extraits ES, dès la concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ont augmenté significativement ($P < 0.05$) l'activité LDH dans le surnageant des cellules MIN-6.

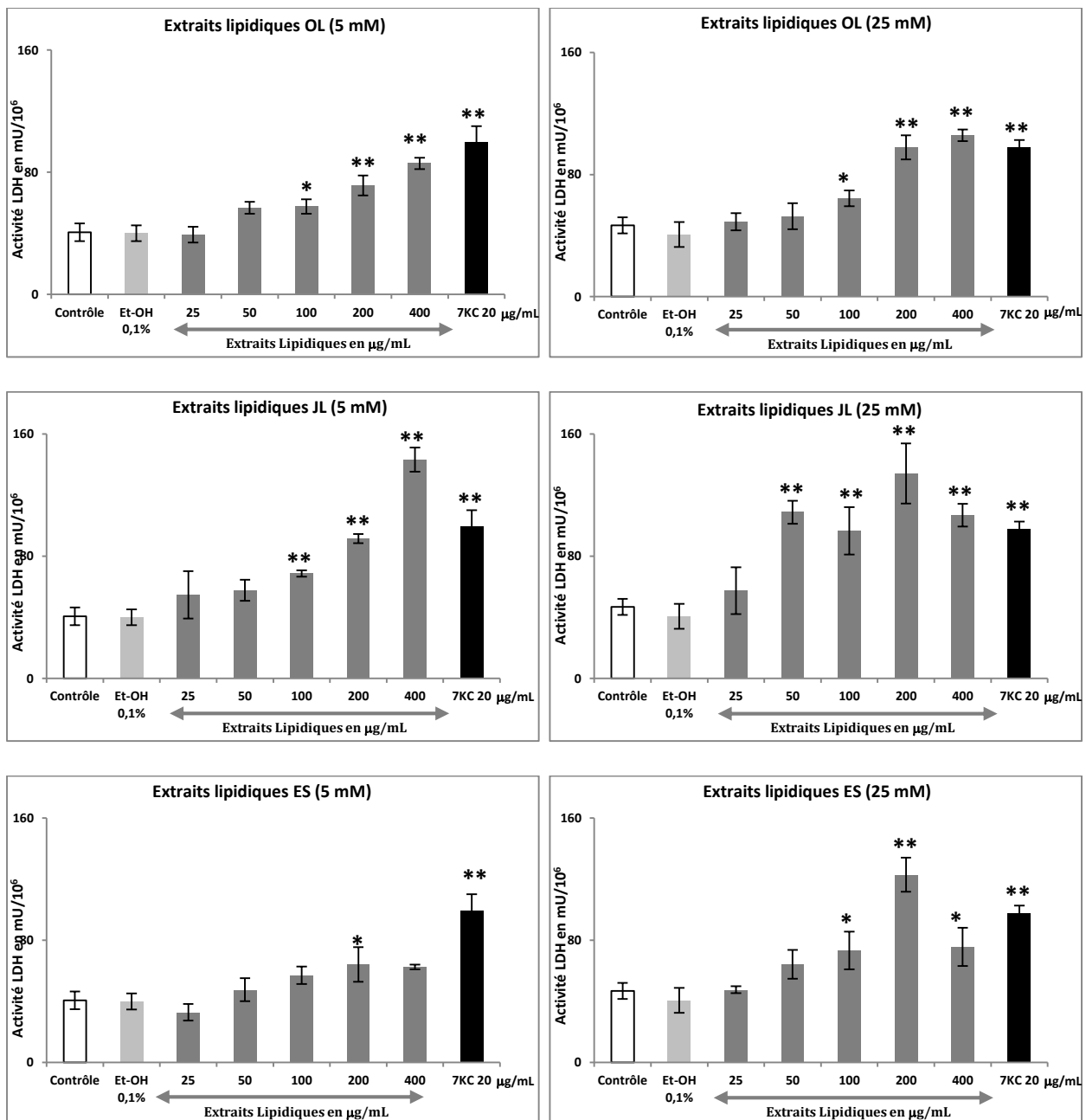


Figure 32 : Evaluation de l'activité lactate déshydrogénase (LDH)

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES, solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) P < 0,05, (**) P < 0,01.

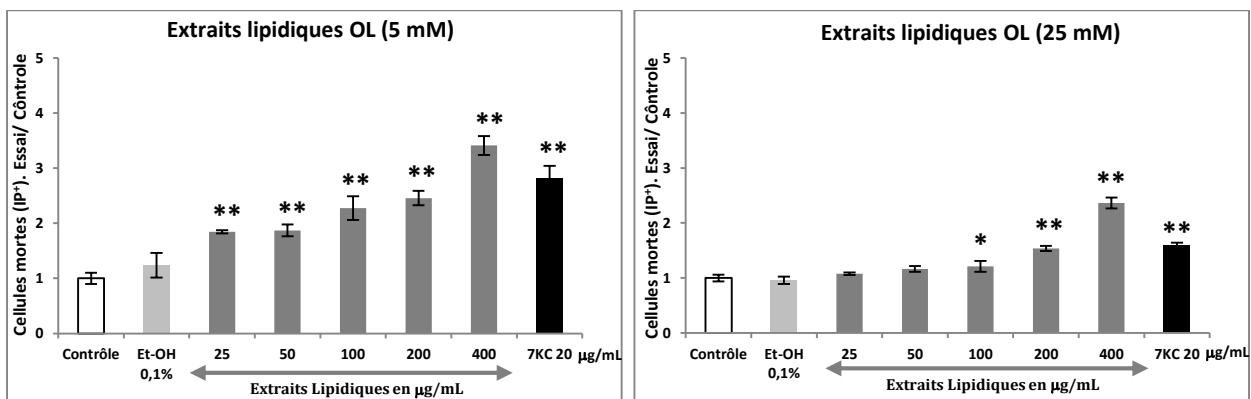
3.2.6. Evaluation de l'intégrité de membrane cytoplasmique par coloration à l'iodure de propidium

L'iodure de propidium (IP) ne pénètre que dans les cellules avec des membranes cytoplasmiques lésées correspondant à des cellules mortes ([Lizard et al. 1995](#)).

Les cellules MIN-6 ont été cultivées en plaques 24 puits à la densité de 2.10^5 cellule/puits pendant 48 h en présence de différents extraits lipidiques (OL, JL et ES) utilisés à différentes concentrations (25, 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dans des conditions normo-glycémique et hyper-glycémique. Les résultats obtenus, sont présentés **Figure 33** sous forme de Moyenne \pm SEM calculés selon la formule suivante : $R_c(\text{Essai}) = \text{Moyenne essai}/\text{Moyenne contrôle}$.

En condition normo-glycémique, la proportion des cellules MIN-6 à membrane lésée a significativement augmenté ($P < 0.01$) dès la concentration 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits OL et JL. Cette altération est dose dépendante et plus marquée sur cellules MIN-6 traitées avec les extraits JL. Le $R_c(\text{JL})$ est de $2,3 \pm 0,3$; $2,8 \pm 0,1$; $3,2 \pm 0,1$ et $4,1 \pm 0,4$; le $R_c(\text{OL})$ est de $1,9 \pm 0,03$; $2,3 \pm 0,2$; $2,5 \pm 0,1$ et $3,4 \pm 2$ aux concentrations respectives de 25, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Le 7KC (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a augmenté d'une manière significative la proportion de cellules à membrane cytoplasmique lésée ($R_c = 2,8 \pm 0,2$). En revanche, les extraits ES n'ont aucun effets sur cellules MIN-6.

En condition hyper-glycémique, les effets des extraits lipidiques OL et JL sur l'intégrité membranaire des cellules MIN-6 sont moins perçus que ceux observés en conditions normo-glycémiques. En effet, il fallait des concentrations $\geq 100 \mu\text{g}/\text{mL}$, pour observer une différence significative ($P < 0.05$). Le $R_c(\text{JL})$ est d'environ $1,3 \pm 0,1$; $1,9 \pm 0,15$ et $3,3 \pm 0,2$ Verus $R_c(\text{OL})$ de : $1,2 \pm 0,1$; $1,5 \pm 0,1$ et $2,4 \pm 0,1$ correspondant aux concentrations 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivement. Quant aux extraits lipidiques ES, une altération légèrement importante est enregistrée avec les concentrations 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dont le $R_c(\text{ES})$ est d'environ $1,3 \pm 1$ et $1,7 \pm 0,1$ respectivement.



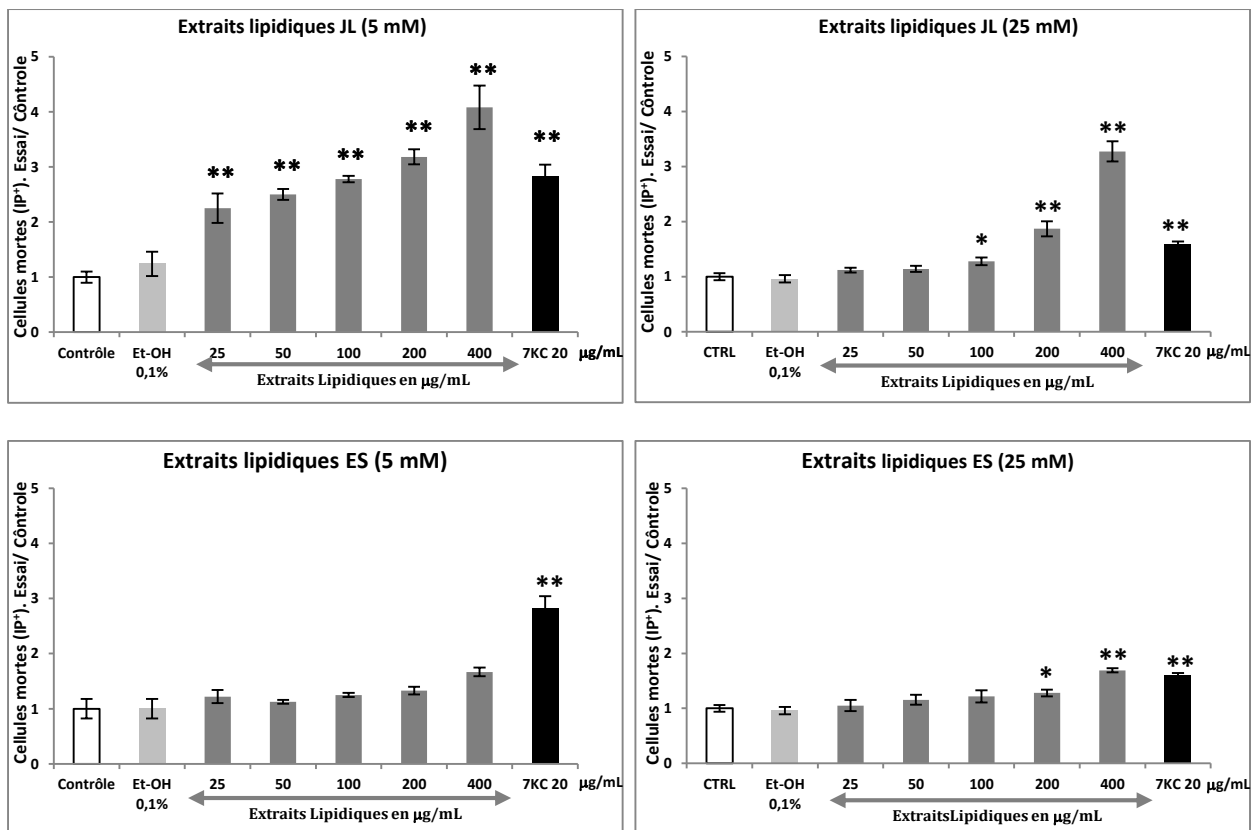


Figure 33 : Evaluation de l'intégrité de la membrane cytoplasmique des cellules MIN-6

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES, solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). L'intégrité de la membrane cytoplasmique a été mesurée par cytométrie en flux après coloration à l'IP. Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$.

3.2.7. Analyse du cycle cellulaire des cellules MIN-6

Par cytométrie en flux, nous avons analysé la répartition des cellules MIN-6 dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction du traitement par les extraits lipidiques. La modélisation du cycle cellulaire a été faite à l'aide du logiciel FlowJo en utilisant le modèle du Dean-Jett Fox. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 34** (condition normo-glycémique) et **Figure 35** (condition hyper-glycémique).

En condition normo-glycémique, les cellules MIN-6 non traitées (contrôle) sont réparties comme suit : 48 % en phase G0/G1, 14 % en phase S et 38 % en phase G2/M. Après 48 h de traitement par les extraits JL, la distribution des cellules MIN-6 a évolué par rapport à celle observée avec les cellules MIN-6 non traitées (contrôle). Plus la concentration en extraits JL augmente, plus la proportion des cellules MIN-6 en phase S diminue. Cette diminution est associée à une augmentation des cellules en phase G2/M. L'effet le plus marquant est la disparition des cellules en phase S, observé avec les cellules traitées par 400 µg/mL d'extraits JL. Avec les extraits OL, les proportions de cellules en phase S augmentent avec la concentration. Environ 60% de cellules traitées par 400 µg/mL d'extraits OL se trouvent en phase S et 40% en phase G0/G1. Dans les mêmes conditions, le 7KC induit des modifications mineures de la répartition des cellules MIN-6 dans les différentes phases du cycle cellulaire.

En condition hyper-glycémique, les cellules MIN-6 non traitées (contrôle) sont réparties comme suit : 43% en phase (G0/G1), 12 % en phase S et 45 % en phase G2 (G2/M). En condition hyperglycémique, les traitements par les extraits lipidiques et le 7KC n'ont aucun effet sur la répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire.

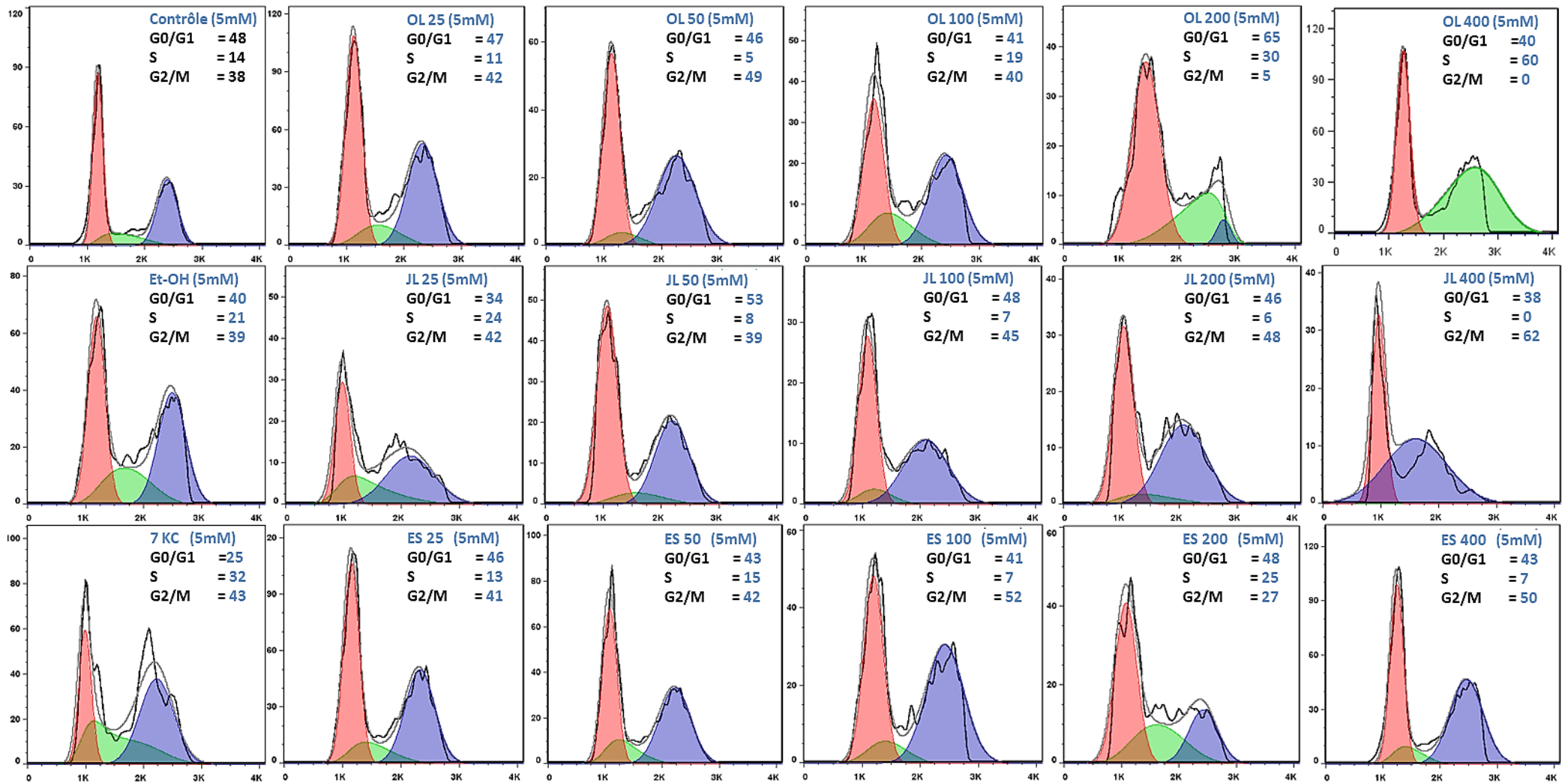


Figure 34 : Analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire des cellules MIN-6 cultivées en conditions normo-glycémiques

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en condition normo-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES, solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). Le cycle cellulaire des cellules MIN-6 a été analysé par cytométrie en flux (coloration par l'IP).

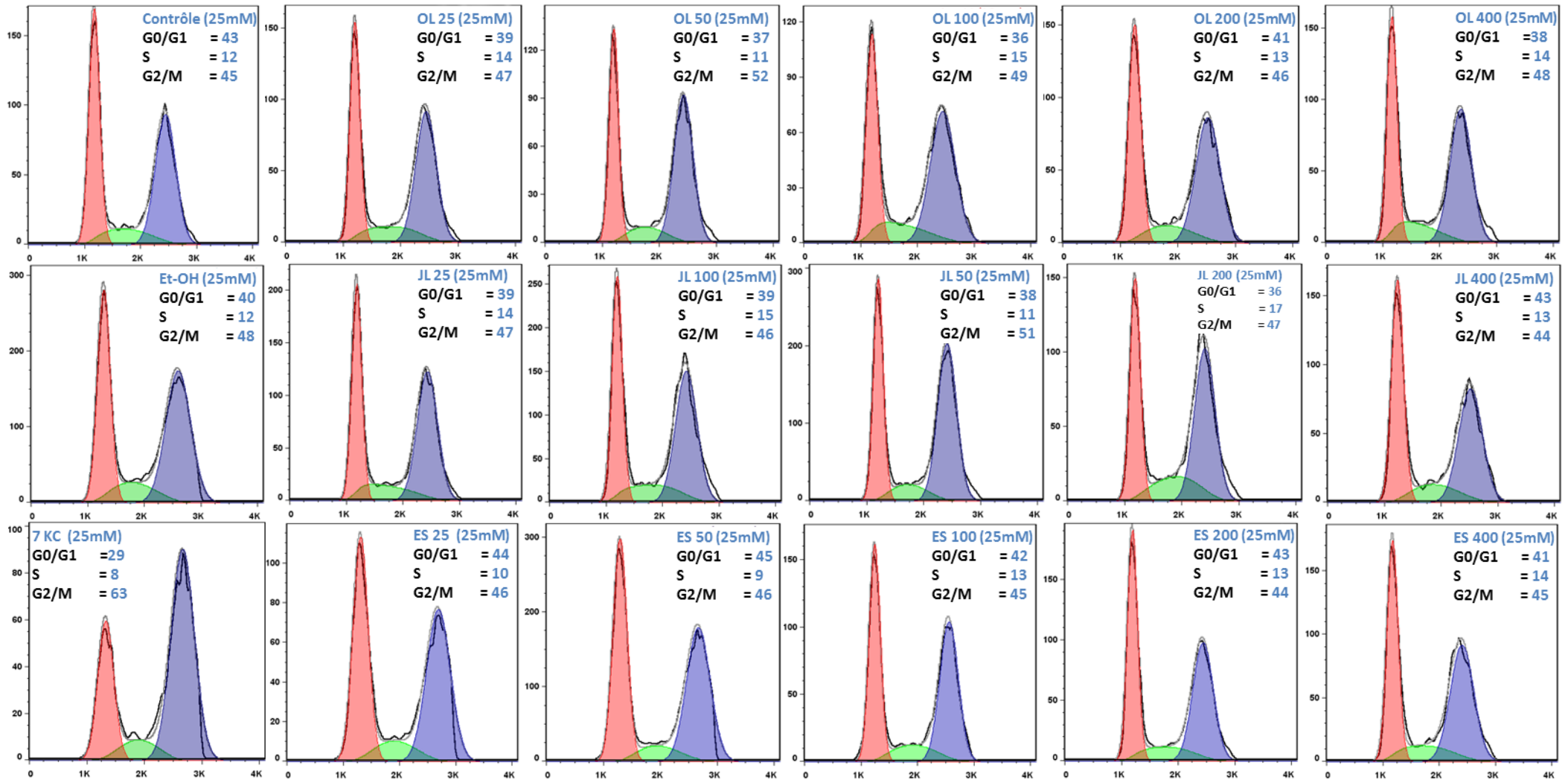


Figure 35 : Analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire des cellules MIN-6 cultivées en conditions hyper-glycémiques

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en condition hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES, solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). 7 KC (20 µg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). Le cycle cellulaire des cellules MIN-6 a été analysé par cytométrie en flux (coloration par l'IP).

3.3. Effet sur les organites cellulaires

3.3.1. Effets des extraits lipidiques sur le potentiel transmembranaire mitochondriale

L'effet des extraits lipidiques de moules OL, JL et ES sur le potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) des cellules MIN-6 a été caractérisé par coloration au DIOC₆(3) et analyse par cytométrie en flux. Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en plaques 24 puits à une densité de $2 \cdot 10^5$ cellules/puits puis traitées pendant 48 h en présence de différents extraits lipidiques (OL, JL et ES) à différentes concentrations (25, 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique. Les résultats obtenus, sont présentés **Figure 36**, sous forme de Moyenne \pm SEM, calculés par la formule : $R_c(\text{Essai}) = \text{Moyenne essai} / \text{Moyenne contrôle}$.

En condition normo-glycémique, les extraits lipidiques OL et JL ont augmenté significativement ($P < 0.05$) les proportions de cellules MIN-6 avec des mitochondries dépolarisées dès la concentration 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de la concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits JL et OL, la proportion de cellules avec des mitochondries dépolarisées devient très significative ($P < 0.01$). Les effets les plus prononcés sont obtenus par les extraits JL. Le R_c (JL) est de $1,3 \pm 0,2$; $1,9 \pm 0,02$; $2,2 \pm 0,03$ et $2,5 \pm 0,1$; le R_c (OL) est de : $1,2 \pm 0,1$; $1,5 \pm 0,2$; $1,6 \pm 0,2$ et $2,0 \pm 0,2$, correspondant respectivement aux concentrations 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dans les mêmes conditions, il faut des concentrations ≥ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits lipidiques ES pour induire une dépolarisation mitochondriale. Le 7KC (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induit une diminution de $\Delta\Psi_m$.

En condition hyper-glycémique, seuls les extraits lipidiques JL (dès la concentration 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ont significativement ($P < 0.01$) impacté $\Delta\Psi_m$. Ces effets sont moins marqués que ceux obtenus en condition normo-glycémique. En effet, le R_c (JL) est de $1,4 \pm 0,1$; $1,5 \pm 0,02$; $1,7 \pm 0,1$ et $2,1 \pm 1$ aux concentrations respectives de 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

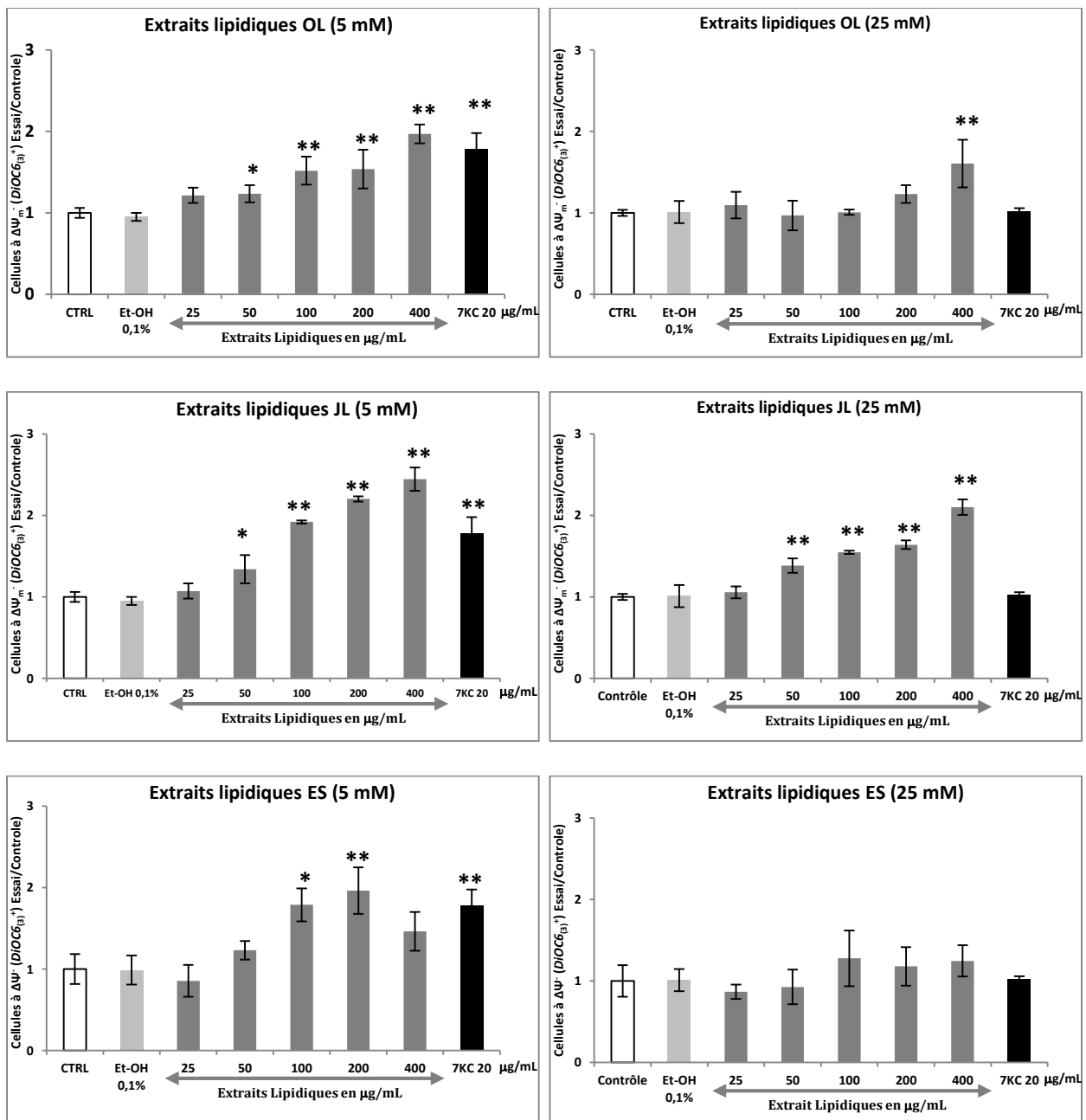


Figure 36 : Mesure du potentiel transmembranaire mitochondriale par coloration au DIOC₆(3)

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 μg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES, solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). 7KC (20 μg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). Le potentiel transmembranaire mitochondriale a été mesuré par cytométrie en flux et coloration par le DIOC₆(3). Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) P<0,05, (**) P<0,01.

3.3.2. Effets des extraits lipidiques sur la stabilité des lysosomes des cellules MIN-6

Les effets des extraits lipidiques de moules OL, JL et ES sur la stabilité des lysosomes des cellules MIN-6 ont été évalués avec l'acridine orange (AO) et analyse par cytométrie en flux.

Les cellules MIN-6 ont été cultivées en plaques 24 puits à la densité de $2 \cdot 10^5$ cellules/puits, puis traitées pendant 48 h avec différents extraits lipidiques (OL, JL et ES) à différentes concentrations (25, 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 37** sous forme de Moyenne \pm SEM et calculés par la formule : $R_c (\text{Essai}) = \text{Moyenne essai} / \text{Moyenne contrôle}$

En condition normo-glycémique, l'analyse par cytométrie en flux a révélé une déstabilisation significative ($P < 0.01$) des lysosomes des cellules MIN-6 par les extraits lipidiques OL, JL et ES. Les effets les plus marqués ont été observés dès la concentration 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits OL et JL. Le R_c (JL) est $1,7 \pm 0,1$; $2,2 \pm 0,2$; $2,4 \pm 0,3$; $2,7 \pm 0,1$ et $3,2 \pm 0,3$; le R_c (OL) est de $1,6 \pm 0,1$; $1,9 \pm 0,2$; $2,0 \pm 0,1$; $2,2 \pm 0,1$ et $3,0 \pm 0,2$ aux concentrations respectives de 25, 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Avec les extraits lipidiques ES, des concentrations ≥ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sont nécessaires pour avoir une déstabilisation lysosomale des cellules MIN-6. Le R_c (ES) calculé est de $1,5 \pm 0,1$ et $1,8 \pm 0,1$ correspondant aux concentrations respectives de 100 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ces effets sont moins prononcés par rapport aux extraits OL et JL. Dans les mêmes conditions, le 7KC (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a augmenté significativement la déstabilisation des lysosomes.

En condition hyper-glycémique, seuls les extraits lipidiques JL ont augmenté les proportions de cellules MIN-6 avec des lysosomes déstabilisés. Les effets observés sont moins marqués que ceux observés en condition normo-glycémique. Ils ne sont significatifs ($P < 0,01$) qu'à partir de la concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Il faut des concentrations ≥ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits lipidiques OL pour détecter des lysosomes déstabilisés.

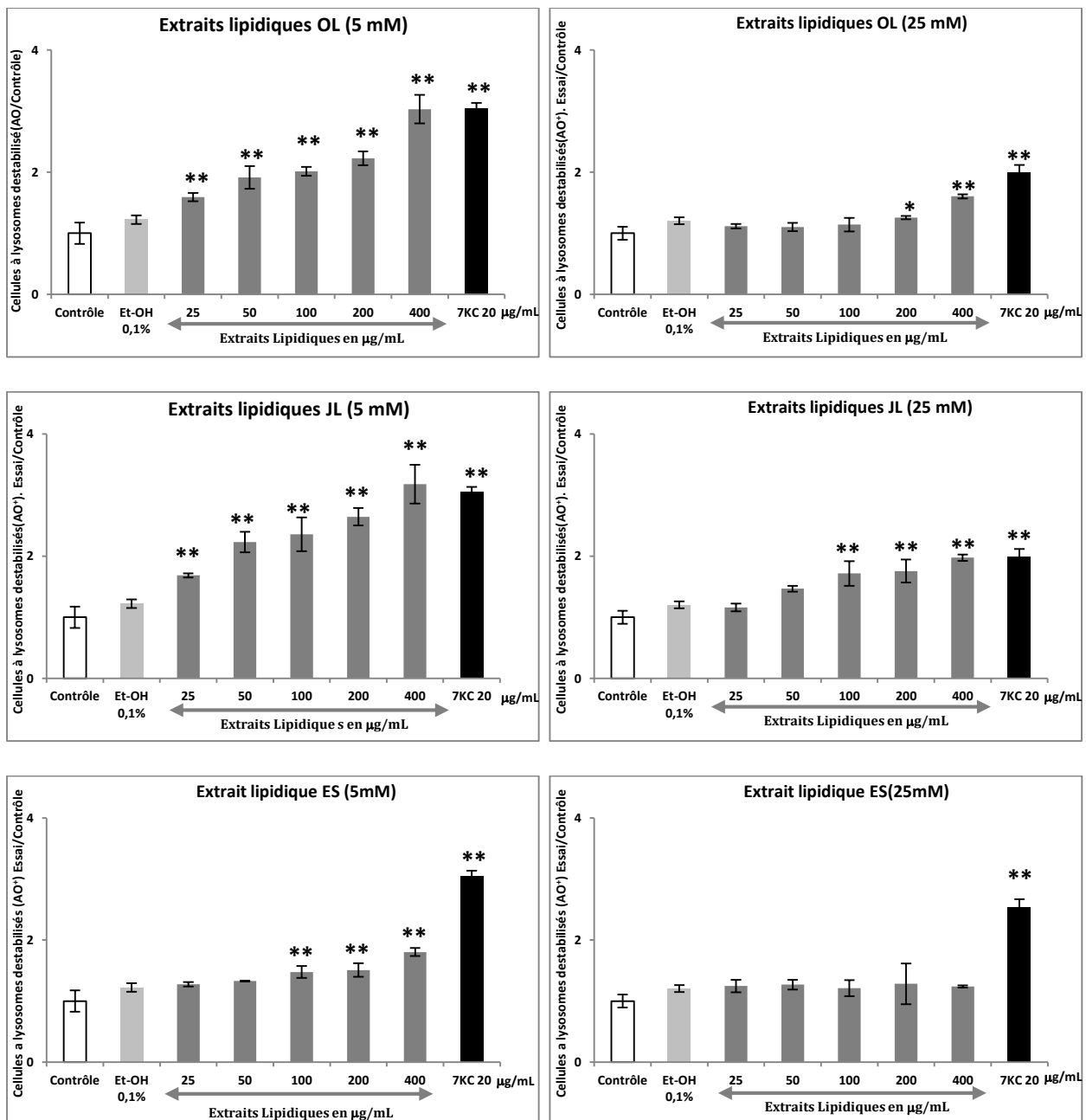


Figure 37 : Evaluation de la stabilité lysosomale des cellules MIN-6 par coloration à l'acridine Orange

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES, solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilisé en tant que molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). La stabilité lysosomale a été mesurée par cytométrie en flux après coloration par l'Acridine Orange. Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$.

3.3.3. Evaluation de la fonction peroxysomale

3.3.3.1. Incidence des extraits lipidiques sur l'expression d'ABCD3/ PMP70

En présence d'extraits lipidiques OL dans des conditions normo-glycémiques et hyperglycémiques aucune différence marquée d'expression d'ABCD3/PMP70 n'est observée par cytométrie en flux d'un essai à l'autre (**Figure 38**). En revanche, avec les extraits JL dans les conditions normo-glycémiques et hyper-glycémiques, l'expression d'ABCD3/PMP70 augmente dès la concentration lipidique de 50 µg/mL (**Figure 38**).

L'analyse par microscopie à fluorescence d'ABCD3/PMP70 montre une modification de la répartition des peroxysomes en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique lorsque les cellules sont traitées par les extraits lipidiques. Alors qu'un aspect ponctué de la fluorescence est observé dans les cellules contrôles, des amas de peroxysomes sont révélés au niveau des extrémités et à la périphérie du cytoplasme des cellules traitées (Figure **39**).

Par cytométrie en flux, il apparait que le 7KC (20 µg/mL) augmente souvent l'expression d'ABCD3/PMP70. Par microscopie à fluorescence, cet oxystérol toxique modifie aussi la répartition intracellulaire d'ABCD3/PMP70 (**Figure 38 ; Figure 39**).

Les extraits lipidiques de moules modulent donc l'expression d'ABCD3/PMP70 et modifie sa topographie.

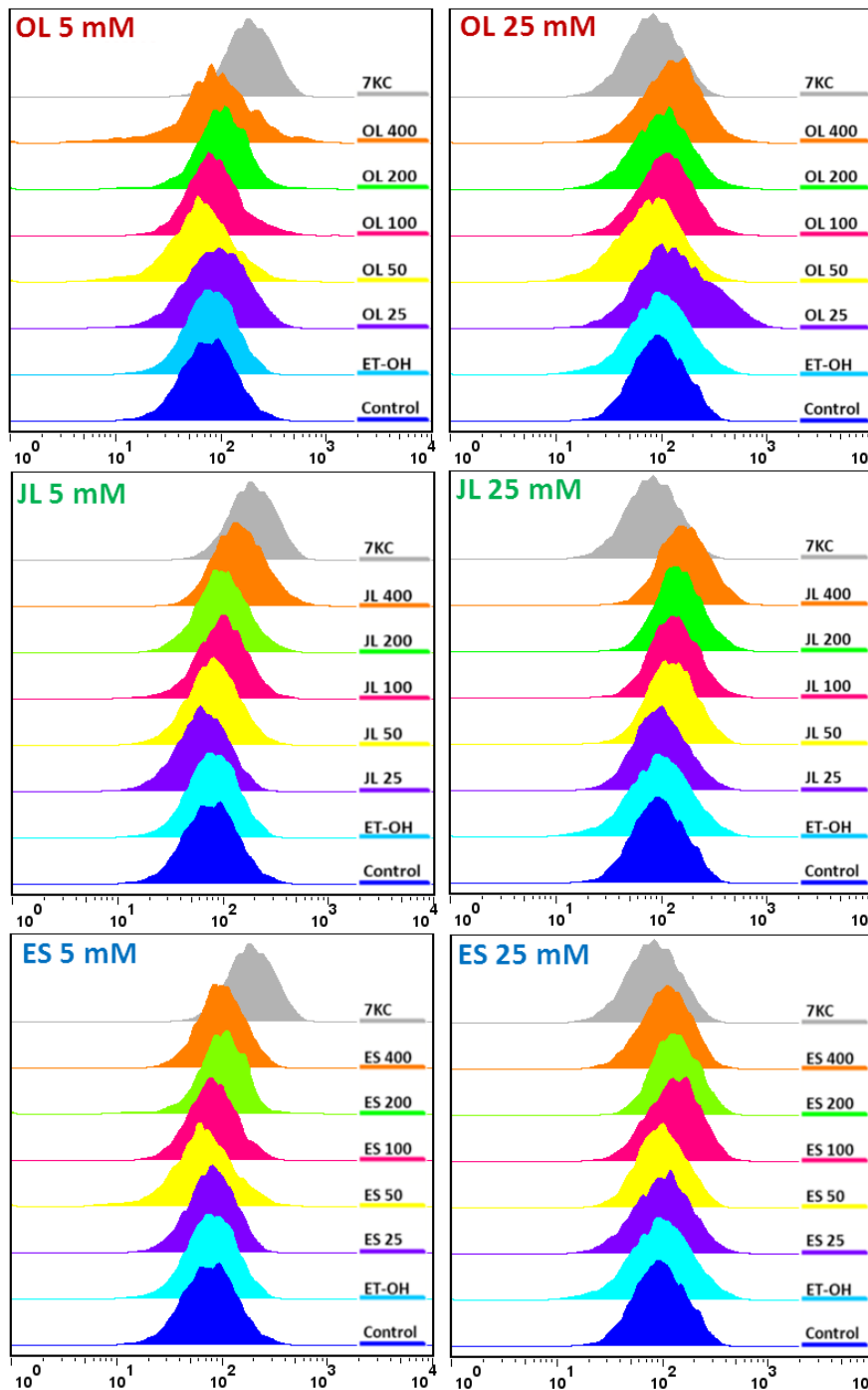


Figure 38 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de la protéine peroxysomale ABCD3 / PMP70 sur cellules MIN-6 en condition normo-glycémique (5 mM) et hyper-glycémique (25 mM)

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire).

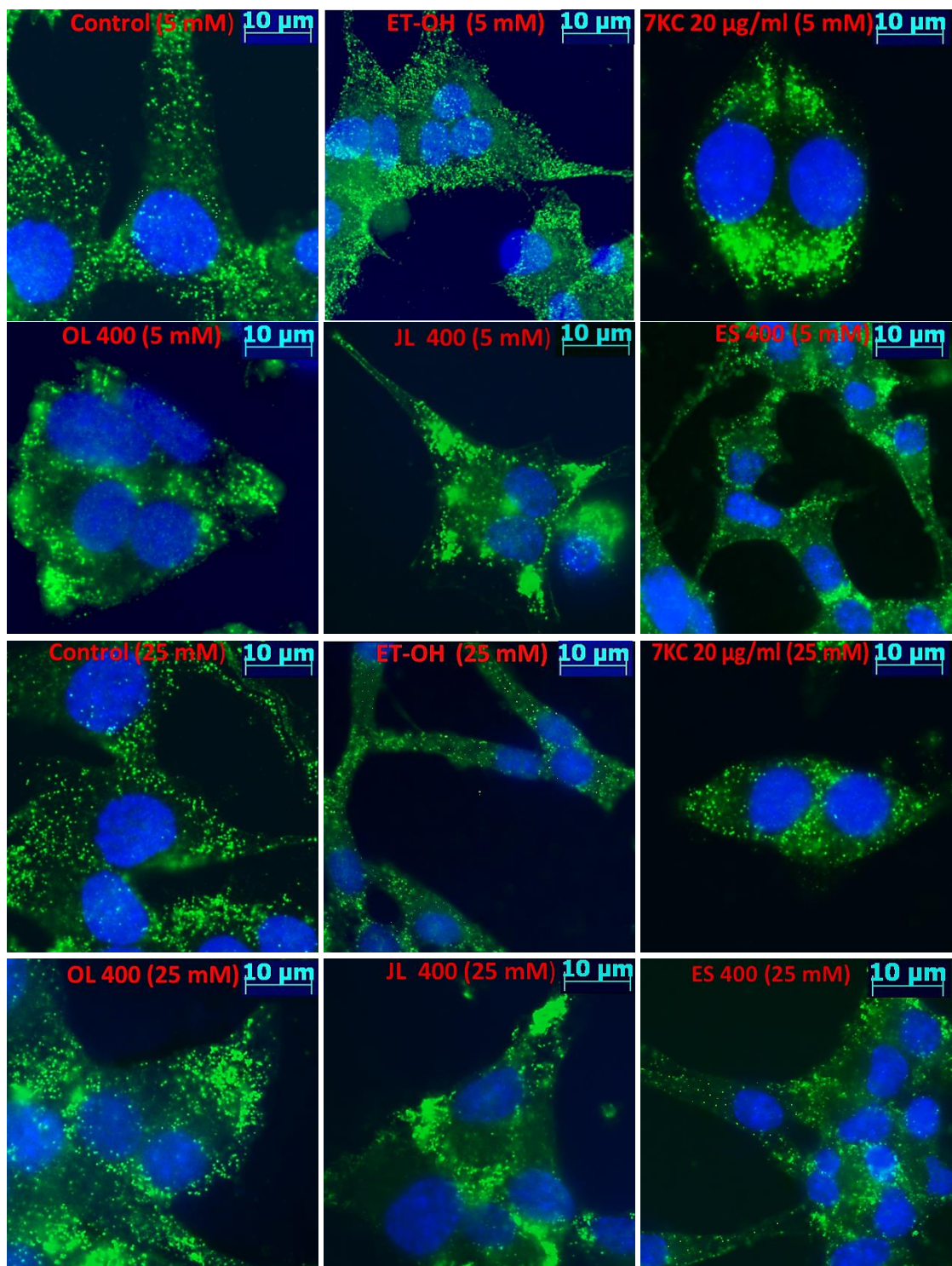


Figure 39 : Analyse par microscopie à fluorescence de l'expression et de la topographie de la protéine ABCD3 / PMP70 sur cellules MIN-6 en condition normo-glycémique (5 mM) et hyperglycémique (25 mM) en absence ou en présence d'extraits lipidiques de moules

Les cellules MIN-6 ont été cultivées pendant 48 h en présence de 400 µg/mL d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire).

3.3.3.2. Mesure de l'activité Catalase

Les effets des extraits lipidiques sur l'activité catalase des cellules MIN-6 ont été mesurés par méthode colorimétrique. Pour cela, les cellules MIN-6 ont été cultivées en plaque 12 puits à la densité de $4 \cdot 10^5$ cellules/puits, puis traitées pendant 48 h par les différents extraits lipidiques (OL, JL et ES) à différentes concentrations (25, 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique. Les résultats obtenus, sont présentés **Figure 40**. L'activité catalase est exprimée en $\text{mU}/10^6$ cellules.

En condition normo-glycémique, à faible concentration en extraits lipidiques (OL, JL et ES), l'activité catalase est similaire à celle mesurée dans les contrôles ($44 \text{ mU}/10^6$ cellules). A partir de la concentration 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en extraits lipidiques JL et OL, cette activité est fortement stimulée. Les effets les plus marqués sont observés avec les extraits JL. L'activité catalase avec ces derniers est environ de 145 ± 6 et $209 \pm 11 \text{ mU}/10^6$ cellules aux concentrations respectives de 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cette activité est de 80 ± 13 et $156 \pm 12 \text{ mU}/10^6$ cellules traitées aux concentrations 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits lipidiques OL. Dans la même gamme de concentration, une stimulation de l'activité catalase a aussi été observée avec les extraits ES. Toutefois, cette activité reste beaucoup plus faible que celle observée chez les cellules traitées par les extraits JL et OL.

En condition hyper-glycémique, l'effet des extraits lipidiques (OL, JL et ES) sur l'activité catalase des cellules MIN-6 a suivi la même tendance que celle observé en conditions normo-glycémique. En revanche l'activité catalase des cellules contrôles a diminué. Cette activité est plus faible par rapport à celle observée en condition normo-glycémique dans les cellules contrôles. Les effets les plus marqués ont aussi été observés avec les extraits lipidiques JL à partir de la concentration 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En effet, l'activité catalase obtenue est de 60 ± 11 ; 130 ± 9 et $236 \pm 6 \text{ mU}/10^6$ cellules aux concentrations respectives de 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Quelles que soient les conditions de culture des cellules MIN-6, le 7KC (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) n'a aucun effet sur l'activité catalase.

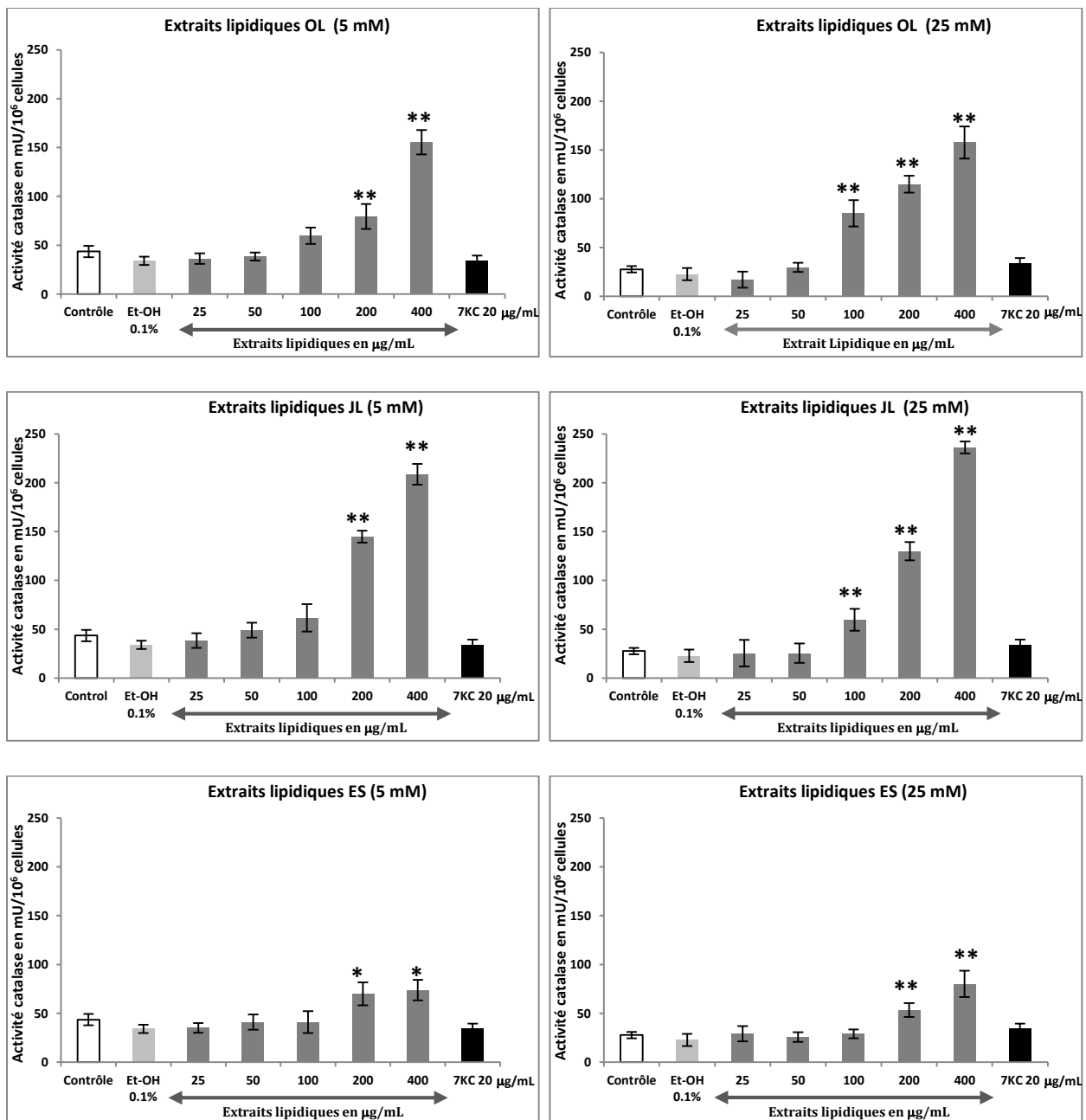


Figure 40 : Analyse de l'activité catalase des cellules β -Pancréatiques murines (MIN-6)

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 $\mu\text{g/mL}$) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 $\mu\text{g/mL}$) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). L'activité catalase a été mesurée par méthode colorimétrique et exprimée en $\text{mU}/10^6$ cellules. Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne \pm SEM. L'analyse des données est faite par ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$.

3.3.3.3. Identification de la Catalase par immunofluorescence et quantification par cytométrie en flux

La catalase est une enzyme spécifiquement peroxysomale ; elle a été identifiée par immunofluorescence indirecte et quantifiée par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés **Figure 41**. Quels que soient les traitements réalisés, aucun effet prononcé sur l'expression de la catalase n'est observé.

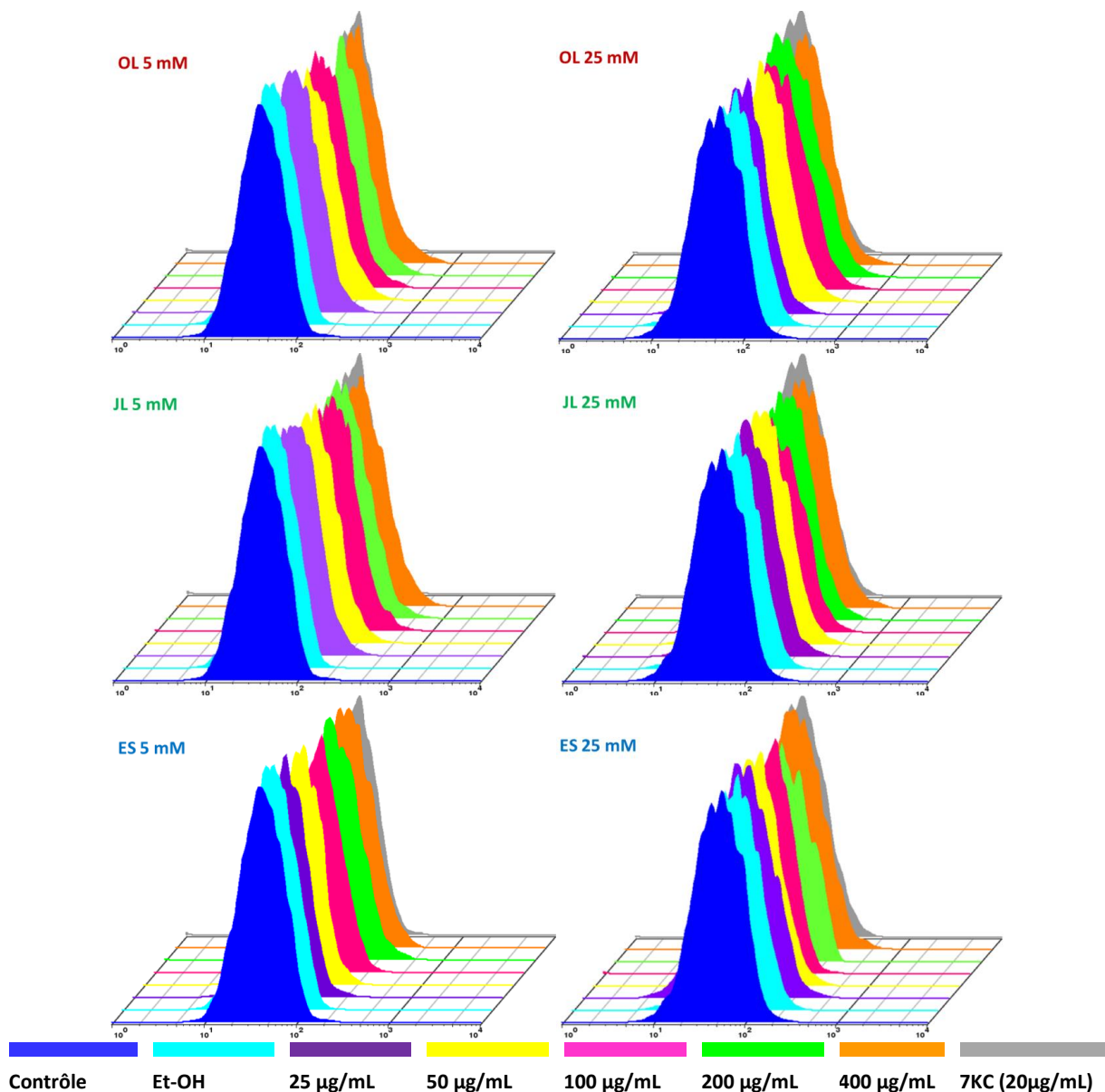


Figure 41 : Quantification de la Catalase chez les cellules β -Pancréatiques murine (MIN-6).

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 $\mu\text{g/mL}$) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES. Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 $\mu\text{g/mL}$) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire).

3.4. Effet des extraits lipidiques sur l'équilibre Redox des cellules MIN-6

3.4.1. Effet des extraits lipidiques sur le taux de glutathion réduit

Le glutathion réduit (GSH) est le principal thiol intracellulaire à faible poids moléculaire qui joue un rôle critique dans la défense cellulaire contre le stress oxydant chez les cellules de mammifères. Le GSH a été quantifié par méthode colorimétrique. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 42**. Les teneurs en GSH sont exprimées en $\mu\text{g}/10^6$ cellules.

En condition normo-glycémique, les teneurs moyennes en GSH de cellules MIN-6 non traitées (contrôle) sont de l'ordre de $105 \pm 6 \mu\text{g}/10^6$. Chez les cellules traitées, l'effet le plus marqué ($P < 0.01$) est observé dès la concentration $50 \mu\text{g}$ d'extraits JL. Les teneurs en GSH des MIN-6 traitées par les extraits JL sont de 89 ± 4 ; 68 ± 3 ; 62 ± 3 et $26 \pm 2 \mu\text{g}/10^6$ cellules traitées respectivement par 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits lipidiques. Les extraits OL ont aussi diminué de façon importante le contenu en GSH (73 ± 3 ; 58 ± 4 et $28 \pm 5 \mu\text{g}/10^6$ cellules traitées respectivement par 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits OL). En condition normo-glycémiques, il faut des concentrations en extraits lipidiques $\text{ES} \geq 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ pour réduire le contenu GSH des cellules MIN-6 (78 ± 8 et $70 \pm 5 \mu\text{g}/10^6$ cellules traitées avec 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits ES).

En condition hyper-glycémique, les cellules MIN-6 contrôles ont des teneurs en GSH similaires ($109 \pm 4 \mu\text{g}/10^6$) à celles cultivées en condition normo-glycémique. Chez les cellules traitées, le contenu en GSH est peu ou pas changé en présence d'extraits OL et ES. Le contenu en GSH des cellules MIN-6 traitées par extraits JL diminue de la même manière qu'en condition normo-glycémique.

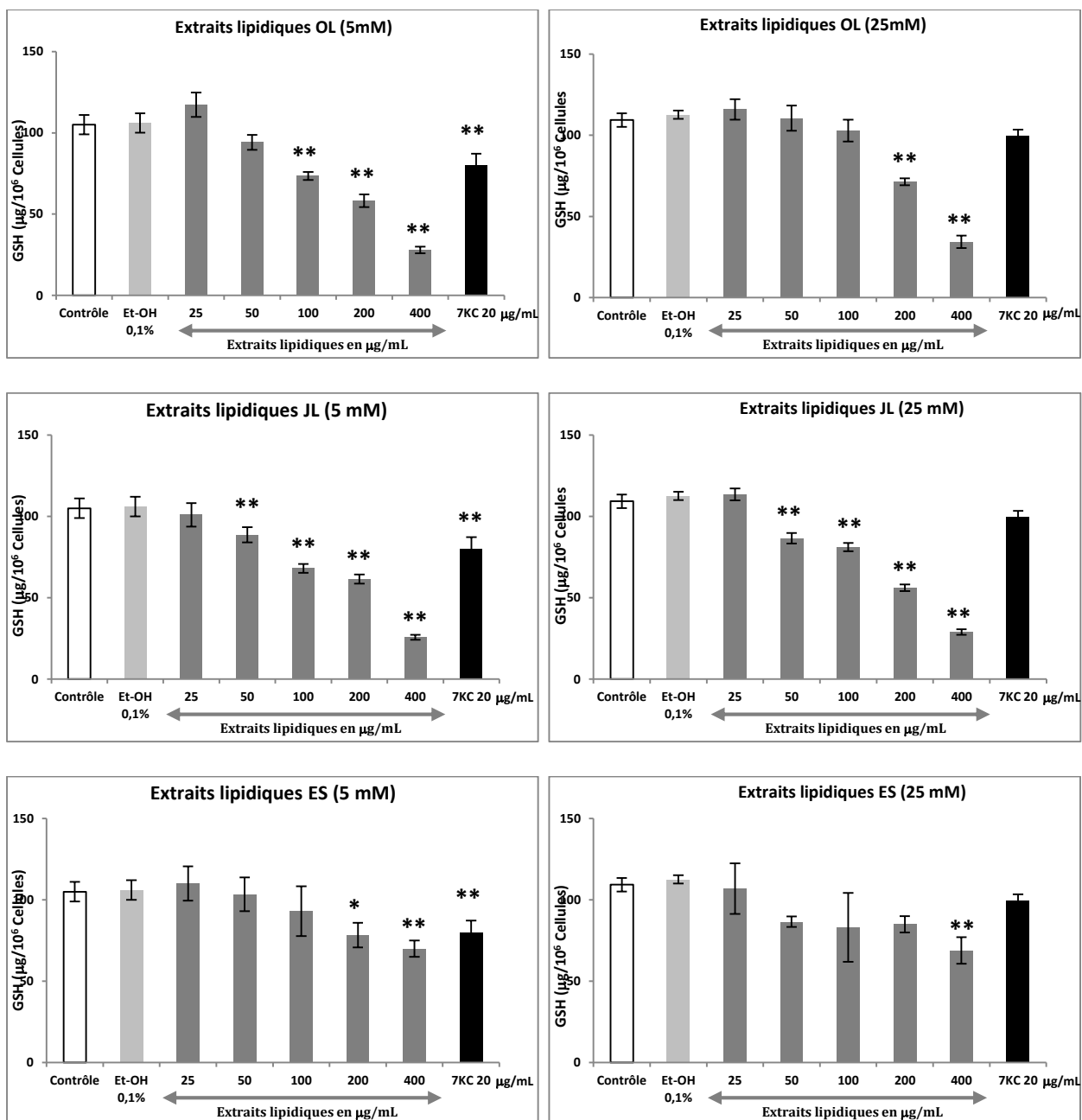


Figure 42 : Teneur en GSH des cellules MIN-6 par méthode colorimétrique

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) P < 0,05, (**) P < 0,01.

3.4.2. Effet des extraits lipidiques sur la production d'anion superoxyde

La production d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) intracellulaire a été évaluée par coloration au DHE et analyse par cytométrie. Les résultats obtenus, sont présentés **Figure 43** sous forme de Moyenne \pm SEM et calculés par la formule : $R_c(\text{Essai}) = \text{Moyenne essai}/\text{Moyenne contrôle}$.

En condition normo-glycémique, l'analyse par cytométrie en flux a révélé une augmentation des proportions d'anion superoxyde intracellulaire sur toutes les cellules MIN-6 traitées. Dès la concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cette augmentation est plus marquée chez les cellules MIN-6 traitées par les extraits JL ($P < 0.01$) et ES ($P < 0.05$). En effets, le R_c (JL) est de $1,5 \pm 0,1$; $1,8 \pm 0,1$ et $2,2 \pm 0,1$, correspondant aux concentrations respectives de 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dans la même gamme de concentration, le R_c (ES) est aussi important que le R_c (JL), il est de $1,7 \pm 0,1$; $2 \pm 0,3$ et $2,5 \pm 0,4$. Quant aux extraits OL, Il faut utiliser des concentrations élevées ($\geq 200 \mu\text{g}/\text{mL}$) pour observer une augmentation d' $O_2^{\bullet-}$ intracellulaire.

En condition hyper-glycémique, les extraits OL et JL (à l'exception des extraits ES) ont augmenté significativement, la production d' $O_2^{\bullet-}$ intracellulaire. Cette production d' $O_2^{\bullet-}$, détectée dès la concentration 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, est plus importante par rapport à celle obtenue avec les mêmes extraits en conditions normo-glycémique. Ce sont les extraits lipidiques JL qui augmentent le plus la quantité d' $O_2^{\bullet-}$ intracellulaire. En effets, le R_c (JL) est de $2 \pm 0,3$; $2,2 \pm 0,6$; $2,5 \pm 0,1$ et $3,1 \pm 0,4$; le R_c (OL) est de $1,6 \pm 0,1$; $1,7 \pm 0,1$; $1,8 \pm 0,2$ et $2,7 \pm 0,2$ aux concentrations respectives de 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En condition hyper-glycémique, les extraits ES n'ont aucun effet sur la production d' $O_2^{\bullet-}$.

Le 7KC (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) augmente significativement $O_2^{\bullet-}$ intracellulaire dans les MIN-6. Cette augmentation d' $O_2^{\bullet-}$ est aussi importante en condition normo-glycémique ($R_c = 1,9 \pm 3$) qu'en condition hyper-glycémique ($R_c = 1,7 \pm 0,3$).

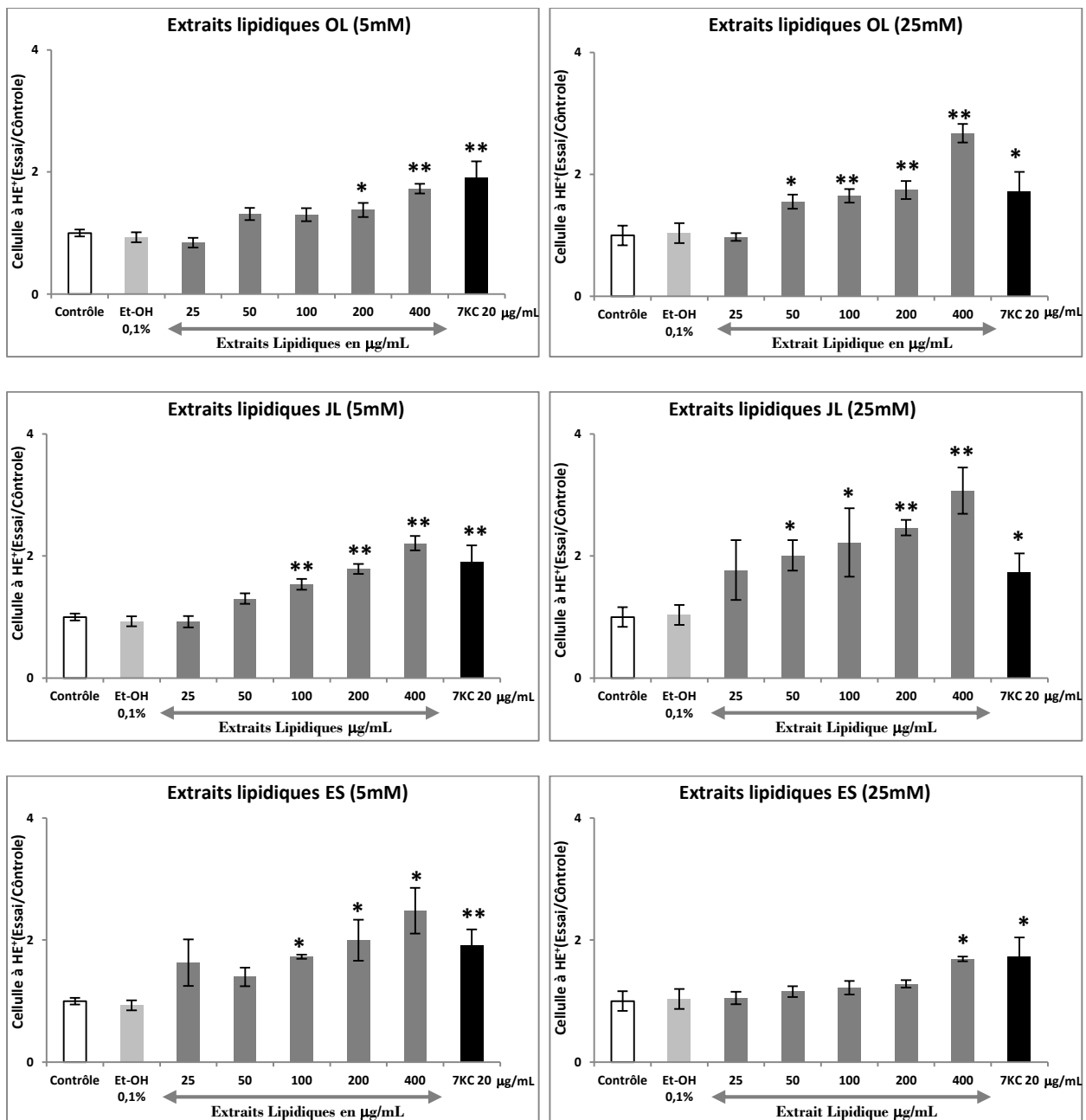


Figure 43 : Analyse de la production d'O₂•⁻ chez les cellules MIN-6 mesuré par coloration au DHE

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES, solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). L'anion superoxyde (O₂•⁻) a été analysé par cytométrie en flux après coloration par le DHE. Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) P < 0,05, (**) P < 0,01.

3.4.3. Effet des extraits lipidiques sur la production du monoxyde d'azote

La production du monoxyde d'azote (NO) dans les cellules MIN-6 a été mesurée par coloration au 4,5-Diaminofluorescein diacetate (DAF-2) et analyse par cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 44** sous forme de Moyenne \pm SEM et calculés par la formule : R_c (Essai) = **Moyenne essai/Moyenne contrôle.**

En condition normo-glycémique, l'analyse par cytométrie en flux a révélé une augmentation des taux de NO chez toutes les MIN-6 traitées par les extraits lipidiques. Cette augmentation de NO détectée dès la concentration 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en extraits lipidiques OL et JL est significative ($P < 0.01$), dose-dépendante et plus importante avec les extraits JL. En effet, le R_c (JL) est de $1,2 \pm 0,1$; $1,5 \pm 0,1$; $2,2 \pm 0$ et $3,2 \pm 0,1$; le R_c (OL) est de $1,4 \pm 0,1$; $2,0 \pm 0,1$; $2,2 \pm 0,1$ et $2,5 \pm 0,1$ aux concentrations respectives de 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En condition normo-glycémique, les extraits lipidiques ES ont augmenté de façon significative ($P < 0.01$) la production de NO chez les MIN-6. Le R_c (ES) est de $2,4 \pm 0,2$ et $2,9 \pm 0,7$ et $2,3 \pm 0,1$ aux concentrations respectives 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En condition hyper-glycémique, les taux de NO détectés chez les cellules MIN-6 semblent augmenter par rapport à ceux mesurés en conditions normo-glycémiques. La plus forte augmentation en NO est observée chez les cellules MIN-6 exposées aux extraits JL et OL. En effet, le R_c (JL) est de $2,1 \pm 0,3$; $2,6 \pm 0,1$; $3,0 \pm 0,1$ et $4,5 \pm 0,1$; le R_c (OL) est de $1,8 \pm 0,2$; $2,6 \pm 0,1$; $2,8 \pm 0,1$ et $3,6 \pm 0,1$ aux concentrations respectives de 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Le taux du NO a aussi augmenté d'une manière significative chez les MIN-6 traitées par les extraits ES. Cette augmentation en NO est révélée dès la concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R_c = 2,3 \pm 0,6$). Au-delà de cette concentration, la production de NO n'augmente plus. Le 7KC (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a significativement augmenté le taux de NO chez les cellules MIN-6 ($R_c = 2,4 \pm 0,2$).

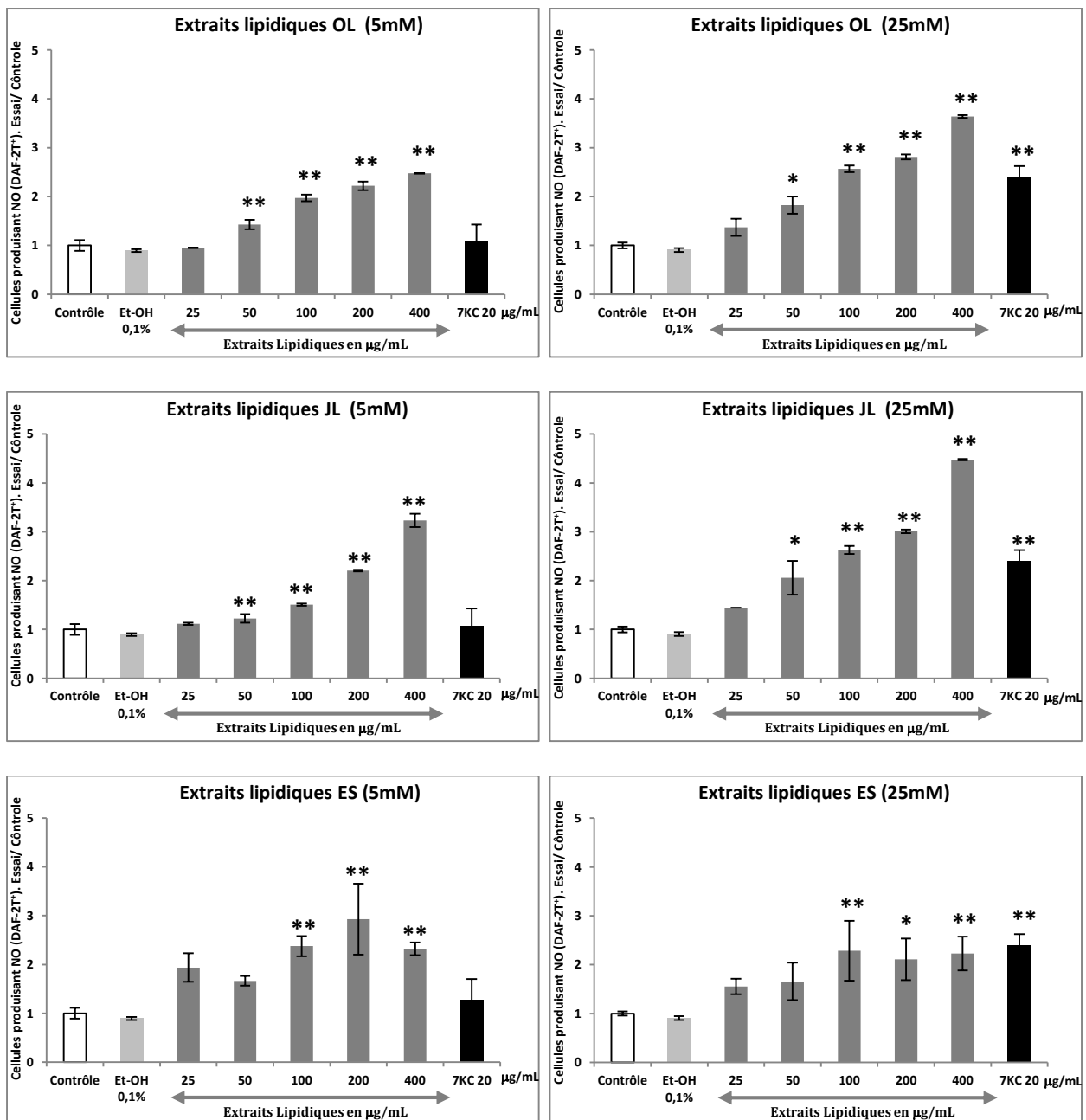


Figure 44 : Analyse de la production du NO par les MIN-6 mesur e par coloration au DAF-2

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilis e comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). Le monoxyde d'azote (NO) a été analys e par cytométrie en flux après coloration par le DAF-2. Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) P < 0,05, (**) P < 0,01.

3.4.4. Effet des extraits lipidiques sur la production de peroxyde d'hydrogène

La production du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les cellules MIN-6, traitées avec les extraits lipidiques de moules (OL, JL et ES) a été mesurée après coloration à la Dihydrorhodamine123 (DHR123) et analyse par cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 45** sous forme de Moyenne \pm SEM et calculés par la formule : $R_c(\text{Essai}) = \text{Moyenne essai} / \text{Moyenne contrôle}$.

En condition normo-glycémique, une forte production de H_2O_2 a été observée chez les cellules MIN-6 traitées par les extraits lipidiques JL. En effet, avec les concentrations 50 à 400 $\mu\text{g/mL}$, les quantités d' H_2O_2 générées augmentent de manière dose-dépendante ($P < 0.01$) pour donner des R_c (JL) de $2,7 \pm 0,3$; $3,0 \pm 0,2$; $3,9 \pm 0,3$ et $4,0 \pm 0,3$. En revanche, il faut des concentrations ≥ 200 $\mu\text{g/mL}$ d'extraits lipidiques OL pour augmenter significativement la production d' H_2O_2 . Toutefois, cette augmentation reste deux fois plus faible par rapport à celle observée avec les extraits JL. De même, les extraits lipidiques ES, dès la concentration 25 $\mu\text{g/mL}$ augmentent d'une manière significative ($P < 0.01$) la production d' H_2O_2 ($R_c = 1,7 \pm 0,1$). Cependant, au-delà de cette concentration (25 $\mu\text{g/mL}$), les quantités d' H_2O_2 générées ne progressent plus. De plus, cette production d' H_2O_2 , malgré sa significativité ($P < 0.01$), reste très faible par rapport à celle observée avec les extraits JL. Dans les mêmes conditions, le 7KC (20 $\mu\text{g/mL}$) a augmenté significativement le taux d' H_2O_2 sur les MIN-6 en fournissant un $R_c = 1,9 \pm 0,2$.

En condition normo-glycémique, les taux en H_2O_2 mesurés sur les cellules MIN-6 traitées sont beaucoup plus faibles que ceux observés en condition normo-glycémique. La production d' H_2O_2 est moins sensible aux extraits lipidiques JL et OL. Il faut des concentrations ≥ 100 $\mu\text{g/mL}$ pour augmenter significativement la quantité H_2O_2 . Le R_c (JL) calculé est de $2,1 \pm 0,1$; $2,3 \pm 0,1$ et $2,5 \pm 0,2$ aux concentrations respectives de 100, 200 et 400 $\mu\text{g/mL}$.

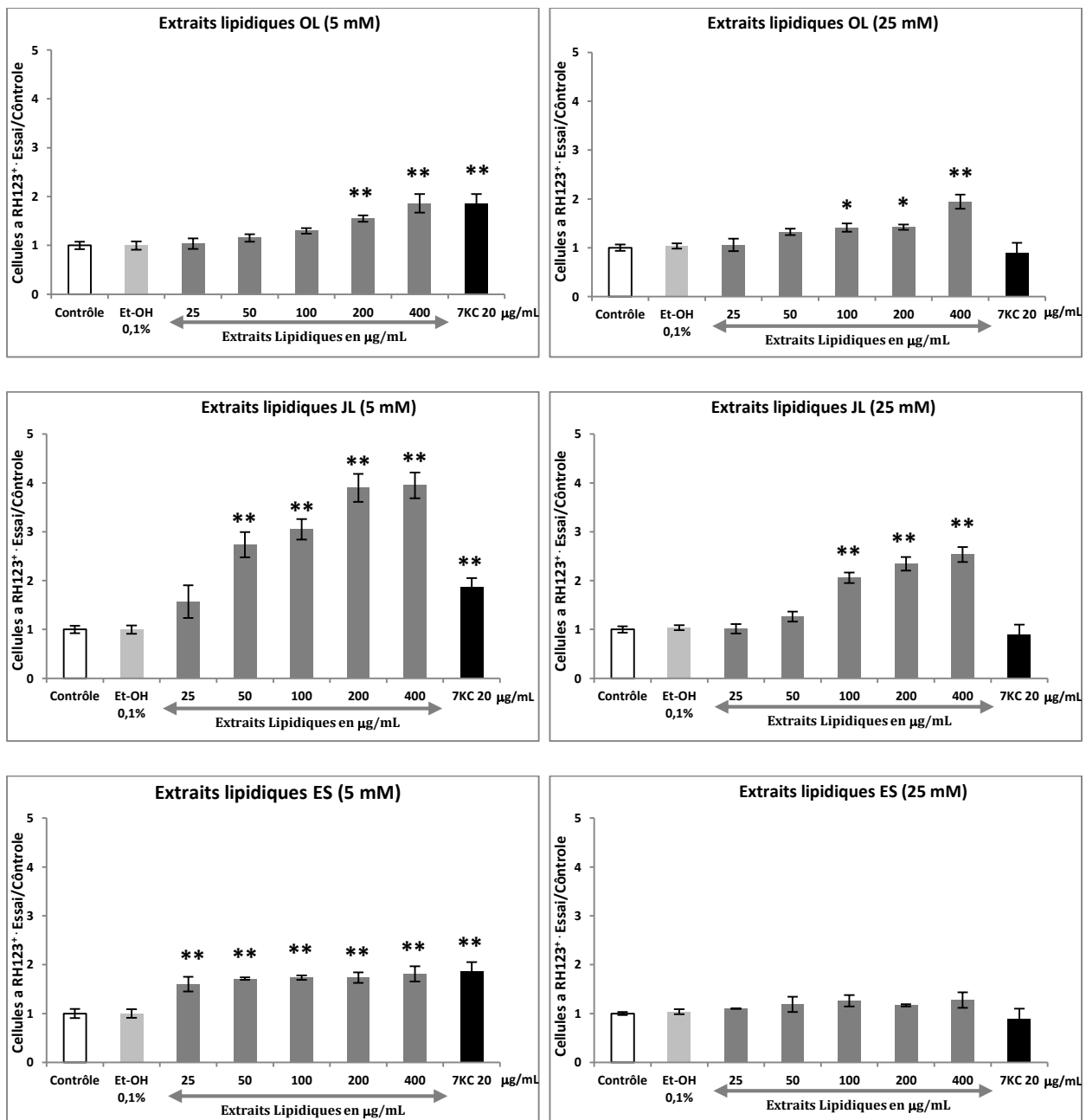


Figure 45 : Analyse de la production de H₂O₂ par les MIN-6 mesurée par coloration à la DHR123

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES, solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) P<0,05, (**) P<0,01

3.4.5. Effet des extraits lipidiques sur la production de 4-hydroxy-2-nonéanal

Le 4-hydroxy-2-nonéanal (4-HNE) est le produit majeur de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés. Il a été détecté par immunofluorescence indirecte puis quantifié par cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 46**.

En condition normo-glycémique, le 4-HNE a été détecté dans toutes les cellules MIN-6 traitées par les extraits lipidiques de moules OL, JL, et ES. Les plus forts taux de 4-HNE ont été observés avec les extraits OL et JL. Avec les concentrations 50 à 400 µg/mL d'extraits OL et JL, les taux de 4-HNE ont augmenté de façon significative ($P < 0.01$). Le R_c (OL) est de $2,2 \pm 0$; $3,7 \pm 0,4$; $3,4 \pm 0,5$; $4,1 \pm 0,2$ et $4,9 \pm 0,6$. Dans la même gamme de concentration, le R_c (JL) est de $1,6 \pm 0,3$; $2,0 \pm 0,2$; $3,1 \pm 0,1$ et $4,8 \pm 0,3$. En Revanche, il faut des concentrations ≥ 100 µg/mL d'extraits ES pour avoir des augmentations significatives de 4-HNE ($P < 0.05$). Le R_c (ES) est de $1,4 \pm 0,3$; $1,7 \pm 0,2$ et $1,9 \pm 0,3$ aux concentrations respectives 100, 200 et 400 µg/mL. Le 7KC (20 µg/mL) augmente significativement ($P < 0.01$) les taux de 4-HNE ($R_c = 2,1 \pm 0,3$).

En condition hyper-glycémique, les taux de 4-HNE dans les cellules MIN-6 sont moins importants que ceux observés en condition normo-glycémique. En condition normo-glycémique, les taux les plus élevés ($P < 0.05$) en 4-HNE ont été observés à partir de la concentration 100 µg/mL d'extraits OL et JL. Le R_c (OL) est de : $2,0 \pm 0,2$; $2,3 \pm 0,3$ et $2,7 \pm 0,4$; le R_c (JL) est de $1,6 \pm 0,1$; $2,0 \pm 0,1$ et $2,8 \pm 0,2$ aux concentrations respectives 100, 200 et 400 µg/mL. En condition hyper-glycémique, les extraits ES et le 7KC (20 µg/mL) n'ont aucun effet sur les taux de 4-HNE.

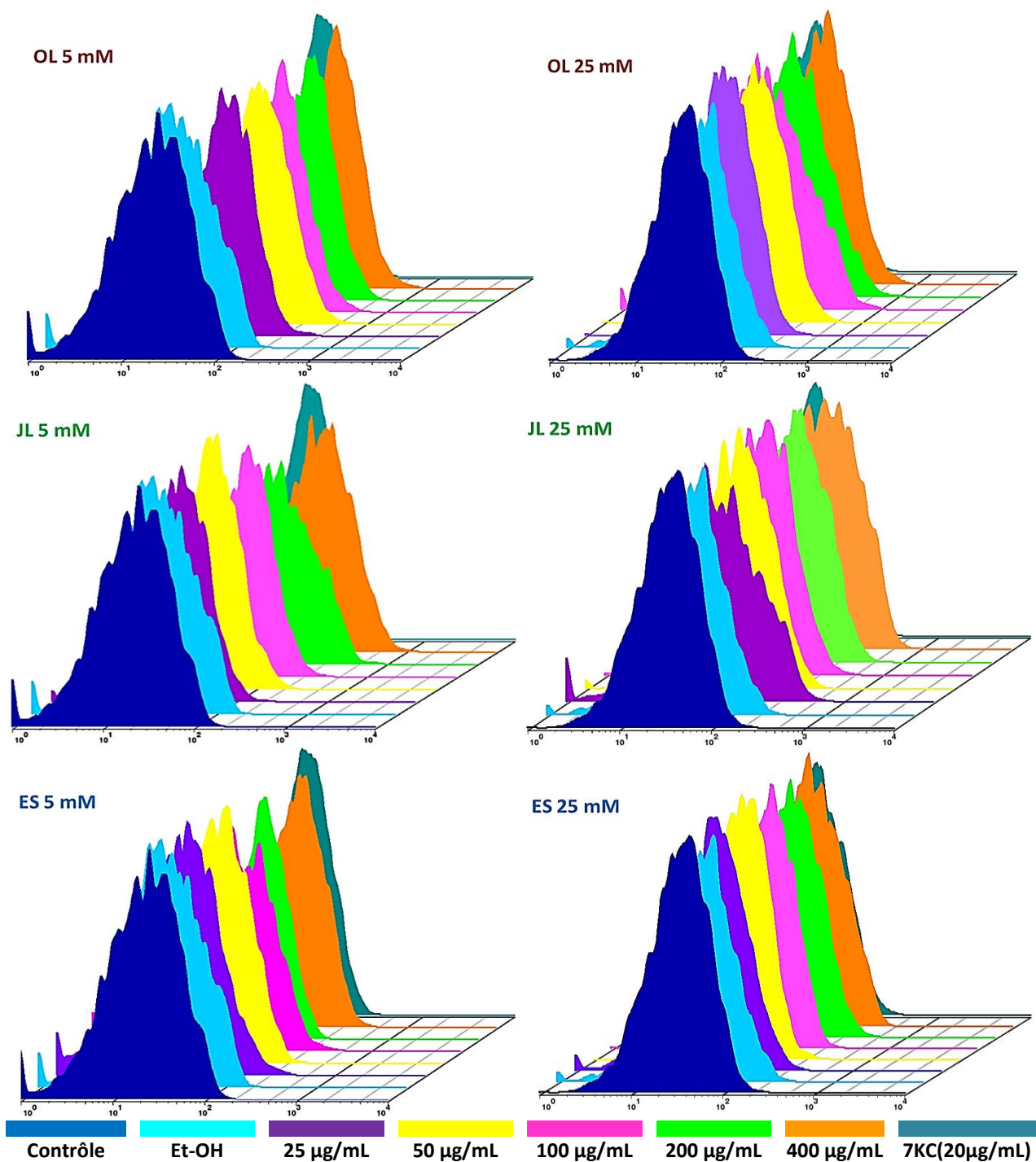


Figure 46 : Analyse des taux de 4-HNE dans les cellules β -Pancréatiques murines (MIN-6)

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) d'extraits lipidiques OL, JL et ES solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). L'analyse des données est faite par ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$

3.5. Caractérisation de la mort cellulaire induite par les extraits lipidiques

3.5.1. Effet des extraits lipidiques sur la morphologie nucléaire

Afin de caractériser la mort cellulaire provoquée induite par les extraits lipidiques de moules, une coloration des noyaux des cellules MIN-6 a été effectuée par le Hoechst 33342. Les résultats obtenus, sont présentés **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** et **Figure 47.**

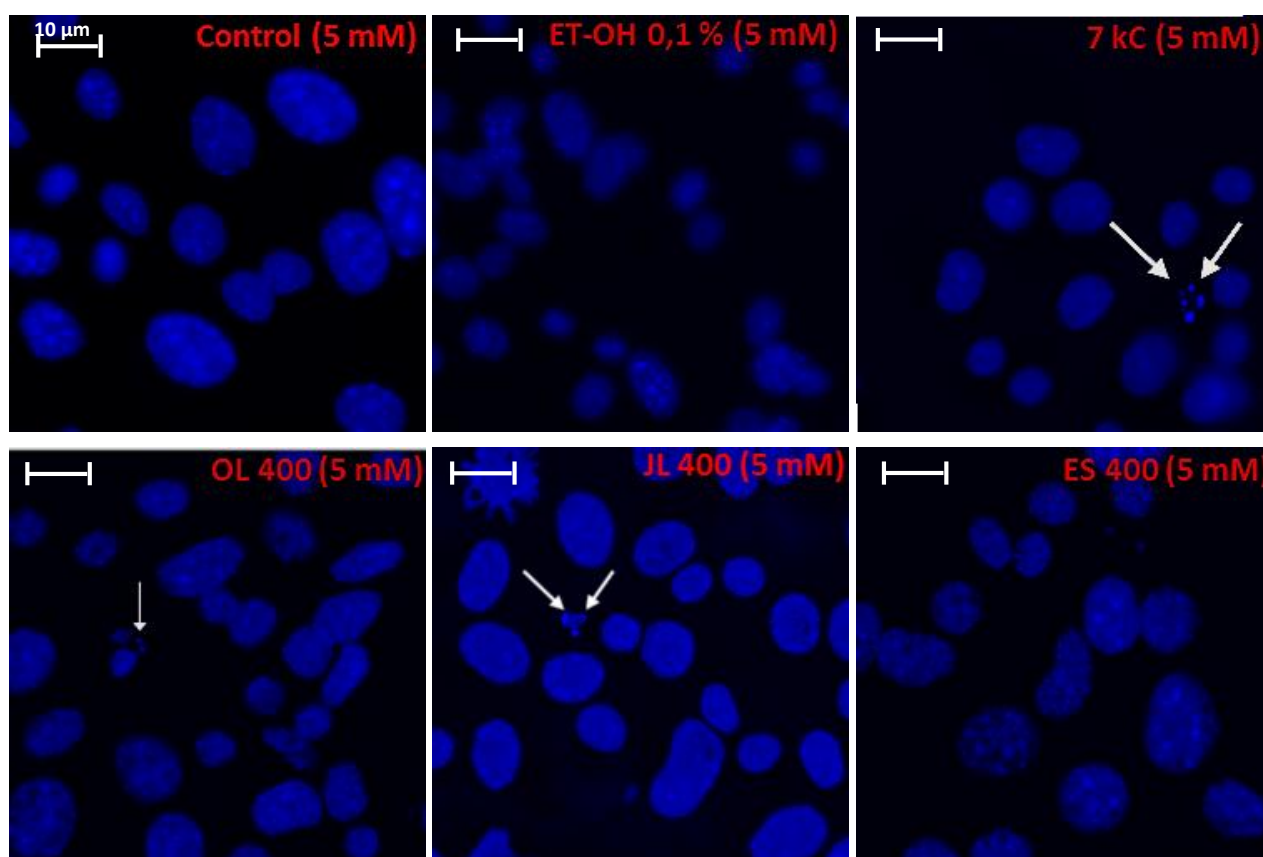


Figure 47 : Analyse de la morphologie nucléaire des cellules MIN-6

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). La morphologie nucléaire des cellules MIN-6 a été analysée après coloration au Hoechst 33342 et observation en microscopie à fluorescence.

Tableau IX : Pourcentage de cellules MIN-6 à noyaux condensés et/ou fragmentés

	Contrôle	Et-OH 0,1%	Concentrations en extraits lipidiques de moules (µg/mL)					7 KC 20 µg/mL	
			25	50	100	200	400		
5 mM	OL	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,6	1,7 ± 0,6	2,7 ± 0,6	3,0 ± 1,0	2,7 ± 0,6	4,3 ± 1,2	5,9 ± 1,3
	JL	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,6	0,3 ± 0,6	1,3 ± 0,6	2,0 ± 1,0	2,0 ± 1,0	4,0 ± 1,0	5,9 ± 1,3
	ES	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,6	1,2 ± 0,3	1,8 ± 0,3	1,5 ± 0,5	2,7 ± 0,6	3,8 ± 1,0	5,9 ± 1,3
25 mM	OL	2,3 ± 0,6	2,0 ± 0,5	2,0 ± 0,0	2,3 ± 0,6	2,3 ± 0,6	2,7 ± 0,6	4,3 ± 0,6	6,7 ± 2,1
	JL	2,3 ± 0,6	2,0 ± 0,5	2,3 ± 0,6	1,7 ± 0,6	2,7 ± 0,6	4,0 ± 1,0	4,7 ± 0,6	6,7 ± 2,1
	ES	2,3 ± 0,6	2,0 ± 0,5	2,4 ± 0,5	2,3 ± 0,6	2,6 ± 0,9	4,3 ± 1,1	4,4 ± 1,2	6,7 ± 2,1

Dans les deux conditions glycémiques (5 mM et 25 mM), environ 98 % les cellules MIN-6 non traitées (contrôle) ont des noyaux ronds et réguliers. En ce qui concerne les cellules MIN-6 traitées par les extraits lipidiques OL, JL et ES, aucune modification significative de l'aspect et la taille des noyaux n'a été observée. Malgré les fortes concentrations en extraits lipidiques (400 µg/mL), environ 96 % des cellules MIN-6 ont des noyaux d'aspect similaires aux contrôles (noyaux ronds et réguliers) et 4 % ont des noyaux condensés. Environ 6 % des cellules MIN-6 traitées par le 7KC (20 µg/mL) ont des noyaux condensés et/ou fragmentés caractéristiques des cellules apoptotiques.

3.5.2. Effet des extraits lipidiques sur la génération d'un pic Sub-G1

Les cellules MIN-6 en phase Sub-G1 ont été détectées par coloration à l'IP et analyse par cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 48** (condition normo-glycémique) et **Figure 49** (condition hyper-glycémique).

En condition normo-glycémique, aucun pic Sub-G1 n'est observé avec les cellules MIN-6 non traitées (Contrôle). Sur les cellules MIN-6 traitées par les extraits lipidiques, un pic Sub-G1 plus ou moins prononcé est parfois mis en évidence. Ce pic est détecté avec les concentrations 200 et 400 µg/mL d'extraits OL, les pourcentages de cellules en Sub-G1 correspondant sont de 4,7 et 8 %. Avec les cellules MIN-6 traitées avec les extraits JL, le pic Sub-G1 a été mis en évidence dès la concentration 25 µg/mL. Aux concentrations de 25 à 400 µg/mL, les pourcentages respectifs de cellules en Sub-G1 sont de 3,8 % ; 2,3 % ; 16 % ; 4 % et 9 %. Pour les cellules MIN-6 traitées par les extraits ES, les pourcentages de cellules en Sub-G1 sont du même ordre que ceux observés avec les extraits lipidiques OL : 3,8 % ; 7 % et 6,3 % aux concentrations respectives 100, 200 et 400 µg/mL. Avec le 7KC (20 µg/mL), 3 % de cellules en Sub-G1 ont été observées.

En condition hyper-glycémique, aucun pic Sub-G1 n'est observé.

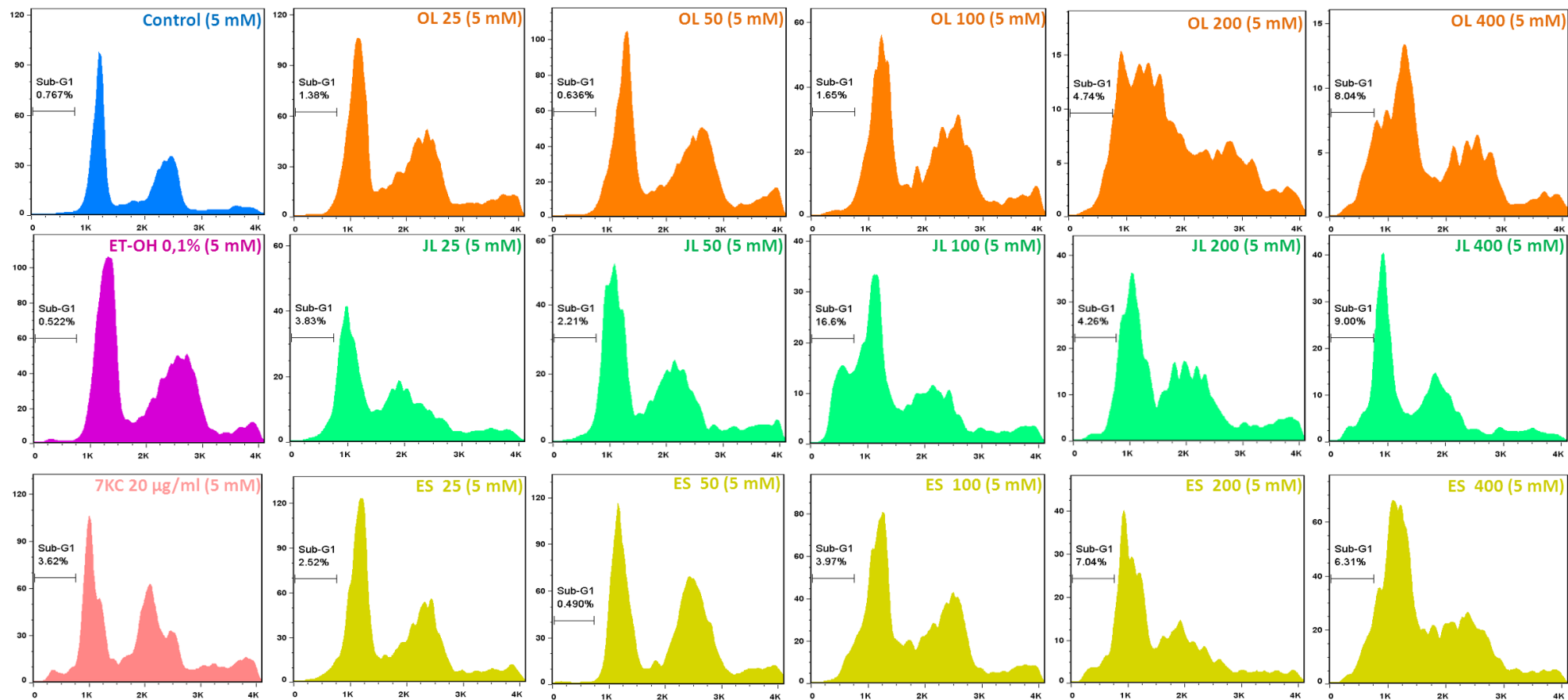


Figure 48 : Détection des cellules MIN-6 en Sub-G1 (Condition normo-glycémique : 5 mM)

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en condition normo-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). Les cellules MIN-6 en phase Sub-G1 ont été analysées par cytométrie en flux après coloration à l'IP.

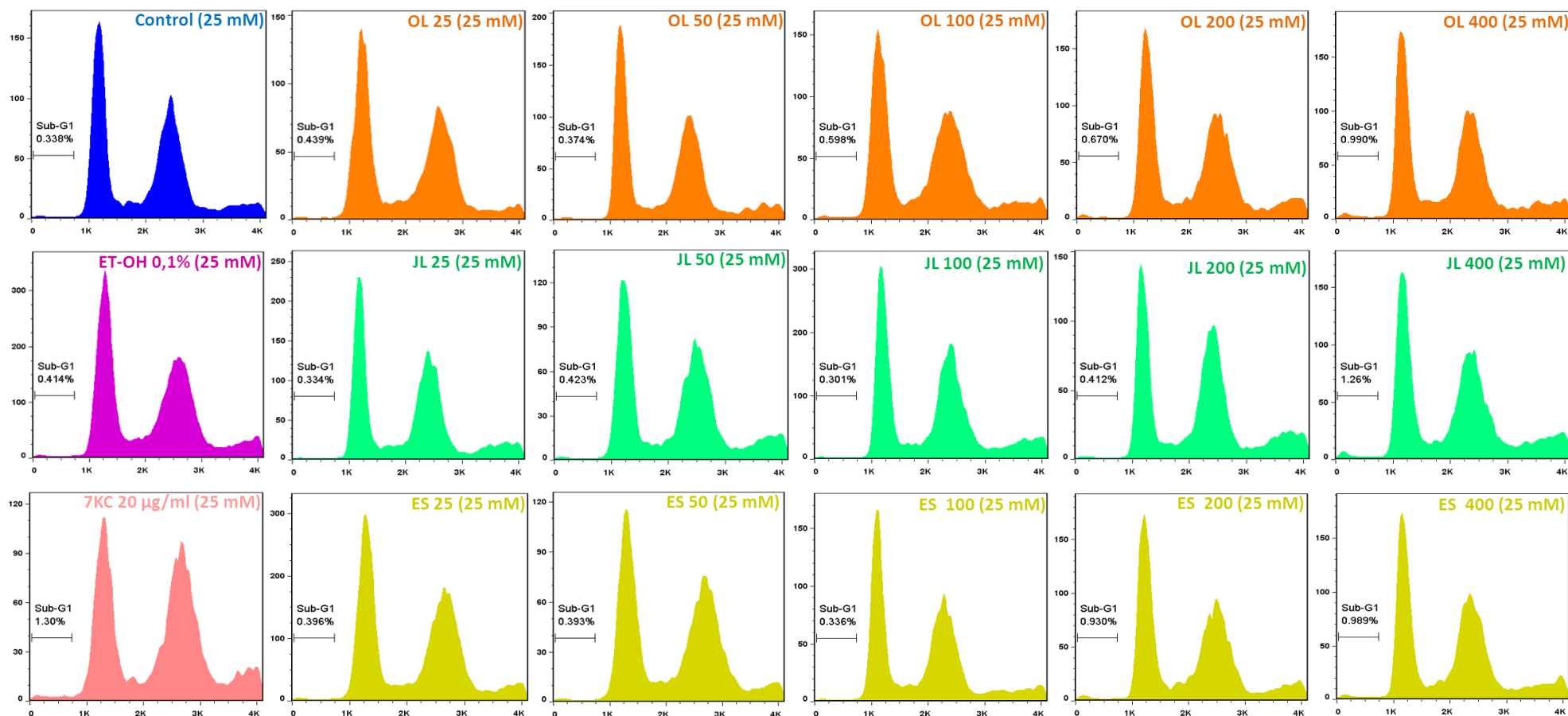


Figure 49 : Détection des cellules MIN-6 en Sub-G1 (Condition hyper-glycémique : 25 mM)

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en condition hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). Les cellules MIN-6 en phase Sub-G1 ont été analysées par cytométrie en flux après coloration à l'IP.

3.6. Effet des extraits lipidiques sur de la sécrétion d'insuline

La fonction principale des cellules β pancréatiques est de sécréter de l'insuline. Pour évaluer l'incidence des extraits lipidiques sur cette fonction et sur cellules MIN-6, l'insuline a été dosée par un test immunoenzymatique (ELISA). Les résultats obtenus sont présentés **Figure 50**. Les taux d'insuline sécrétés sont exprimés en $\text{ng}/10^6$ cellules.

En condition normo-glycémique, la sécrétion d'insuline des cellules MIN-6 traitées avec les extraits lipidiques de moules est plus importante par rapport à la sécrétion basale de l'insuline des cellules MIN-6 contrôles ($1,7 \pm 0,3 \text{ ng}/10^6$). La plus forte sécrétion d'insuline a été obtenue avec les extraits JL. Cette augmentation est significative dès $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ et progresse de façon proportionnelle à la concentration en extraits JL. La quantité d'insuline sécrétée par les cellules MIN-6 traitées aux concentrations $50, 100, 200$ et $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits JL est respectivement de $8 \pm 0,3$; $21,6 \pm 0,6$; $36 \pm 1,4$ et $40,6 \pm 2,4 \text{ ng}/10^6$. Les extraits OL et ES ont moins d'effet sur la sécrétion d'insuline. Les quantités d'insuline sécrétée avec $100, 200$ et $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits OL et ES sont respectivement de $4,9 \pm 0,1$; $13,2 \pm 0,5$ et $14,9 \pm 0,6 \text{ ng}/10^6$ cellules et $5,4 \pm 0,3$; $8,5 \pm 0,4$ et $9,5 \pm 0,7 \text{ ng}/10^6$ cellules.

En conditions hyper-glycémique, la sécrétion d'insuline est stimulée, elle est de $6,3 \pm 0,7 \text{ ng}/10^6$ cellules (contre une sécrétion base de $1,7 \pm 0,3 \text{ ng}/10^6$, obtenue en condition normo-glycémique). En condition hyper-glycémique, la sécrétion d'insuline des cellules MIN-6 traitées avec les extraits lipidiques a été potentialisée par rapport à la condition normo-glycémique. Par ailleurs, plus la concentration en extrait lipidique augmente, plus la quantité en insuline sécrétée est importante. L'effet le plus marquant a été observé dès la concentration $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits JL. La quantité d'insuline sécrétée par les cellules MIN-6 traitées aux concentrations $25, 50, 100, 200$ et 400 est respectivement de $23,5 \pm 3,3$; $30,2 \pm 1,2$; $37,1 \pm 1,9$; $39,5 \pm 2,3$ et $48 \pm 6,3 \text{ ng}/10^6$. Il faut des concentrations $\geq 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits OL et ES pour augmenter significativement ($P < 0,01$) la sécrétion d'insuline. La quantité d'insuline obtenue avec ces extraits sont $13,2 \pm 0,7$; $15,6 \pm 3,2$; $25,6 \pm 1$; $33,5 \pm 0,1 \text{ ng}/10^6$ et $12,2 \pm 1,0$; $16,7 \pm 0,5$; $19,4 \pm 0,8 \text{ ng}/10^6$ aux concentrations respectives $100, 200$ et $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits lipidiques OL et ES.

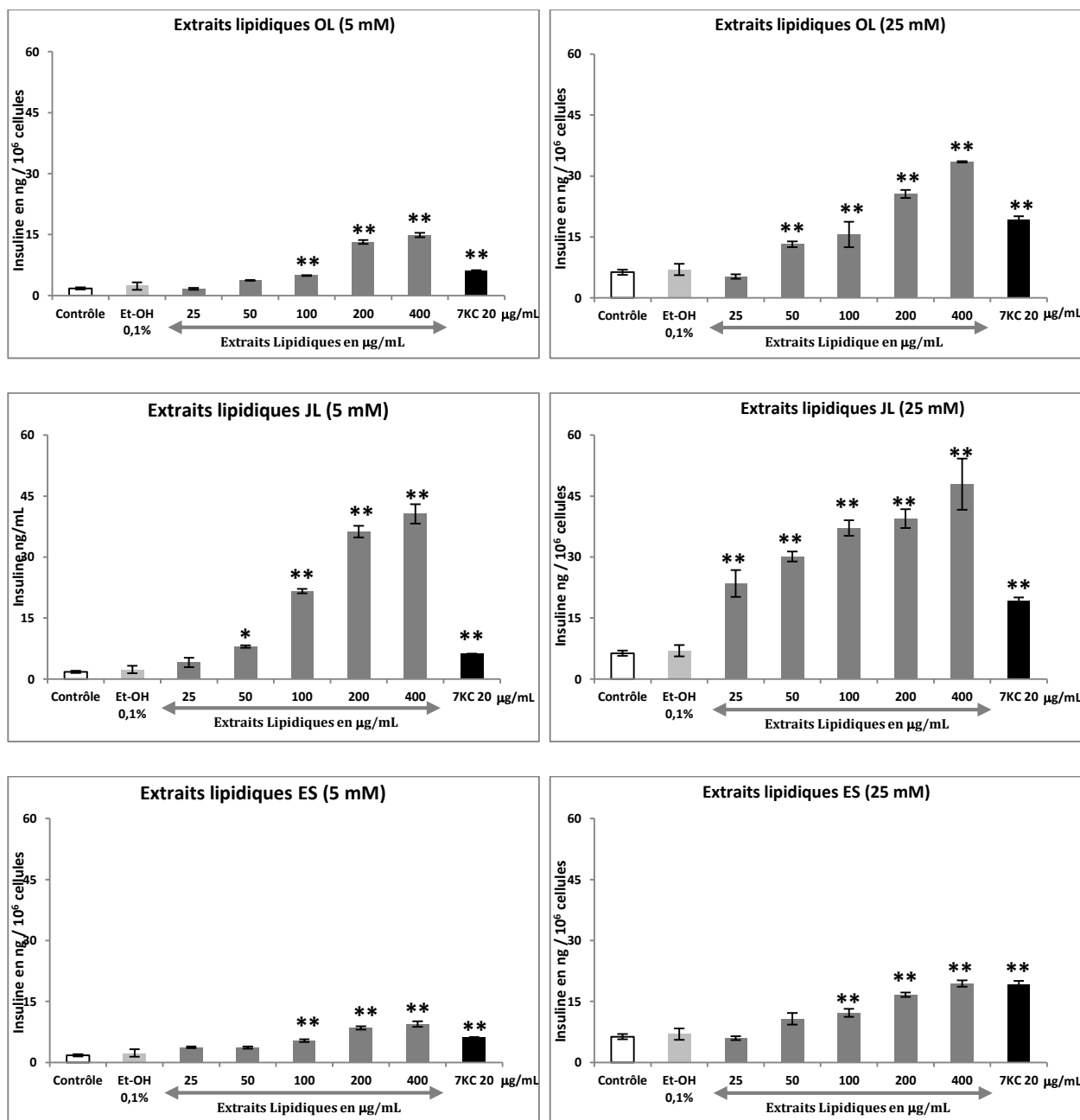


Figure 50 : Taux de l'insuline sécrété par les cellules MIN-6 traitées avec les extraits lipidiques

Les cellules MIN-6 ont été pré-incubées en conditions normo-glycémique et hyper-glycémique pendant 24 h pour atteindre une confluence d'environ 60 %. Elles ont ensuite été cultivées pendant 48 h en présence de différentes concentrations (0 à 400 µg/mL) d'extraits lipidiques de moules OL, JL et ES solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale à 0,1%). Le 7-cétocholestérol (7KC) (20 µg/mL) a été utilisé comme molécule de référence (inducteur de mort cellulaire). Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± SEM. L'analyse des données est faite par ANOVA suivie du post-Test de Tukey. (*) P < 0,05, (**) P < 0,01.

Discussion

1. APPROCHE ANALYTIQUE ET BIOMARQUEURS : INTERETS ET LIMITES

Le suivi des rejets de polluants dans le milieu marin, l'évaluation de leur impact sur les organismes vivants et la mesure des altérants accumulés dans la matière vivante, font appel à un panel de techniques analytiques allant de l'écosystème au moléculaire.

Dans le cadre cette Thèse, pour évaluer la pollution de deux sites de la côte atlantique marocaine Oualidia (OL) et Jorf Lasfar (JL), nous avons d'abord combiné deux approches complémentaires : approche analytique (métaux lourds) et biomarqueurs (profil lipidique).

Comme approche analytique, nous nous sommes intéressés au dosage des métaux lourds (Cd, Cr Pb) dans le tissus de moule *Mytilus galloprovincialis*, compte tenue la proximité des sites d'études OL et JL des unités de traitements des minerais de phosphate Jorf Lasfar dont les rejets sont riches en métaux lourds ([Moustaid et al. 2005](#); [Nasser et al. 2008](#); [Maanan 2008](#)). Il est à noter que les trois métaux pris en compte dans cette étude et pour cet invertébré marin sont classés parmi les éléments les plus toxiques ([CE 20.12.2006](#)).

Pour l'aspect biomarqueurs chez les moules, nous avons évalué le profil lipidique des moules en acides gras, phospholipides et stérols (cholestérol, oxystérols et phytostérols).

1.1. Les Métaux lourds

Les teneurs en métaux lourds dans les moules issues du site JL dépassent les normes internationales, alors qu'ils sont détectés en moindre quantité dans les extraits OL et à l'état de trace dans les extraits ES. Les fortes concentrations en métaux lourds trouvées dans les moules issues du site JL par rapport au site OL n'étaient pas inattendues compte tenu la proximité de ce site de la zone industrielle de JL. Nos résultats confirment ceux obtenus auparavant par d'autres études réalisées sur la même région entre 2002 et 2008 ([Moustaid et al. 2005](#); [Maanan 2008](#)) ce qui souligne une contamination chronique (**Tableau X**).

Le Cadmium (Cd) est le 1^{er} élément accumulé en concentration importante dans le tissus des moules issues du site JL. Les teneurs mesurées, dépassent largement le seuil de qualité sanitaire réglementaire de la norme du règlement européen (CE) n° 266/2001, fixé à 5 µg/g du poids sec de mollusques. Le Cd est un constituant naturel de la roche de phosphate. Au Maroc, se trouve la première réserve mondiale en gisement de phosphate, concentré principalement dans trois régions (Khouribga, Youssoufia, Meskala). Les teneurs en Cd varient selon les régions : Khouribga

(18,5 ppm), Youssoufia (46 ppm) et Meskala (62,5 ppm). Les 2/3 du Cd présent dans les phosphates bruts sont solubilisés lors de l'attaque sulfurique de la roche du phosphate ([Sourirajan 1963](#)).

Les fortes teneurs en polluants métalliques décelées dans les moules JL, s'expliquent aussi par la charge polluante charriée par les principaux rejets urbains de la ville d'Al Jadida (environ 400.000 habitants), et surtout de la zone industrielle Jorf Lasfar (JL) dont les eaux usées sont évacuées a priori sans traitement préalables. De plus, cette pollution est accentuée davantage par le trafic maritime due au port dont l'activité principale est d'ordre chimique et para-chimique ([Cheggour et al. 1999](#); [Maanan 2008](#)).

Les teneurs en chrome (Cr) trouvées dans les moules issues du site JL sont relativement importantes. Il dépasse le seuil de qualité sanitaire de la norme du règlement européen (CE) n° 221/2002, fixé à 1,5 mg/kg (poids humide) de mollusques (soit environ 4,5 mg/kg (poids sec) de mollusques). Des valeurs similaires ont été trouvées dans des moules issues de la même région par ([Moustaid et al. 2005](#)). Le plomb (Pb) se trouve aussi en concentration non négligeable dans les moules JL et OL. Toutefois, ces concentrations restent en dessous du seuil de qualité sanitaire réglementaire selon la norme du règlement européen (CE) n° 266/2001, fixé à 7,5 µg/g poids sec des mollusques.

Tableau X : Comparaison des teneurs en métaux toxiques ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ poids sec) dans les moules de notre étude avec celles obtenues dans d'autres études relatives au littoral marocain et à d'autres régions du monde

Sites	Période de mesure	Cd	Cr	Pb	Références
Oualidia, Maroc (<i>M. galloprovincialis</i>)	2010	1,7	1,4	0,8	Nos résultats
Jorf Lasfar , Maroc (<i>M. galloprovincialis</i>)	2010	15.8	10,3	3.5	Nos résultats
Moules ES (commercialisée en France)	2012	0,3	0,7	0,7	Nos résultats
Côte El Jadida, Maroc (<i>M. galloprovincialis</i>)	2004/2005	1.33 - 25.3	3.97 - 20.6	0.50 - 34.2	(Maanan 2008)
Lagune Oualidia, Maroc (<i>Crassostrea gigas</i>)	2004/2005	0.67 - 9.4	1.2 -15.3	1.2 - 7.4	Maanan 2008
Site Oualidia, Maroc (<i>M. galloprovincialis</i>)	2001/2003	11,7 - 23,2	6,87 - 10	0,2 - 0,5	Moustaid et al. 2005
Site Jorf Lasfar, Maroc (<i>M. galloprovincialis</i>)	2001/2003	80 - 199	8,75 - 18,75	0,25 - 075	(Moustaid et al. 2005)
côte atlantique marocaine (<i>M. galloprovincialis</i>)	1993/1999	0.4 - 8.0	--	--	(Chafik et al. 2001)
côte atlantique espagne, (<i>M. galloprovincialis</i>)	1991/1999	0.46 - 1.40	--	0.9- 3.0	(Besada et al. 2002)

La conséquence de la décharge des rejets issus des activités industrielles et urbaines dans l'environnement marin côtier provoque un déséquilibre permanent dans les écosystèmes marins, conduisant à une dégradation environnementale et écologique ([Cheggour et al. 1999](#); [Chafik et al. 2001](#); [Moustaid et al. 2005](#)).

Il est reconnu que la moule *Mytilus galloprovincialis* est un excellent bioindicateur de la pollution marine. Le dosage des métaux lourds (Cd, Cr et Pb) dans leurs tissus constitue un bon moyen de détecter une contamination du milieu. L'approche analytique est devenue un outil incontournable pour mesurer l'impact des polluants sur les organismes aquatiques ([Regoli 1998](#); [De Almeida et al. 2007](#); [Vlahogianni et al. 2007](#); [Rainbow et al. 2004](#); [Sureda et al. 2011](#)).

Les concentrations moyennes en Cd, Cr et Pb enregistrées au niveau du site JL, qui a été choisi principalement pour son importance socioéconomique, dépassent les limites fixées par la réglementation européenne (CE 266/2001), en particulier pour le Cd. Par ailleurs, pour les moules OL, des valeurs de Cd élevées ont aussi été observées. Il n'est par ailleurs pas à exclure des effets synergiques entre le Cd et la présence d'autres contaminants présents dans les moules des sites JL et OL. Ces observations remettent ainsi en question, en termes nutritionnels, la salubrité des moules récoltées au niveau de ces sites.

1.2. Le profil lipidique des moules

Dans notre étude, nous avons par ailleurs adopté comme biomarqueur de pollution, le profil lipidique des moules. La présence de métaux lourds dans les moules OL et JL peut favoriser un stress environnemental. En effet, les métaux lourds peuvent causer des dommages sur les composants cellulaires en favorisant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ([Jomova et Valko 2011](#)). Les cibles des ERO sont entre autre les lipides membranaires et intracellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation. Face à un stress environnemental, l'adaptation des moules peut contribuer à modifier leurs profils lipidiques ([Riginos et Cunningham 2005](#)). Cela nous a conduit à analyser le profil lipidique des moules OL, JL : la composition en acides gras, phospholipides, cholestérol, oxystérols et phytostérols. Le profil lipidique en acide gras des moules OL et JL est caractérisé par de faibles taux d'acides gras mono-insaturés et poly-insaturés ; il est riche en acide gras saturés, d'où le faible rapport [(acides gras insaturés)/(acides gras saturés)]. Ce rapport est généralement considéré comme un critère de mesure du degré d'oxydation lipidique ([Lizard et al. 1998](#)) : plus il est faible, plus il y a stress

oxydant. Les teneurs élevées en acides gras saturés chez les moules JL et OL sont dues principalement à leur forte concentration en acide palmitique (26% des acides gras totaux identifiés). Ce dernier est connue pour son rôle dans le développement de plusieurs maladie métaboliques notamment le diabète de type 2 et il également considéré comme pro-inflammatoire puisque qu'il stimule la réaction inflammatoire au sein de différents types cellulaires ([Jacqueminet et al. 2000](#); [Kawai et al. 2001](#); [Hong et al. 2009](#); [Savary et al. 2012](#)).

Si le taux de cholestérol est similaires dans les moules OL, JL et ES, il en est pas de même pour les oxystérols en C7 : dérivés oxydés de cholestérol en C7 résultant d'une auto-oxydation tels que 7-ketocholesterol (7KC), 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHC), et 7 α -hydroxycholestérol (7 α -OHC), ([Guardiola et al. 2002](#)). Ces oxystérols, notamment le 7 KC, sont trouvés à des taux élevés dans les moules JL et OL. Le 7 KC est un marqueur de stress oxydant et il est connu aussi par ses effets néfastes sur la santé humaine ([Vejud et Lizard 2009](#)). Ces données sont en accord avec des ratios plus faibles [(acides gras insaturés) / (acides gras saturés)] dans les moules OL et JL, et ils supportent l'hypothèse selon laquelle les conditions environnementales dans les sites JL et OL pourraient contribuer à déclencher un stress oxydatif. L'absence de grandes différences dans les profils de phytostérols en OL, JL, et les moules ES suggère que le régime alimentaire des moules, ne sont pas influencés par les conditions environnementales et/ou que le phytoplancton consommée par les moules possède des caractéristiques similaires d'une zone à l'autre. En plus des acides gras et des oxystérols, les phospholipides (phosphatidylcholine en particulier) dont la teneur est supérieure dans les moules JL par rapport aux moules OL et ES, pourrait également constituer un biomarqueur approprié permettant de discriminer les zones côtières qui sont les plus touchés par la pollution. Il convient de noter que l'intérêt de quantifier les acides gras et des phospholipides dans la moule (*Mytilus galloprovincialis*) a déjà été signalé au cours d'une culture expérimentale utilisant des semences de moules à partir des zones avec différents degrés d'exposition à la marée noire du Prestige ([Peteiro et al. 2007](#)). Par conséquent, en accord avec cette étude, le niveau de phosphatidylcholine dans des moules pourrait également constituer un biomarqueur environnement intéressant.

Notre étude présente les premières données de l'approche biomarqueurs lipidiques chez les moules issues de 2 sites la côte atlantique marocaines JL et OL.

Ces méthodes globales (approche analytique et biomarqueurs) sont cependant insuffisantes. En effet, les contaminants recherchés par méthodes analytiques peuvent avoir des demi-vies

courtes et subir dans les milieux divers biotransformations qui conduisent à la formation de métabolites actifs non analysés. Quant aux biomarqueurs, la principale limitation est la difficulté de discriminer entre réponses adaptatives « naturelles » et réponses au stress chimique.

Au Maroc, plusieurs épisodes d'intoxication consécutifs à la consommation de fruits de mer ont déjà été observés, en 1971 à Casablanca, Safi, Mohammedia et Rabat, en 1975 à Casablanca, Safi et Kenitra, en 1982 à Agadir (51 cas d'intoxication et deux décès) ; plus récemment, en 1994, plusieurs intoxications ont entraîné 23 hospitalisations et quatre décès ([Moustaid et al. 2005](#)). Les intoxications ont été le plus souvent rattachées aux toxines algales, avec peu d'attention accordée aux métaux lourds.

L'incidence à long terme des produits issus d'un environnement maritime pollué sur la santé des consommateurs est rarement évaluée. Une étude *in vivo* réalisée sur des souris gavées avec les moules issues des sites JL et OL a conclu que la consommation de ces moules pourrait entraîner une toxicité chez le consommateur ([Moustaid et al. 2005](#)). Des travaux récents ont montré que les extraits de moules (lipophiles et hydrophiles), contaminées par des métaux toxiques issues des sites marocains JL et OL et testés *in vitro* sur des cellules humaines intestinales tumorales caco2 perturbent la biosynthèse des macromolécules, la viabilité cellulaire par inhibition de la fonction mitochondriale et provoquent aussi une fragmentation de l'ADN ([Nasser et al. 2008](#)).

En fonction de ces constatations, ceci a conduit à vérifier l'incidence des extraits lipidiques de moules JL et OL sur des modèles rongeurs et sur des cellules β pancréatiques murines (MIN-6) afin de préciser l'impact biologique de ces produits.

2. APPORT DU MODELE RONGEUR POUR L'EVALUATION DE LA TOXICITE DES EXTRAITS LIPIDIQUES DE MOULES

Dans notre étude, nous avons évalué *in vivo* l'incidence des extraits lipidiques de moules issues du site Jorf Lasfar (JL : potentiellement pollué par les rejets de la zone industrielle) et site Oualida (OL : zone touristique, maraîcher et d'ostréiculture connue à l'échelle nationale et internationale). Par gavage, les rats ont été traités avec un 1,2 et 2,4 mg des extraits lipidique de moules, une fois toutes les 24 h pendant 14 j. Les rats contrôles ont été gavés dans les mêmes conditions avec l'eau physiologique. Les paramètres biochimiques reflétant les perturbations métaboliques ont été évalué niveau plasmatique.

La glycémie est le paramètre central dans l'investigation des troubles du métabolisme glucidique). Nos résultats ont montré que les extraits lipidiques JL utilisé à une concentration 2,8 mg à un effet hypoglycémiant sur les rats, une augmentation similaire non significative a été observé chez les rats traités avec l'extrait OL. Selon les critères de l'Association Américaine de Diabètes Association publié en 2006, l'interprétation d'une valeur isolée de la glycémie peut soulever de nombreux problèmes qui pourront être abordés dans un contexte biologique plus large comprenant des paramètres de diagnostic (glucosurie, glycémie postprandiale, épreuve de tolérance au glucose, courbe d'insulinémie) et de surveillance (hémoglobine glyquée) ([Nathan et al. 2006](#); [Jago 2006](#)).

Les constituants azotés ou non protéiques sont environ une quinzaine dans le sérum, mais en pratique courante, seul quatre d'entre eux sont d'une importance capitale en néphrologie: l'urée, l'acide urique, la créatinine et l'ammoniaque ([Dussol 2011](#)). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux trois premiers paramètres.

L'urée est formée dans le foie, il constitue la principale voie métabolique d'excrétion du surplus d'azote corporel. L'urée, filtrée par les glomérules, est partiellement réabsorbée par les tubules. Son taux plasmatique reflète l'équilibre entre sa production et son excrétion. Le dosage de l'urée, comme étant test de surveillance de la fonction rénale montre aucune variation des taux ce dernier dans le plasma des animaux traités et non traités.

La créatinine représente le produit de transformation de la créatine. La créatine joue un rôle fondamental, sous forme de créatine-phosphate, dans la production d'ATP au niveau musculaire.

Le dosage de la créatinine reflète bien la capacité de filtration glomérulaire. Généralement une augmentation de créatinine apparaît simultanément avec l'augmentation de nitrogène urique sanguine. La concentration de la créatinine est considérée souvent comme un paramètre clinique pour détecter les effets toxiques reliés au traitement par des composés sur les reins chez les animaux expérimentaux ([Travlos et al. 1996](#)). Ces données peuvent expliquer l'augmentation de la créatinine chez les rats traités aux extraits lipidiques OL et JL.

Les transaminases catalysent la réaction de transfert d'un groupe amine d'un acide aminé. Le groupe amine est transféré à l'acide α -cétoglutarique et provient soit de l'acide aspartique soit de l'alanine. Ce qui définit l'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT). Les transaminases sont largement distribuées dans divers tissus. L'ASAT est particulièrement abondante au niveau du cœur, du foie, des muscles squelettiques, des reins (par ordre décroissant). L'ALAT se retrouve essentiellement au niveau hépatique. L'ALAT est présente uniquement dans le cytosol, alors que l'ASAT est également présente dans les mitochondries. ASAT et ALAT sont des indicateurs de souffrance cellulaire. Une augmentation d'ALAT et ASAT a été observé dans le plasma des rats traités aux extraits lipidiques de moules JL et OL. L'augmentation des transaminases est variable selon le type de pathologie. Dans l'hépatite virale aiguë, les valeurs maximales atteintes s'échelonnent de 30 à 100 fois la limite supérieure des valeurs de référence; l'ALAT augmente plus fortement que l'ASAT. Dans l'hépatite toxique les valeurs des transaminases peuvent être comparables à celles obtenues lors de l'hépatite virale aiguë.

De plus, les effets des extraits lipidiques des moules OL et JL sur le profil lipidiques des rats ont été explorés. Ce bilan a une importance cruciale dans le diagnostic et traitement de plusieurs maladies cardiovasculaires, métabolique et maladie neurodégénératives ([Akuyam et al. 2007](#)). Plusieurs études ont rapporté que la perturbation des métabolismes lipidique est un facteur de risque associé à plus au développement de diverses pathologies syndrome métabolique, diabètes cardiovasculaires ([Jeppesen et al. 2006](#); [Buse et al. 2007](#); [Polis et al. 2009](#); [Sharma et al. 2009](#)).

En tenant compte des dernières recommandations du ([NCEP 2001](#)) (National Cholesterol Education Programme) ([Royer et al. 2007](#)), nous avons établi un bilan lipidique complet avec mesure du cholestérol total, HDL-cholestérol et triglycérides et calcul du LDL-cholestérol. Chez les rats traités à forte concentration d'extraits lipidiques de moules OL et JL (2,8 mg), une

hypertriglycéridémie a été détectée. La contribution de l'hypertriglycéridémie au risque cardiovasculaire est moins évidente que celle du cholestérol. Ce paramètre pris isolément n'a qu'une valeur pronostique limitée. Le dosage du cholestérol total ne montre aucune variation de ce dernier dans le plasma des rats traités. Toutefois, les taux plasmatiques en HDL-cholestérol sont nettement plus élevés chez les rats traités avec les extraits lipidiques OL et JL. En effet les taux en HDL-cholestérol sont deux fois plus élevés dans le plasma des animaux traités avec 1,4 mg et trois fois plus élevé chez les animaux traités avec 2,8 mg. Le LDL-cholestérol est estimé selon la formule de Friedewald ([Averna et al. 1985](#)), applicable si la valeur des triglycérides ne dépasse pas 4,5 mmol/L. Une légère baisse est observée chez les animaux traités avec les extraits lipidiques de moules OL et JL.

Le lien entre dyslipidémie – maladies cardio-vasculaires est particulièrement bien établi ([Jeppesen et al. 2006](#)). Un grand nombre d'enquêtes épidémiologiques mettent l'accent sur la relation inverse qui lie le taux de cholestérol HDL au risque d'athérosclérose. Quant au cholestérol total et au LDL-C, leurs augmentations sont associées à un risque cardio-vasculaire. Une faible concentration de HDL-C peut être considérée comme un facteur de risque supplémentaire, alors qu'une concentration élevée de HDL-C est un facteur de protection ([Cofan et al. 2011](#)). Du fait de cette relation inverse entre le risque cardio-vasculaire et les HDL-C, il a été proposé d'utiliser les ratios [cholestérol total/HDL-C] ou [LDL-C/HDL-C] en tant que prédicateurs de risque cardio-vasculaire. L'étude de Framingham a particulièrement popularisé le ratio [C Total / HDL-C]: le risque cardio-vasculaire augmente particulièrement lorsque ce ratio dépasse 5 ([Dawber et al. 1957](#)). Dans notre étude on a enregistré un ratio de [C Total / HDL-C] inférieur à 3 chez tous les rats traités avec les extraits lipidiques OL et JL. Toutefois, nous avons trouvé chez rats control un ratio de [C Total / HDL-C] = 5. L'amélioration de ce ratio chez les animaux traités pourrait être due principalement à la richesse des extraits lipidiques en phytostérols (environ 40% du total stérol) principalement en Brassicastérol, 24-méthylène-cholestérol, Campesterol, Stigmasterol et sitostérol. Récemment Une étude épidémiologique a mis en relation l'augmentation des taux plasmatiques en phytostérols chez l'homme et la baisse des facteurs de risque associé aux maladies métaboliques et coronarienne ([Cofan et al. 2011](#)).

3. APPORT DE L'ANALYSE MULTIPARAMETRIQUE FONCTIONNELLE SUR CELLULES MIN-6 POUR L'EVALUATION DE LA TOXICITE DES EXTRAITS LIPIDIQUES DE MOULES

3.1. Justification du modèle cellulaire utilisé

Pour aborder *in vitro* l'incidence des extraits lipidiques, il était nécessaire de disposer d'un modèle cellulaire approprié. Nous avons ainsi utilisé une lignée des cellules β pancréatiques murine (MIN-6) hautement spécialisée et initialement décrite pour étudier le métabolisme glucidique et lipidique ([Kennedy et al. 1999](#); [Saitoh et al. 2009](#); [Sampson et al. 2010](#)). Cette lignée est immortalisée, non tumorale et insulino-sécrétrice et répond au glucose de 5 à 30 mM ([Miyazaki et al. 1990](#); [Ishihara et al. 1993](#)). La fonction principale des cellules β pancréatiques est la sécrétion d'insuline, une hormone qui joue un rôle clé dans l'homéostasie glucidique. La défaillance progressive des cellules β pancréatique est un élément central dans le développement et la progression du diabète de type 2. Cette maladie endocrinienne est la plus fréquente chez l'homme et atteint des proportions pandémiques ([Leahy 2005](#)). La prédisposition à cette maladie est affectée à la fois par des facteurs génétiques et acquis et influencée par des facteurs environnementaux ([Permutt et al. 2005](#)). Récemment, plusieurs études ont mis l'accent sur l'implication de la pollution chimique environnementale dans le développement de diverses maladies métaboliques, comme le diabète de type 2 et l'obésité ([Ambolet-Camoit et al. 2010](#); [Pierre et al. 2011](#); [Barouki 2011](#); [Ambolet-Camoit et al. 2012](#); [Polyzos et al. 2012](#)). La synthèse la plus récente et la plus complète sur la capacité des métaux lourds à perturber la fonction sécrétoire de l'insuline par les cellules β pancréatiques a été publiée en 2009; le lien est clairement démontré pour Cd, Hg et As ([Chen et al. 2009](#)).

Sur les cellules β pancréatiques MIN-6, les extraits lipidiques ont été testés à différentes concentrations (25, 50, 100, 200 et 400 $\mu\text{g/mL}$) en conditions normo-glycémique (5 mM) et hyper-glycémiques (25 mM). Des moules comestibles (ES), provenant d'Espagne et commercialisées en grande surface en France, ont été utilisées comme contrôles. L'induction de la mort cellulaire, le dysfonctionnement d'organelles (mitochondries, lysosomes, peroxyosomes), le stress oxydant, l'inflammation et la sécrétion d'insuline ont été étudiés en utilisant une batterie de tests basés sur des méthodes de cytométrie en flux, de microscopie et de biochimie.

3.2. Extraits lipidiques de moules et stress oxydant

Des études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence des relations entre la présence d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ERO et ERN) et la destruction des cellules β pancréatiques ([Kajimoto et Kaneto 2004](#); [Chen et al. 2009](#)) pouvant contribuer au développement et à la progression des maladie métaboliques notamment le diabète type 2 ([Kubisch et al. 1994](#); [Kawasaki et al. 2004](#)). La sensibilité des cellules β pancréatiques aux ERO et ERN est due à la faiblesse de son systèmes de défense antioxydant ([Lenzen 2008](#)). Dans notre étude, nous avons traité les cellules β pancréatiques MIN-6 pendant 48 h avec les extraits lipidiques JL, OL et ES, utilisés à différents concentrations, puis nous avons évalué le stress oxydant et ses conséquences sur l'équilibre Redox.

Par cytométrie en flux, nous avons trouvé des taux très élevés en ERO et ERN chez les cellules MIN-6 traitées avec les extraits lipidiques OL et JL. En condition normo-glycémique, tous les *extraits* lipidiques ont stimulé la production d'ERO et d'ERN. Toutefois, les extraits lipidiques JL en comparaison aux extraits lipidiques OL et ES ont plus stimulé la surproduction de H_2O_2 . Avec les extraits lipidiques ES, la production d' H_2O_2 est très faible. Les niveaux élevés en H_2O_2 chez les cellules MIN-6 pourrait expliquer l'augmentation de l'activité catalase pour contribuer à réduire les effets secondaires induits par H_2O_2 . En parallèle de cette amélioration de l'activité catalase, les teneurs en glutathion réduit ont diminuées chez les cellules β pancréatiques MIN-6. Les effets indirects du NO^* sont médiés quant à eux par les ERN, le NO interagit avec les anions superoxydes pour donner des peroxynitrites ([Gao 2010](#)) qui réagissent avec les macromolécules biologiques (protéines, lipides et ADN) et induisent des activités toxiques ([Massion et al. 2002](#)). Les conséquences de l'induction du stress oxydant sur les lipides ont été évaluées par détection des produits de peroxydation lipidiques. Les niveaux élevés en 4-HNE détectés confirment le phénomène du stress oxydant par les extraits lipidiques JL et OL sur les cellules β pancréatiques MIN-6. En accord avec nos résultats, une augmentation de marqueurs de stress oxydant, y compris malondialdéhyde (MDA) et 4-HNE, ont été observées dans le plasma des patients atteints de pancréatite et le syndrome métabolique ([Mattson 2009](#); [Podborska et al. 2009](#)).

Le stress oxydatif semble être largement impliqué dans le développement du diabète et les complications associées ([Baynes et Thorpe 1999](#)). En fait, il a été démontré que la génération de ROS est 5 fois plus élevée chez les patients atteints de diabète de type 1 et 2 que chez les patients sains. La génération de ces ROS est directement liée à l'hyperglycémie chronique qui

provoque entre autre un déséquilibre de la balance redox, l'activation de PKC et la surproduction d'ions superoxydes dans la mitochondrie ([Pop-Busui et al. 2006](#)).

La sensibilité des tissus au stress oxydatif est variable et dépend surtout des taux d'expression, dans ces tissus, des enzymes antioxydants. Dans les îlots pancréatiques, ces protéines présentent de faibles niveaux d'expression et de ce fait, ces structures sont très sensibles au stress oxydatif. Il a été mis en évidence que chez les patients diabétiques, l'augmentation des marqueurs de stress oxydatifs était directement corrélée au degré d'altération de la réponse sécrétoire au glucose.

Le stress oxydant observé chez les cellules MIN-6, traitées avec les extraits lipidiques de moules pourrait avoir plusieurs origines.

3.3. Extraits lipidiques de moules, prolifération et mort cellulaire

Une masse fonctionnelle de cellule bêta est un facteur important dans la régulation de l'homéostasie du glucose. Le maintien de la masse des cellules bêta est un processus dynamique, subissant des hausses et des baisses pour maintenir la glycémie dans une gamme physiologique normale ([Bonner-Weir 2000b](#); [Michelle Furtado et al. 2003](#); [Supale et al. 2012](#)). Les îlots pancréatiques s'adaptent à long terme à la demande accrue d'insuline principalement par l'augmentation de la masse des cellules bêta ([Bernard et al. 1999](#); [Bonner-Weir 2000a](#)). Ce mécanisme de compensation assure le maintien de l'euglycémie chez les sujets en bonne santé. La masse des cellules bêta est contrôlée principalement par un équilibre entre la prolifération et la mort de ces cellules β pancréatiques ([Bonner-Weir 2001](#)).

La prolifération de la cellule bêta peut être stimulée par des nutriments, tels que le glucose et d'autres facteurs de croissance ([Brockenbrough et al. 1988](#); [Swenne 1992](#)). Dans notre étude nous avons suivi la prolifération des cellules MIN-6 pendant 72 h, en conditions normo-glycémiques (5mM) et hyper-glycémiques (25mM). En condition hyper-glycémique, le nombre total des cellules MIN-6 a doublé pendant 24 h, alors qu'il fallait 48 h en condition normo-glycémique, pour que le nombre totale des cellules MIN-6 double. Des études utilisant des îlots pancréatiques humains ont démontré que la prolifération des cellules bêta augmente durant les premières 24 h d'incubation des îlots contenant une forte concentration de glucose (33,3 mM) ([Maedler et al. 2002](#)). En présence des extraits lipidiques de moules, il convient de noter que les extraits JL et OL à l'opposé des extraits ES provoquent une chute drastique de la prolifération

des cellules MIN-6. Cette chute de prolifération est plus prononcée en condition normo-glycémique qu'en condition hyper-glycémique. Cette diminution de prolifération des cellules MIN-6 est dose-dépendante et associée d'une part à une induction de mort cellulaire, d'autre part à une perturbation du cycle cellulaire. La différence observée pourrait notamment provenir de l'activation de la prolifération cellulaire par le glucose. En effet, des expériences menées au laboratoire ont mis en évidence l'augmentation, d'un facteur 2,4 du nombre de cellules après 3 j de culture à 25 mM glucose, comparé avec des cellules cultivées en parallèle à 5 mM glucose.

Actuellement, 3 grands types de mort sont reconnus : la mort de type I ou apoptose, la mort de type II ou autophagie et la mort de type III ou nécrose ([Boya et Kroemer 2008](#)). D'autres types de mort, dérivant de ces 3 grands types, ont également été décrits ([Kroemer et al. 2009](#)). A l'exception des extraits ES, les extraits lipidiques de moules sauvage (OL et JL) augmentent la perméabilité de la membrane cytoplasmiques démontrée par coloration à l'IP et mesure de l'activité LDH, et provoquent une chute de potentiel transmembranaire mitochondrial (montré par coloration au DIOC₆(3)). En plus de la mitochondrie, les lysosomes sont aussi impliqués dans le processus de mort cellulaire ([Boya et Kroemer 2008](#)). La coloration de ces derniers par l'acridine orange, a montré une forte déstabilisation de leurs membranes sur cellules traitées avec les extraits OL et JL. Cette déstabilisation pourrait s'accompagner d'un éventuel relargage d'hydrolases acides dans le cytosol contribuant à la mort cellulaire ([Repnik et Turk 2010](#)). La déstabilisation de la membrane lysosomale peut aussi se traduire par la mort des cellules sans activation de caspases. Cette mort cellulaire peut adopter une apparence nécrotique ([Boya et Kroemer 2008](#)). Par ailleurs, les effets des extraits lipidiques ont été évalués par coloration des noyaux aux Hoechst 33342 et la détection des cellules en phase Sub-G1. L'absence de cellules à noyaux fragmentés et/ou condensés caractéristiques des cellules apoptotiques et des cellules en Sub-G1 laissent supposer que la mort cellulaire induite par les extraits OL et JL est non apoptotique.

3.4. Extraits lipidiques de moules et sécrétion d'insuline

Les cellules β pancréatiques, jouent un rôle central dans le maintien de l'homéostasie du glucose. Elles sont responsables de la sécrétion de l'insuline, une hormone clé du métabolisme régulant les niveaux de glucose dans le plasma ([Rutter et Parton 2008](#)). En effet, ces cellules s'ajustent constamment dans le but de réguler le taux de sécrétion de l'insuline et cela d'une manière extrêmement précise en fonction du statut métabolique et hormonal de l'organisme. *In*

in vitro, les cellules β pancréatiques sont influencées par le glucose dans une gamme de concentrations allant de 5 à 30 mM ([Miyazaki et al. 1990](#); [Ishihara et al. 1993](#)). A concentration physiologique, d'autres nutriments (acides aminés, acides gras) et les corps cétoniques sont incapables de déclencher seuls la sécrétion d'insuline ([Magnan et Ktorza 2005](#)).

Afin de préciser l'incidence des extraits lipidiques de moules OL, JL et ES sur la fonction des cellules MIN-6, nous avons mesuré le taux de sécrétion d'insuline en conditions normo-glycémique (5 mM) et hyper-glycémique (25 mM).

En condition normo-glycémique, les extraits lipidiques JL stimulent fortement la sécrétion d'insuline. Plus la quantité d'extrait lipidique est élevée, plus la quantité d'insuline sécrétée est importante. Cette stimulation est potentialisée en condition hyper-glycémique. L'effet le plus marqué a été observé dès la concentration la plus faible en extraits lipidique (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La même tendance a été observée sur cellules MIN-6 traités aux extraits OL mais avec des effets moins prononcés en condition normo-glycémique. Toutefois, l'effet potentialisateur de la sécrétion de l'insuline de ces derniers en conditions hyper-glycémique reste moins fort par rapport aux extraits JL. A l'inverse, les extraits lipidiques ES n'ont pas d'effet sur la sécrétion d'insuline.

Il est clairement établi que les acides gras sont des substrats énergétiques majeurs de la cellule β des îlots de Langerhans ([Berne 1975](#); [Malaisse et al. 1985](#); [Girard 2005](#)); ils stimulent l'insulinosécrétion en présence de concentrations normales ou élevées de glucose sanguin. Les effets insulinosécréteurs des acides gras sont néanmoins faibles par rapport à leur contribution au métabolisme oxydatif des cellules β . Des expériences récentes ont montré une dualité des effets des acides gras sur la cellule β : l'exposition à court terme (quelques heures) à des acides gras libres potentialise la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, tandis que l'exposition à long terme (plusieurs jours) inhibe la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ([Girard 2005](#)). Dans notre étude, les cellules MIN-6 ont été exposées aux extraits lipidiques pendant 48 h, ces derniers sont sensés inhiber la sécrétion d'insuline. L'insulinosécrétion dépend aussi de la nature des acides gras. Le palmitate est connu pour son action inhibitrice de la sécrétion d'insuline, il affecte d'une manière directe l'expression du gène de l'insuline ([Jacqueminet et al. 2000](#); [Poitout 2008](#)). Or les extraits lipidiques OL et JL sont très riches en palmitate (environ 26%). du Cela favorise l'hypothèse selon laquelle les extraits lipidiques JL contiennent des éléments capables de potentialiser la sécrétion d'insuline malgré l'action inhibitrice des acides gras saturés,

principalement le palmitate présent en concentration importante dans les extraits lipidiques de moule JL.

La stimulation forte de la sécrétion d'insuline par les cellules MIN-6 traitées par les extraits lipidiques OL et JL pourrait aboutir à l'épuisement des cellules β . En effet, en absence d'une augmentation comparable de la synthèse et de la maturation de l'insuline, cette sécrétion accrue d'insuline pourrait provoquer la dégranulation des cellules β et une diminution du temps de résidence intracellulaire des granules nouvellement formés dont le contenu serait sécrété avant maturation complète de la proinsuline en insuline ([Alarcon et al. 1995](#)). Il résulterait de cet épuisement des cellules β une diminution du contenu pancréatique en insuline, une augmentation du rapport proinsuline/insuline plasmatique, et une altération préférentielle de la première phase de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

La potentialisation de la sécrétion de l'insuline à long terme nécessite une hausse de l'activité métabolique de la cellule, avec pour conséquence un excès de génération d'ERO par la chaîne mitochondriale ([Leibowitz et al. 2010](#)). Il a par ailleurs été démontré que la dépolarisation de la membrane interne mitochondriale stimule l'influx de Ca^{2+} et que cela est néfaste à la survie des cellules β ([Efanova et al. 1998](#)). Cet effet pourrait-être dû à l'activation de protéases intracellulaires Ca^{2+} -dépendantes ou à l'ouverture du port de transition de perméabilité des mitochondries par augmentation de la concentration du Ca^{2+} ou de la production des ERO ([Tsujimoto et Shimizu 2007](#); [Koshkin et al. 2008](#)).

La mitochondrie impliquée dans le contrôle de la mort cellulaire, en association avec le lysosome, pourrait ainsi via des mécanismes dépendant du Ca^{2+} contribuer à la dérégulation de la sécrétion d'insuline. Cet organite, au métabolisme étroitement régulé par l'équilibre Redox et en étroite relation avec le peroxyosome, pourrait constituer une cible préférentielle de la toxicité des extraits lipidiques OL et JL au niveau des cellules bêta-pancréatiques.

3.5. Apport des analyses multiparamétriques fonctionnelles en toxicologie : intégration des études microscopiques, cytométriques et biochimiques à l'approche cytomique

Les analyses d'activités cytotoxiques doivent être le plus larges possibles afin de pouvoir révéler différents types d'effets délétères : effets sur la prolifération et la mort cellulaire, sur le stress oxydant et l'inflammation et le métabolisme cellulaire. Dans ce contexte, différents compartiments cellulaires sont ciblés : membrane cytoplasmique, cytosol, noyau et organites (mitochondries, peroxyosomes, lysosomes...). Les effets sur les grandes familles de macromolécules (protéines, lipides, acides nucléiques (ARNm, miRNA, ADN)) sont également pris en compte. Cette analyse exhaustive visant à définir l'état d'une cellule à un moment donné et dans un contexte donné, en intégrant plusieurs paramètres, porte le nom de cytomique ([Kachel et al. 1983](#); [Kachel et al. 1984](#); [Tarnok 2004](#); [Mittag et al. 2006](#); [Herrera et al. 2007](#); [Finn et al. 2011](#)). La cytomique correspond à l'analyse du cytome : ensemble des constituants morphologiques, antigéniques et fonctionnels qui permettent non seulement de définir, mais aussi de modéliser, l'état et le fonctionnement d'une cellule à un instant t.

Cette discipline issue de la cytométrie en image et en flux a pour objectif de recréer des cellules artificielles. Toutefois, elle présente aussi de l'intérêt en toxicologie en raison de la possibilité d'intégrer simultanément divers effets d'un traitement en prenant en compte plusieurs paramètres.

Dans le cadre de l'étude réalisée sur cellules MIN-6 en faisant appel à des techniques de microscopie, de cytométrie et de biochimie, des analyses conventionnelles des résultats ont été faites. Toutefois, dans cette étude, l'activité cytotoxique des extraits lipidiques de moules OL et JL a été comparée pour la première fois à deux types de références : une référence d'extraits de moules destinées à la consommation (ES), et une référence lipidique (7KC) connue pour induire de la mort cellulaire, de l'inflammation et de l'oxydation sur différents types de cellules ([Veijux et Lizard 2009](#)). Par le biais des valeurs Rc introduites (calculées sur la base de données de cytométrie en flux), il a été possible de comparer les effets des extraits lipidiques OL et JL par rapport aux extraits ES et au 7KC. Les analyses ont été faites paramètre par paramètre et ont révélé, d'une façon générale, des effets délétères plus prononcés avec JL qu'avec OL et le plus souvent peu ou pas d'effets avec ES. Dans certains cas, les effets observés avec JL étaient du

même ordre de grandeur que ceux obtenus avec le 7KC soulignant le caractère potentiellement nocif des extraits de moules JL qui seraient à confirmer *in vivo* sur des modèles appropriés.

Dans une approche cytomique, il conviendrait de dégager une formule mathématique à partir des Rc obtenus avec les extraits de moules JL, OL et ES, mais aussi avec le 7KC, afin d'obtenir une représentation mathématique. Les effets de JL et OL seraient comparés aux références ES et 7KC. En plus des Rc, cette formule pourrait inclure des données d'imagerie (analyse d'images) issues des images obtenues en microscopie à fluorescence. Elle pourrait aussi intégrer des données biochimiques. Cette approche multiparamétrique serait ainsi particulièrement appropriée en toxicologie environnementale afin d'évaluer les répercussions potentielles de contaminants sur la santé humaine. Le traitement statistique des données pourrait alors être réalisé par analyse multivariée.

Ainsi, au-delà de l'aspect toxicologique, les méthodes d'analyse par microscopie, cytométrie en flux et biochimie utilisées dans cette étude ont généré des données qui pourraient donc être exploitées dans le cadre d'une approche cytomique dont il reste à évaluer la pertinence et à démontrer l'intérêt.

Conclusion & perspectives

1. CONCLUSION

Les objectifs de la Thèse étaient de préciser les activités cytotoxiques de moules en utilisant différentes approches : approche analytique, biomarqueurs, étude sur rongeurs et étude *in vitro* sur cellules en culture. Les cellules utilisées (cellules bêta pancréatiques murines MIN-6) ont été choisies pour aborder l'impact éventuel de constituants des moules issues des sites JL et OL sur la capacité à induire des désordres métaboliques.

Actuellement, les études toxicologiques portent le plus souvent sur la recherche de propriétés pro-oncogènes des substances (molécules, extraits...) mais leurs effets sur les maladies métaboliques, qui sont fortement invalidantes et coûteuses pour la société, sont rarement pris en considération.

Cette étude a abordé ce problème et pose les bases d'une approche méthodologique qui pourrait être appliquée à grande échelle. C'est en effet la première étude sur des moules marocaines qui a été réalisée comparativement à des moules de référence commercialisées en France pour l'alimentation et par rapport à une molécule, le 7-cétocholestérol (7KC), connu pour ses effets délétères dans différentes pathologies en particulier cardiovasculaires. Cette étude comparative permet de faire émerger quels paramètres sont spécifiquement affectés par les extraits JL et OL et de les pondérer par rapport aux références.

Avec les différentes approches utilisées *in vitro* et *in vivo*, cette étude conforte les résultats obtenus dans des études antérieures et souligne que les moules JL seraient potentiellement néfastes à la santé humaine.

Au-delà de l'aspect toxicologique, ce travail de Thèse a permis de mettre en œuvre plusieurs méthodologies, en particulier de cytométrie en flux, qui peuvent être appliquées dans d'autres contextes scientifiques (cancérologie, hématologie, immunologie, neurologie...).

Ce travail de Thèse a aussi permis de s'interroger sur des méthodes analytiques à même d'intégrer les nombreux paramètres pris en compte dans une analyse toxicologique. Ceci a conduit à discuter la pertinence d'une approche cytomique qui pourrait se révéler intéressante dans un contexte de biosurveillance.

2. PERSPECTIVES

A l'issue de cette étude, il serait important de pouvoir approfondir certains aspects qui permettraient de mieux connaître la toxicité associée aux moules JL et OL dans un contexte toxicologique appliquée à la biosurveillance afin de préserver la santé des populations exposées.

Il serait aussi intéressant de pouvoir se servir des résultats obtenus, des techniques et des modèles développés afin d'identifier des substances capables de protéger de différents effets cytotoxiques (induction de mort cellulaire, stress oxydant...).

Dans ce contexte, les études suivantes méritent d'être envisagées :

- Caractérisation plus exhaustive de métaux présents dans les moules, en particulier recherche complémentaire de Hg, Al et As,
- Caractérisation d'autres polluants et toxines hydro et liposolubles à même d'entraîner des désordres métaboliques,
- Evaluation sur des modèles *in vivo* appropriés des impacts éventuels d'extraits lipidiques de moules sur les organes et tissus jouant un rôle important dans le métabolisme lipidiques (foie, pancréas, muscles, tissu adipeux),
- Caractérisation sur les cellules MIN-6 des voies métaboliques conduisant à la mort cellulaire, l'oxydation et la sécrétion d'insuline en relation avec les effets délétères mis en évidence en particulier avec les extraits JL,
- Evaluation d'une approche cytomique permettant de comparer les activités cytotoxiques des extraits JL, OL, ES et du 7KC,
- Planification d'une étude épidémiologique permettant d'évaluer les effets éventuels d'une consommation régulière de moules issues des sites OL et JL sur des paramètres biologiques en relation avec les maladies métaboliques.
- Evaluation des effets protecteurs d'extraits de raquette de cactus et/ou d'huile d'argan contre ces polluants i) dans le but de réduire leurs effets néfastes sur l'homme et ii) de valoriser au mieux et scientifiquement ces produits naturels marocains qui ont une grande importance économique.

Production scientifique

I - Présentations

1- Communication orales :

- **Boumhras M.**, Zarrouk A., Nury T., Lizard G. Cytométrie en flux, biologie cellulaire et toxicologie. 4^{ème} congrès méditerranéen de cytométrie faculté de pharmacie de Monastir, 2012- Monastir, Tunisie.
- **Boumhras M.**, Nury T., Cherkaoui-Malki M., Nasser B., Lizard G. Incidence d'extrait lipidiques de moules issues de la côte atlantique marocaine sur le stress oxydant de cellules β pancréatiques murines (MIN6) : analyse par cytométrie en flux. 4^{ème} congrès méditerranéen de cytométrie faculté de pharmacie de Monastir, 2012- Monastir, Tunisie.
- **Boumhras M.** et Nasser B. Incidence d'extrait lipidique de moules polluées, issues de la côte atlantique marocaine sur les paramètres plasmatiques chez le Rat. Colloque PHC Volubilis, 2011 Casablanca.
- **Boumhras M.**, El Maataoui O., Farouqi B. et Lizard G. Atelier de Cytométrie en Flux. Colloque PHC Volubilis, 2011 Casablanca, Centre Hospitalier Universitaire Ibn Rochd Casablanca-Maroc.
- **Boumhras M.**, Nasser B., El Kebbjaj R., Moustaid K., Essamadi A. K. et El Kebbjaj M. S. Génotoxicité induite par les lipides de moules polluées par des métaux toxiques chez la souris. Effet protecteur de l'extrait de raquette de cactus et l'huile d'argan. 4^{ème} journées internationales d'étude sur les lipides 2009 Casablanca.
- **Boumhras M.**, Nasser B., Essamadi A. K., Bagri A., Creppy E. E. Evaluation de la toxicité des moules issues de Jorf Lasfar et Oualidia sur la moelle osseuse chez le rat. 2^{ème} congrès national Sur l'Amélioration de la Production Agricole, 2008 Settlat.

2- Communications affichées :

- **Boumhras M.**, Nasser B., Cherkaoui-Malki M., Lizard G. Caractérisation des effets cytotoxiques d'extraits lipidiques de moules sauvages issues de la côte atlantique marocaine et de moules européennes destinées à la consommation sur les activités biologiques des cellules β pancréatiques murines (MIN6). XVIII^e Forum des Jeunes Chercheurs. 6 et 7 septembre 2012-Besançon, France.
- **Boumhras M.**, Nasser B., Nury T., Cherkaoui-Malki M., Lizard G. Effect of mussel lipid extracts from different area of the moroccan atlantic coast on the induction of oxidative stress in murine pancreatic beta cells (MIN6): analysis by flow cytometry. Cyto 2012. Juin 2012, Leipzig, Allemagne.

- **Boumhras M.**, cherkaoui-malki M., Basser B. Lizard G. Caractérisation biochimique et incidence d'un extrait lipidique de moules issues de la côte atlantique marocaine sur le métabolisme des cellules bêta-pancréatiques murines. XVe congrès de l'AFC-BVAC/ABCA ,2011 Paris, France.

II- Brevet

- **Boumhras M.**, Amahdar L., Meftah Kadmiri I., Arouch M., Nasser B. et Hilali A. 2011. Method and device for removing phosphorous from the liquid waste of fertilizer-producing units by recovering phosphate crystals. World Intellectual Property Organization (WIPO). **WO/2012/134255**.

II- Publications

- Kahn E, Tissot N, Frère P, Dauphin A, **Boumhras M**, Bachelet CM, Frouin F, Lizard G. Fluorescence excitation analysis by two-photon laser confocal scanning microscopy: a new method to identify fluorescent nanoparticles on histological tissue sections. (**Int J Nanomed 2012: 7 5545–5554**).
- **Boumhras M**, Ouafik S, Nury T, Ragot K, Gresti J, Athias A, Nasser B, Cherkaoui-Malki M, Lizard G. Determination of Heavy Metal Content and Lipid Profiles in Mussel Extracts from Two Sites on the Moroccan Atlantic Coast and Evaluation of Their Biological Activities on MIN6 Pancreatic Cells. (**Environmental Toxicology**, 2012, soumis).
- Nury T, Samadi M.,Varin A, Lopez T, Zarrouk A, **Boumhras M**, Riedinger JM, Masson D, Vejux A, Lizard G. Biological activities of the LXR α and β agonist, 4 β -hydroxycholesterol, and of its isomer, 4 α -hydroxycholesterol, on oligodendrocytes: effects on cell growth and viability, oxidative and inflammatory status (**Biochimie** doi:pii: S0300-9084(12)00472-5. 10.1016/j.biochi.2012.11.013).

Références bibliographiques

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmad, I., I. Mohmood, J. P. Coelho, M. Pacheco, M. A. Santos, A. C. Duarte, and E. Pereira. 2012. Role of non-enzymatic antioxidants on the bivalves' adaptation to environmental mercury: Organ-specificities and age effect in *Scrobicularia plana* inhabiting a contaminated lagoon. *Environ Pollut* 163:218-225.
- Aitio, A., A. Bernard, B. A., Fowler, G. F, and Nordberg. 2007. Chapter 4 - Biological Monitoring and Biomarkers. *Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)*, : 1024.
- Akuyam, S. A., H. S. Isah, and W. N. Ogala. 2007. Evaluation of serum lipid profile of under-five Nigerian children. *Ann Afr Med* 6 (3):119-123.
- Alarcon, C., J. L. Leahy, G. T. Schuppin, and C. J. Rhodes. 1995. Increased secretory demand rather than a defect in the proinsulin conversion mechanism causes hyperproinsulinemia in a glucose-infusion rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 95 (3):1032-1039.
- Ambolet-Camoit, A., L. C. Bui, S. Pierre, A. Chevallier, A. Marchand, X. Coumoul, M. Garlatti, K. Andreau, R. Barouki, and M. Aggerbeck. 2010. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin counteracts the p53 response to a genotoxicant by upregulating expression of the metastasis marker agr2 in the hepatocarcinoma cell line HepG2. *Toxicol Sci* 115 (2):501-512.
- Ambolet-Camoit, A., M. J. Kim, A. Leblanc, and M. Aggerbeck. 2012. Persistent organic pollutants: Role in obesity and the metabolic syndrome *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 47 (4):183–192.
- Amiard, J. C., C. Amiard-Triquet, S. Barka, J. Pellerin, and P. S. Rainbow. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76 (2):160-202.
- Anderson, D. M., J. M. Burkholder, W. P. Cochlan, P. M. Glibert, C. J. Gobler, C. A. Heil, R. Kudela, M. L. Parsons, J. E. Rensel, D. W. Townsend, V. L. Trainer, and G. A. Vargo. 2008. Harmful algal blooms and eutrophication: Examining linkages from selected coastal regions of the United States. *Harmful Algae* 8 (1):39-53.
- Andral, B., and J. Y. Stanisiere. 1998. 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, edited by IFREMER. Toulon, France.
- Andral, B., J. Y. Stanisiere, D. Sauzade, E. Damier, H. Thebault, F. Galgani, and P. Boissery. 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar Pollut Bull* 49 (9-10):704-712.
- Andujar, P., L. Bensefa-Colas, and A. Descatha. 2010. [Acute and chronic cadmium poisoning]. *Rev Med Interne* 31 (2):107-115.
- Artiss, J., and B. Zak. 1997. Measurement of cholesterol concentration. In *Handbook of lipoprotein testing*, edited by N. Rifai, G. Warnick and M. Dominiczak. Washington: AACC Press, 99-114.
- Averna, M. R., G. Marino, M. Labisi, D. Sferrazza, G. Cosenza, G. Lo Cascio, and A. Notarbartolo. 1985. [Determination of LDL cholesterol by a new precipitation method: correlation with the Friedewald equation]. *Boll Soc Ital Biol Sper* 61 (8):1151-1155.
- Baarine, M., K. Ragot, E. C. Genin, H. El Hajj, D. Trompier, P. Andreoletti, M. S. Ghandour, F. Menetrier, M. Cherkaoui-Malki, S. Savary, and G. Lizard. 2009. Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N, 158JP): potential models for the study of peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes. *J Neurochem* 111 (1):119-131.
- Barouki, R. 2011. Endocrinedisruptors and metabolicdiseases. *Médecine & Longévité* 3 (2):61–66.
- Baynes, J. W., and S. R. Thorpe. 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48 (1):1-9.
- Bensefa-Colas, L., P. Andujar, and A. Descatha. 2011. [Mercury poisoning]. *Rev Med Interne* 32 (7):416-424.

- Bernard, C., M. F. Berthault, C. Saulnier, and A. Ktorza. 1999. Neogenesis vs. apoptosis As main components of pancreatic beta cell mass changes in glucose-infused normal and mildly diabetic adult rats. *FASEB J* 13 (10):1195-1205.
- Berne, C. 1975. The metabolism of lipids in mouse pancreatic islets. The oxidation of fatty acids and ketone bodies. *Biochem J* 152 (3):661-666.
- Berridge, M. V., and A. S. Tan. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303 (2):474-482.
- Besada, V., J. Fumega, and A. Vaamonde. 2002. Temporal trends of Cd, Cu, Hg, Pb and Zn in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Spanish North-Atlantic coast 1991-1999. *Sci Total Environ* 288 (3):239-253.
- Bjerknes, R., C. F. Bassoe, H. Sjursen, O. D. Laerum, and C. O. Solberg. 1989. Flow cytometry for the study of phagocyte functions. *Rev Infect Dis* 11 (1):16-33.
- Björk, M., and M. Gilek. 1997. Bioaccumulation kinetics of PCB 31, 49 and 153 in the blue mussel, *Mytilus edulis* L. as a function of algal food concentration. *Aquatic Toxicology* 38 (1-3):101-123.
- Bonfoco, E., D. Krainc, M. Ankarcona, P. Nicotera, and S. A. Lipton. 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (16):7162-7166.
- Bonner-Weir, S. 2000a. Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 24 (3):297-302.
- . 2000b. Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab* 11 (9):375-378.
- . 2001. beta-cell turnover: its assessment and implications. *Diabetes* 50 Suppl 1:S20-24.
- Box, A., A. Sureda, F. Galgani, A. Pons, and S. Deudero. 2007. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146 (4):531-539.
- Boya, P., and G. Kroemer. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27 (50):6434-6451.
- Boyles, A. L., S. F. Harris, A. A. Rooney, and K. A. Thayer. 2011. Forest Plot Viewer: a new graphing tool. *Epidemiology* 22 (5):746-747.
- Brannvall, M. L., R. Bindler, I. Renberg, O. Emteryd, J. Bartnicki, and K. Billstrom. 1999. The Medieval metal industry was the cradle of modern large scale atmospheric lead pollution in northern Europe. *Environmental Science & Technology* 33 (24):4391-4395.
- Brockenbrough, J. S., G. C. Weir, and S. Bonner-Weir. 1988. Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy in rats. *Diabetes* 37 (2):232-236.
- Bunting, J. R., T. V. Phan, E. Kamali, and R. M. Dowben. 1989. Fluorescent cationic probes of mitochondria. Metrics and mechanism of interaction. *Biophys J* 56 (5):979-993.
- Buse, J. B., H. N. Ginsberg, G. L. Bakris, N. G. Clark, F. Costa, R. Eckel, V. Fonseca, H. C. Gerstein, S. Grundy, R. W. Nesto, M. P. Pignone, J. Plutzky, D. Porte, R. Redberg, K. F. Stitzel, and N. J. Stone. 2007. Primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 30 (1):162-172.
- Cantillo, A. Y. 1998. Comparison of results of mussel watch programs of the United States and France with worldwide mussel watch studies. *Marine Pollution Bulletin* 36 (9):712-717.
- Casas, S., and C. Bacher. 2006. Modelling trace metal (Hg and Pb) bioaccumulation in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, applied to environmental monitoring. *Journal of Sea Research* 56 (2):168-181.
- CE. 20.12.2006. RÈGLEMENT (CE) No 1881/2006 DE LA COMMISSION JO L 364, 5.
- Cesaratto, L., C. Vascotto, S. Calligaris, and G. Tell. 2004. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol* 3 (3):86-92.
- Chafik, A., M. Cheggour, D. Cossa, and S. B. M. Sifeddine. 2001. Quality of Moroccan Atlantic coastal waters: water monitoring and mussel watching. *Aquatic Living Resources* 14 (4):239-249.

- Cheggour, M., W. J. Langston, A. Chafik, H. Texier, H. Idrissi, and A. Boumezzough. 1999. Phosphate industry discharges and their impact on metal contamination and intertidal macrobenthos: Jorf Lasfar and Safi coastlines (Morocco). *Toxicological & Environmental Chemistry* 70 (1-2):159-179.
- Chen, L. B. 1988. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol* 4:155-181.
- Chen, Y. W., C. Y. Yang, C. F. Huang, D. Z. Hung, Y. M. Leung, and S. H. Liu. 2009. Heavy metals, islet function and diabetes development. *Islets* 1 (3):169-176.
- Cherin, P., E. Voronska, N. Fraoucene, and C. d. Jaeger. 2012. Acute toxicity of pesticides in human. *Médecine & Longévité* 4 (2):68-74.
- Cho, M. R., J. Y. Shin, J. H. Hwang, D. R. Jacobs, Jr., S. Y. Kim, and D. H. Lee. 2011. Associations of fat mass and lean mass with bone mineral density differ by levels of persistent organic pollutants: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. *Chemosphere* 82 (9):1268-1276.
- Claisse, D. 1989. Chemical contamination of French coasts: The Results of a Ten Years Mussel Watch. *Marine Pollution Bulletin* 20 (10):523-528.
- Claisse, D., M. Joanny, and J. Y. Quintin. 1992. Le réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO). *Analysis* 6:19-23.
- Cofan, M., V. Escurriol, A. L. Garcia-Otin, C. Moreno-Iribas, N. Larranaga, M. J. Sanchez, M. J. Tormo, M. L. Redondo, C. A. Gonzalez, D. Corella, M. Pocovi, F. Civeira, and E. Ros. 2011. Association of plasma markers of cholesterol homeostasis with metabolic syndrome components. A cross-sectional study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21 (9):651-657.
- Dawber, T. R., F. E. Moore, and G. V. Mann. 1957. Coronary heart disease in the Framingham study. *Am J Public Health Nations Health* 47 (4 Pt 2):4-24.
- De Almeida, E. A., A. C. D. Bairy, A. P. M. Loureiro, G. R. Martinez, S. Miyamoto, J. Onuki, L. F. Barbosa, C. C. M. Garcia, F. M. Prado, G. E. Ronsein, C. A. Sigolo, C. B. Brochini, A. M. G. Martins, M. H. G. Medeiros, and P. Di Mascio. 2007. Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 146 (4):588-600.
- Desrumaux, C., P. Y. Risold, H. Schroeder, V. Deckert, D. Masson, A. Athias, H. Laplanche, N. Le Guern, D. Blache, X. C. Jiang, A. R. Tall, D. Desor, and L. Lagrost. 2005. Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. *FASEB J* 19 (2):296-297.
- Dixon, D. R., A. M. Pruski, L. R. Dixon, and A. N. Jha. 2002. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* 17 (6):495-507.
- Dussol, B. 2011. Various stages of the chronic renal insufficiency: Recommendations. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 26 (2):55-59.
- Efanova, I. B., S. V. Zaitsev, B. Zhivotovsky, M. Kohler, S. Efendic, S. Orrenius, and P. O. Berggren. 1998. Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells. A process dependent on intracellular Ca²⁺ concentration. *J Biol Chem* 273 (50):33501-33507.
- Esterbauer, H., R. J. Schaur, and H. Zollner. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11 (1):81-128.
- Fasulo, S., A. Mauceri, A. Giannetto, M. Maisano, N. Bianchi, and V. Parrino. 2008. Expression of metallothionein mRNAs by in situ hybridization in the gills of *Mytilus galloprovincialis*, from natural polluted environments. *Aquat Toxicol* 88 (1):62-68.
- Finn, W. G., A. M. Harrington, K. M. Carter, R. Raich, S. H. Kroft, and A. O. Hero, 3rd. 2011. Immunophenotypic signatures of benign and dysplastic granulopoiesis by cytomic profiling. *Cytometry B Clin Cytom* 80 (5):282-290.
- Flora, S. J. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med* 51 (2):257-281.
- Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226 (1):497-509.
- Forbes, V. E., A. Palmqvist, and L. Bach. 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ Toxicol Chem* 25 (1):272-280.

- Fotakis, G., and J. A. Timbrell. 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 160 (2):171-177.
- Francesconi, A., and R. M. Duvoisin. 1998. Role of the second and third intracellular loops of metabotropic glutamate receptors in mediating dual signal transduction activation. *J Biol Chem* 273 (10):5615-5624.
- Francesconi, K. A. 2007. Toxic metal species and food regulations--making a healthy choice. *Analyst* 132 (1):17-20.
- Galloway, T. S. 2006. Biomarkers in environmental and human health risk assessment. *Mar Pollut Bull* 53 (10-12):606-613.
- Gao, Y. 2010. The multiple actions of NO. *Pflugers Arch* 459 (6):829-839.
- Girard, J. 2005. [Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action. mechanism of beta-cell lipotoxicity]. *Med Sci (Paris)* 21 Spec No:19-25.
- Goldberg, E. D. 1975. The mussel watch. A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 6 (7):111.
- Goldberg, E. D., and K. K. Bertine. 2000. Beyond the Mussel Watch--new directions for monitoring marine pollution. *Sci Total Environ* 247 (2-3):165-174.
- Goodale, B. C., R. Walter, S. R. Pelsue, W. D. Thompson, S. S. Wise, R. N. Winn, H. Mitani, and J. P. Wise, Sr. 2008. The cytotoxicity and genotoxicity of hexavalent chromium in medaka (*Oryzias latipes*) cells. *Aquat Toxicol* 87 (1):60-67.
- Guardiola, F., P. C. Dutta, R. Codony, and G. P. Savage. 2002. *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects*. Champaign (Illinois), USA: AOCS Press.
- Guil-Guerrero, J. L., E. Venegas-Venegas, M. A. Rincon-Cervera, and M. D. Suarez. 2011. Fatty acid profiles of livers from selected marine fish species. *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (2):217-222.
- Hagger, J. A., M. B. Jones, D. Lowe, D. R. Leonard, R. Owen, and T. S. Galloway. 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: a case study. *Mar Pollut Bull* 56 (6):1111-1118.
- Han, J., and K. Burgess. 2010. Fluorescent indicators for intracellular pH. *Chem Rev* 110 (5):2709-2728.
- Hasspieler, B. M., J. V. Behar, and R. T. Digiulio. 1994. Glutathione-Dependent Defense in Channel Catfish (*Ictalurus-Punctatus*) and Brown Bullhead (*Ameriurus-Nebulosus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 28 (1):82-90.
- Hebbel, R. P. 1986. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J Lab Clin Med* 107 (5):401-404.
- Herrera, G., L. Diaz, A. Martinez-Romero, A. Gomes, E. Villamon, R. C. Callaghan, and J. E. O'Connor. 2007. Cytomics: A multiparametric, dynamic approach to cell research. *Toxicol In Vitro* 21 (2):176-182.
- Ho, W. C., W. R. Hartley, L. Myers, M. H. Lin, Y. S. Lin, C. H. Lien, and R. S. Lin. 2007. Air pollution, weather, and associated risk factors related to asthma prevalence and attack rate. *Environ Res* 104 (3):402-409.
- Hong, J., P. B. Jeppesen, and K. Hermansen. 2009. Effects of elevated fatty acid and glucose concentrations on pancreatic islet function in vitro. *Diabetes Obes Metab* 11 (4):397-404.
- Howell, G., 3rd, and L. Mangum. 2011. Exposure to bioaccumulative organochlorine compounds alters adipogenesis, fatty acid uptake, and adipokine production in NIH3T3-L1 cells. *Toxicol In Vitro* 25 (1):394-402.
- Huttemann, M., I. Lee, A. Pecinova, P. Pecina, K. Przyklenk, and J. W. Doan. 2008. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *J Bioenerg Biomembr* 40 (5):445-456.
- IARC. 2010. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. In *Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures* edited by W. H. Organization. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Ishihara, H., T. Asano, K. Tsukuda, H. Katagiri, K. Inukai, M. Anai, M. Kikuchi, Y. Yazaki, J. I. Miyazaki, and Y. Oka. 1993. Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and

- glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* 36 (11):1139-1145.
- Iuliano, L., F. Micheletta, S. Natoli, S. Ginanni Corradini, M. Iappelli, W. Elisei, L. Giovannelli, F. Violi, and U. Diczfalusy. 2003. Measurement of oxysterols and alpha-tocopherol in plasma and tissue samples as indices of oxidant stress status. *Anal Biochem* 312 (2):217-223.
- Jacqueminet, S., I. Briaud, C. Rouault, G. Reach, and V. Poitout. 2000. Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism* 49 (4):532-536.
- Jago, C. 2006. American Diabetes Association--66th scientific sessions. Updates on drug treatments. 9-13 June 2006, Washington, DC, USA. *IDrugs* 9 (8):542-544.
- Jeppesen, J., T. W. Hansen, S. Rasmussen, H. Ibsen, and C. Torp-Pedersen. 2006. Metabolic syndrome, low-density lipoprotein cholesterol, and risk of cardiovascular disease: a population-based study. *Atherosclerosis* 189 (2):369-374.
- Ji, L. L. 1995. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med* 18 (6):1079-1086.
- Johnson, L. L., T. K. Collier, and J. E. Stein. 2002. An analysis in support of sediment quality thresholds for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to protect estuarine fish. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems* 12 (5):517-538.
- Jomova, K., and M. Valko. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283 (2-3):65-87.
- Jones, K. H., and J. A. Senft. 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem* 33 (1):77-79.
- Kachel, V., K. Schedler, H. Schneider, and L. Haack. 1984. "Cytomic" data system modules--modern electronic devices for flow cytometric data handling and presentation. *Cytometry* 5 (3):299-303.
- Kachel, V., H. Schneider, J. Bauer, and J. Malin-Berdel. 1983. Application of the CYTOMIC 12 flow cytometric compact analyzer for automatic kinetic measurements. *Cytometry* 3 (4):244-250.
- Kagley, A. N., R. G. Snider, P. K. Krishnakumar, and E. Casillas. 2003. Assessment of seasonal variability of cytochemical responses to contaminant exposure in the blue mussel *Mytilus edulis* (complex). *Arch Environ Contam Toxicol* 44 (1):43-52.
- Kajimoto, Y., and H. Kaneto. 2004. Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 1011:168-176.
- Kawai, T., H. Hirose, Y. Seto, H. Fujita, and T. Saruta. 2001. Chronic effects of different fatty acids and leptin in INS-1 cells. *Diabetes Res Clin Pract* 51 (1):1-8.
- Kawasaki, E., N. Abiru, and K. Eguchi. 2004. Prevention of type 1 diabetes: from the view point of beta cell damage. *Diabetes Res Clin Pract* 66 Suppl 1:S27-32.
- Kennedy, H. J., I. Rafiq, A. E. Pouli, and G. A. Rutter. 1999. Glucose enhances insulin promoter activity in MIN6 beta-cells independently of changes in intracellular Ca²⁺ concentration and insulin secretion. *Biochem J* 342 (Pt 2):275-280.
- Khatoon, F., Moinuddin, K. Alam, and A. Ali. 2012. Physicochemical and immunological studies on 4-hydroxynonenal modified HSA: Implications of protein damage by lipid peroxidation products in the etiopathogenesis of SLE. *Hum Immunol*.
- Kim, S., D. H. Jun, H. J. Kim, K. C. Jeong, and C. H. Lee. 2011. Development of a high-content screening method for chemicals modulating DNA damage response. *J Biomol Screen* 16 (2):259-265.
- Kim, S. H., and R. P. Sharma. 2003. Cytotoxicity of inorganic mercury in murine T and B lymphoma cell lines: involvement of reactive oxygen species, Ca²⁺ homeostasis, and cytokine gene expression. *Toxicol In Vitro* 17 (4):385-395.
- Kojima, H., K. Sakurai, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, and T. Nagano. 1998. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 46 (2):373-375.
- Koshkin, V., F. F. Dai, C. A. Robson-Doucette, C. B. Chan, and M. B. Wheeler. 2008. Limited mitochondrial permeabilization is an early manifestation of palmitate-induced lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 283 (12):7936-7948.

- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, and G. Melino. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16 (1):3-11.
- Kubisch, H. M., J. Wang, R. Luche, E. Carlson, T. M. Bray, C. J. Epstein, and J. P. Phillips. 1994. Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (21):9956-9959.
- Kueng, W., E. Silber, and U. Eppenberger. 1989. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 182 (1):16-19.
- Kumar, A., and C. Scott Clark. 2009. Lead loadings in household dust in Delhi, India. *Indoor Air* 19 (5):414-420.
- Lang, I. A., T. S. Galloway, A. Scarlett, W. E. Henley, M. Depledge, R. B. Wallace, and D. Melzer. 2008. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 300 (11):1303-1310.
- Larsen, J. K., B. Munch-Petersen, J. Christiansen, and K. Jørgensen. 1986. Flow cytometric discrimination of mitotic cells: Resolution of M, as well as G1, S, and G2 phase nuclei with mithramycin, propidium iodide, and ethidium bromide after fixation with formaldehyde. *Cytometry* 7 (1):54-63.
- Leahy, J. L. 2005. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 36 (3):197-209.
- Lee, D. H., and D. R. Jacobs. 2006. A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002 - Response to Porta. *Diabetes Care* 29 (11):2568-2568.
- Leibowitz, G., E. Bachar, M. Shaked, A. Sinai, M. Ketzinel-Gilad, E. Cerasi, and N. Kaiser. 2010. Glucose regulation of beta-cell stress in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2:66-75.
- Lenzen, S. 2008. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* 36 (Pt 3):343-347.
- Livingstone, D. R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* 42 (8):656-666.
- Lizard, G., S. Fournel, L. Genestier, N. Dhedin, C. Chaput, M. Flacher, M. Mutin, G. Panaye, and J. P. Revillard. 1995. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry* 21 (3):275-283.
- Lizard, G., S. Gueldry, O. Sordet, S. Monier, A. Athias, C. Miguët, G. Bessède, S. Lemaire, E. Solary, and P. Gambert. 1998. Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. *FASEB J* 12 (15):1651-1663.
- Maanan, M. 2008. Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region. *Environ Pollut* 153 (1):176-183.
- Maedler, K., A. Fontana, F. Ris, P. Sergeev, C. Toso, J. Oberholzer, R. Lehmann, F. Bachmann, A. Tassinato, G. A. Spinas, P. A. Halban, and M. Y. Donath. 2002. FLIP switches Fas-mediated glucose signaling in human pancreatic beta cells from apoptosis to cell replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (12):8236-8241.
- Magnan, C., and A. Ktorza. 2005. Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. *EMC-Endocrinologie* 2 (4):241-264.
- Malaisse, W. J., F. Malaisse-Lagae, A. Sener, and C. Hellerstrom. 1985. Participation of endogenous fatty acids in the secretory activity of the pancreatic B-cell. *Biochem J* 227 (3):995-1002.
- Malvitte, L., T. Montange, A. Vejux, C. Joffre, A. Bron, C. Creuzot-Garcher, and G. Lizard. 2008. Activation of a caspase-3-independent mode of cell death associated with lysosomal destabilization in cultured human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) exposed to 7beta-hydroxycholesterol. *Curr Eye Res* 33 (9):769-781.
- Mao, H., D. H. Wang, and W. X. Yang. 2012. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat Toxicol* 110-111:208-213.
- Marchand, M., and R. Kantin. 1997. "Les métaux traces en milieu aquatique." *Océanis* 23 (4):595-629.

- Marigomez, I., and L. Baybay-Villacorta. 2003. Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquat Toxicol* 64 (3):235-257.
- Marigomez, I., X. Lekube, M. P. Cajaraville, G. Domouhtsidou, and V. Dimitriadis. 2005. Comparison of cytochemical procedures to estimate lysosomal biomarkers in mussel digestive cells. *Aquat Toxicol* 75 (1):86-95.
- Marnett, L. J. 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424 (1-2):83-95.
- Massion, P., J.-C. Preiser, and J.-L. Balligand. 2002. Reactive nitrogen species: deleterious or not. *Nutrition clinique et métabolisme* 16:248–252.
- Mattson, M. P. 2009. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol* 44 (10):625-633.
- McLaughlin, M. J., D. R. Parker, and J. M. Clarke. 1999. Metals and micronutrients - food safety issues. *Field Crops Research* 60 (1-2):143-163.
- Michelle Furtado, L., V. Poon, and A. Klip. 2003. GLUT4 activation: thoughts on possible mechanisms. *Acta Physiol Scand* 178 (4):287-296.
- Mittag, A., D. Lenz, J. Bocsi, U. Sack, A. O. Gerstner, and A. Tarnok. 2006. Sequential photobleaching of fluorochromes for polychromatic slide-based cytometry. *Cytometry A* 69 (3):139-141.
- Miyazaki, J., K. Araki, E. Yamato, H. Ikegami, T. Asano, Y. Shibasaki, Y. Oka, and K. Yamamura. 1990. Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127 (1):126-132.
- Mohanty, J. G., J. S. Jaffe, E. S. Schulman, and D. G. Raible. 1997. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *J Immunol Methods* 202 (2):133-141.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 (1-2):55-63.
- Moustaid, K., B. Nasser, I. Baudrimont, R. Anane, M. El Idrissi, A. Bouzidi, and E. E. Creppy. 2005. [Comparative evaluation of the toxicity induced by mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from two sites of the Moroccan Atlantic coast in mice]. *C R Biol* 328 (3):281-289.
- Mueller, S., H. D. Riedel, and W. Stremmel. 1997. Determination of catalase activity at physiological hydrogen peroxide concentrations. *Anal Biochem* 245 (1):55-60.
- Nakari, T., and S. Huhtala. 2008. Comparison of toxicity of congener-153 of PCB, PBB, and PBDE to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (2):514–518.
- Nakatsubo, N., H. Kojima, K. Kikuchi, H. Nagoshi, Y. Hirata, D. Maeda, Y. Imai, T. Irimura, and T. Nagano. 1998. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diamino fluoresceins. *FEBS Lett* 427 (2):263-266.
- Nalbone, G., A. Cicolella, and S. Laot-Cabon. 2011. Human exposition to bisphenol A: An environmental risk factor of metabolic disorders and cardiovascular diseases. *Médecine & Longévité* 3 (1):42-51.
- Nasser, B., K. Moustaid, S. Moukha, T. A. Mobio, A. Essamadi, and E. E. Creppy. 2008. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of extracts of mussels originating from Moroccan Atlantic coast, in human colonic epithelial cells Caco-2. *Environ Toxicol* 23 (4):539-547.
- Nathan, D. M., J. B. Buse, M. B. Davidson, R. J. Heine, R. R. Holman, R. Sherwin, and B. Zinman. 2006. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 29 (8):1963-1972.
- NCEP. 2001. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285 (19):2486-2497.
- Newman, D. J., and C. P. Price. 1999. Renal function and nitrogen metabolites. In *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, edited by E. R. A. Carl A. Burtis, Norbert W. Tietz. Philadelphia: W.B Saunders Company, 1204-1270.

- Nguyen, S. D., M. Baes, and P. P. Van Veldhoven. 2008. Degradation of very long chain dicarboxylic polyunsaturated fatty acids in mouse hepatocytes, a peroxisomal process. *Biochim Biophys Acta* 1781 (8):400-405.
- Nordberg, G. F. 2010. Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China. *Toxicol Lett* 192 (1):45-49.
- Nordberg, G. F., and M. Nordberg. 1987. Different binding forms of cadmium--implications for distribution and toxicity. *J UOEH* 9 Suppl:153-164.
- Nylandsted, J., M. Gyrd-Hansen, A. Danielewicz, N. Fehrenbacher, U. Lademann, M. Hoyer-Hansen, E. Weber, G. Multhoff, M. Rohde, and M. Jaattela. 2004. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med* 200 (4):425-435.
- Nzengue, Y., S. M. Candeias, S. Sauvaigo, T. Douki, A. Favier, W. Rachidi, and P. Guiraud. 2011. The toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: its redox biomarkers. *J Trace Elem Med Biol* 25 (3):171-180.
- Orban, E., G. D. Lena, A. Ricelli, F. Paoletti, I. Casini, L. Gambelli, and R. Caproni. 2000. Quality characteristics of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) from different intensive rearing systems. *Food Chemistry* 70 (1):27-32.
- Orbea, A., and M. P. Cajaraville. 2006. Peroxisome proliferation and antioxidant enzymes in transplanted mussels of four basque estuaries with different levels of polycyclic aromatic hydrocarbon and polychlorinated biphenyl pollution. *Environ Toxicol Chem* 25 (6):1616-1626.
- Ormerod, M. G., M. K. Collins, G. Rodriguez-Tarduchy, and D. Robertson. 1992. Apoptosis in interleukin-3-dependent haemopoietic cells. Quantification by two flow cytometric methods. *J Immunol Methods* 153 (1-2):57-65.
- Ormerod, M. G., X. M. Sun, R. T. Snowden, R. Davies, H. Fearnhead, and G. M. Cohen. 1993. Increased membrane permeability of apoptotic thymocytes: a flow cytometric study. *Cytometry* 14 (6):595-602.
- OSPAR. 2008. Proposal for assessment criteria to be used for the assessment of monitoring data for the concentrations of hazardous substances in marine sediments and biota in the context of QSR 2010. Paper read at Meeting of the Working Group on Monitoring, 24–28 November, at Copenhagen
- International Council for the Exploration of the Sea.
- Patrick, L. 2006. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev* 11 (1):2-22.
- Permutt, M. A., J. Wasson, and N. Cox. 2005. Genetic epidemiology of diabetes. *J Clin Invest* 115 (6):1431-1439.
- Peteiro, L. G., U. Labarta, and M. J. Fernandez-Reiriz. 2007. Variability in biochemical components of the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) cultured after Prestige oil spill. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 145 (4):588-594.
- Pierre, S., A. S. Bats, A. Chevallier, L. C. Bui, A. Ambolet-Camoit, M. Garlatti, M. Aggerbeck, R. Barouki, and X. Coumoul. 2011. Induction of the Ras activator Son of Sevenless 1 by environmental pollutants mediates their effects on cellular proliferation. *Biochem Pharmacol* 81 (2):304-313.
- Podborska, M., A. Sevcikova, J. Trna, P. Dite, A. Lojek, and L. Kubala. 2009. Increased markers of oxidative stress in plasma of patients with chronic pancreatitis. *Neuro Endocrinol Lett* 30 Suppl 1:116-120.
- Poëy, J., and C. Philiber. 2000. Toxicité des métaux. *Revue Française des Laboratoires* 2000 (323):35–43.
- Poitout, V. 2008. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta-cell: myth or reality? *Biochem Soc Trans* 36 (Pt 5):901-904.
- Polis, A. B., N. Abate, A. L. Catapano, C. M. Ballantyne, M. H. Davidson, S. S. Smugar, and A. M. Tershakovec. 2009. Low-density lipoprotein cholesterol reduction and goal achievement with ezetimibe/simvastatin versus atorvastatin or rosuvastatin in patients with diabetes, metabolic syndrome, or neither disease, stratified by National Cholesterol Education Program risk category. *Metab Syndr Relat Disord* 7 (6):601-610.

- Polyzos, S. A., J. Kountouras, G. Deretzi, C. Zavos, and C. S. Mantzoros. 2012. The emerging role of endocrine disruptors in pathogenesis of insulin resistance: a concept implicating nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Mol Med* 12 (1):68-82.
- Pop-Busui, R., A. Sima, and M. Stevens. 2006. Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev* 22 (4):257-273.
- Proctor, D. M., J. M. Otani, B. L. Finley, D. J. Paustenbach, J. A. Bland, N. Speizer, and E. V. Sargent. 2002. Is hexavalent chromium carcinogenic via ingestion? A weight-of-evidence review. *J Toxicol Environ Health A* 65 (10):701-746.
- Pytharopoulou, S., E. Sazakli, K. Grintzalis, C. D. Georgiou, M. Leotsinidis, and D. L. Kalpaxis. 2008. Translational responses of *Mytilus galloprovincialis* to environmental pollution: Integrating the responses to oxidative stress and other biomarker responses into a general stress index. *Aquatic Toxicology* 89 (1):18-27.
- Raftopoulou, E. K., and V. K. Dimitriadis. 2010. Assessment of the health status of mussels *Mytilus galloprovincialis* along Thermaikos Gulf (Northern Greece): an integrative biomarker approach using ecosystem health indices. *Ecotoxicol Environ Saf* 73 (7):1580-1587.
- . 2012. Aspects of the digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, in relation to lysosomal enzymes, lipofuscin presence and shell size: contribution in the assessment of marine pollution biomarkers. *Mar Pollut Bull* 64 (2):182-188.
- Rahman, F., K. H. Langford, M. D. Scrimshaw, and J. N. Lester. 2001. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Sci Total Environ* 275 (1-3):1-17.
- Rahman, M. A., H. Hasegawa, and R. P. Lim. 2012. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. *Environ Res* 116:118-135.
- Rainbow, P. S., W. Fialkowski, A. Sokolowski, B. D. Smith, and M. Wolowicz. 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. *Marine Biology* 144 (2):271-286.
- Regoli, F. 1998. Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Environ Contam Toxicol* 34 (1):48-63.
- Repnik, U., and B. Turk. 2010. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion* 10 (6):662-669.
- Rifa, N., P. Bachorik, and J. Albers. 1999. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. . In *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, edited by B. CA and A. ER. Philadelphia: W.B Saunders Company, 809.
- Riginos, C., and C. W. Cunningham. 2005. Local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis* x *Mytilus trossulus*) hybrid zones. *Mol Ecol* 14 (2):381-400.
- Romeo, M., P. Hoarau, G. Garello, M. Gnassia-Barelli, and J. P. Girard. 2003. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environ Pollut* 122 (3):369-378.
- Rothe, G., A. Oser, and G. Valet. 1988. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 75 (7):354-355.
- Rothe, G., and G. Valet. 1990. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* 47 (5):440-448.
- . 1994. Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes. *Methods Enzymol* 233:539-548.
- Royer, M., C. Castelo-Branco, J. E. Blumel, P. A. Chedraui, L. Danckers, A. Bencosme, D. Navarro, S. Vallejo, M. T. Espinoza, G. Gomez, H. Izaguirre, F. Ayala, M. Martino, E. Ojeda, W. Onatra, J. Saavedra, K. Tserotas, E. Pozzo, V. Manriquez, M. Prada, E. Grandia, C. Zuniga, D. Lange, and F. Sayegh. 2007. The US National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III): prevalence of the metabolic syndrome in postmenopausal Latin American women. *Climacteric* 10 (2):164-170.
- Rutter, G. A., and L. E. Parton. 2008. The beta-cell in type 2 diabetes and in obesity. *Front Horm Res* 36:118-134.

- Saitoh, Y., W. Hongwei, H. Ueno, M. Mizuta, and M. Nakazato. 2009. Telmisartan attenuates fatty-acid-induced oxidative stress and NAD(P)H oxidase activity in pancreatic beta-cells. *Diabetes Metab* 35 (5):392-397.
- Sampson, S. R., E. Bucris, M. Horovitz-Fried, A. Parnas, S. Kahana, G. Abitbol, M. Chetboun, T. Rosenzweig, C. Brodie, and S. Frankel. 2010. Insulin increases H₂O₂-induced pancreatic beta cell death. *Apoptosis* 15 (10):1165-1176.
- Sandhu, L. C., R. L. Wartens, and L. A. Dethlefsen. 1985. Fluorescence studies of Hoechst 33342 with supercoiled and relaxed plasmid pBR322 DNA. *Cytometry* 6 (3):191-194.
- Savary, S., D. Trompier, P. Andreoletti, F. Le Borgne, J. Demarquoy, and G. Lizard. 2012. Fatty acids-induced lipotoxicity and inflammation. *Curr Drug Metab.*
- Schlattner, U., M. Dolder, T. Wallimann, and M. Tokarska-Schlattner. 2001. Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *J Biol Chem* 276 (51):48027-48030.
- Schrader, M., and H. D. Fahimi. 2008. The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol* 129 (4):421-440.
- Shahidul Islam, M., and M. Tanaka. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar Pollut Bull* 48 (7-8):624-649.
- Sharma, R. K., V. N. Singh, and H. K. Reddy. 2009. Thinking beyond low-density lipoprotein cholesterol: strategies to further reduce cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag* 5:793-799.
- Sharma, V. K., and M. Sohn. 2009. Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environ Int* 35 (4):743-759.
- Singh, J., D. L. Carlisle, D. E. Pritchard, and S. R. Patierno. 1998. Chromium-induced genotoxicity and apoptosis: relationship to chromium carcinogenesis (review). *Oncol Rep* 5 (6):1307-1318.
- Smith, V. H. 2003. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem. *Environ Sci Pollut Res Int* 10 (2):126-139.
- Sourirajan, S. 1963. Mechanism of Demineralization of Aqueous Sodium Chloride Solutions by Flow, under Pressure, through Porous Membranes. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals* 2 (1):51-55.
- Steinkamp, J. A., Y. E. Valdez, and B. E. Lehnert. 2000. Flow cytometric, phase-resolved fluorescence measurement of propidium iodide uptake in macrophages containing phagocytized fluorescent microspheres. *Cytometry* 39 (1):45-55.
- Storey, K. B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res* 29 (12):1715-1733.
- Supale, S., N. Li, T. Brun, and P. Maechler. 2012. Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab* 23 (9):477-487.
- Sureda, A., A. Box, S. Tejada, A. Blanco, J. Caixach, and S. Deudero. 2011. Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain). *Aquat Toxicol* 101 (3-4):540-549.
- Swenne, I. 1992. Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus. *Diabetologia* 35 (3):193-201.
- Szinicz, L., and W. Forth. 1988. Effect of As₂O₃ on gluconeogenesis. *Arch Toxicol* 61 (6):444-449.
- Tarnok, A. 2004. New technologies for the human cytochrome project. *J Biol Regul Homeost Agents* 18 (2):92-95.
- Templeton, D. M., and M. G. Cherian. 1991. Toxicological significance of metallothionein. *Methods Enzymol* 205:11-24.
- Tett, P., R. Gowen, D. Mills, T. Fernandes, L. Gilpin, M. Huxham, K. Kennington, P. Read, M. Service, M. Wilkinson, and S. Malcolm. 2007. Defining and detecting undesirable disturbance in the context of marine eutrophication. *Mar Pollut Bull* 55 (1-6):282-297.
- Thayer, K. A., J. J. Heindel, J. R. Bucher, and M. A. Gallo. 2012. Role of Environmental Chemicals in Diabetes and Obesity: A National Toxicology Program Workshop Review. *Environ Health Perspect* 120 (6).
- Thomas, L. 1998. Clinical Laboratory Diagnostics. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft, 208-214

- Toyokuni, S., N. Miyake, H. Hiai, M. Hagiwara, S. Kawakishi, T. Osawa, and K. Uchida. 1995. The monoclonal antibody specific for the 4-hydroxy-2-nonenal histidine adduct. *FEBS Lett* 359 (2-3):189-191.
- Travlos, G. S., R. W. Morris, M. R. Elwell, A. Duke, S. Rosenblum, and M. B. Thompson. 1996. Frequency and relationships of clinical chemistry and liver and kidney histopathology findings in 13-week toxicity studies in rats. *Toxicology* 107 (1):17-29.
- Trinder, P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol* 22 (2):158-161.
- Tsujimoto, Y., and S. Shimizu. 2007. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* 12 (5):835-840.
- Tuo, Y., D. Wang, S. Li, and C. Chen. 2011. Long-term exposure of INS-1 rat insulinoma cells to linoleic acid and glucose in vitro affects cell viability and function through mitochondrial-mediated pathways. *Endocrine* 39 (2):128-138.
- Uemura, H., K. Arisawa, M. Hiyoshi, A. Kitayama, H. Takami, F. Sawachika, S. Dakeshita, K. Nii, H. Satoh, Y. Sumiyoshi, K. Morinaga, K. Kodama, T. Suzuki, M. Nagai, and T. Suzuki. 2009. Prevalence of Metabolic Syndrome Associated with Body Burden Levels of Dioxin and Related Compounds among Japan's General Population. *Environmental Health Perspectives* 117 (4):568-573.
- UNEP. 2002. Chemicals. Global Mercury Assessment, edited by U. N. E. Programme. Geneva, 266.
- Vaidya, O. C., and R. T. T. Rantala. 1996. A Comparative Study of Analytical Methods: Determination of Heavy Metals in Mussels (MYTILUS EDULIS) from Eastern Canada. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 63 (3):179-185
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, and J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39 (1):44-84.
- Valko, M., H. Morris, and M. T. Cronin. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12 (10):1161-1208.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160 (1):1-40.
- Vejux, A., and G. Lizard. 2009. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol Aspects Med* 30 (3):153-170.
- Vincent, J. B. 2010. Chromium: celebrating 50 years as an essential element? *Dalton Trans* 39 (16):3787-3794.
- Vlahogianni, T., M. Dassenakis, M. J. Scoullou, and A. Valavanidis. 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar Pollut Bull* 54 (9):1361-1371.
- Wanders, R. J., and H. R. Waterham. 2006. Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim Biophys Acta* 1763 (12):1707-1720.
- Wells, P. G., T. Hofer, and M. Nauke. 1999. Evaluating the hazards of harmful substances carried by ships: the role of GESAMP and its EHS working group. *Sci Total Environ* 237-238:329-350.
- Yuan, X. M., W. Li, H. Dalen, J. Lotem, R. Kama, L. Sachs, and U. T. Brunk. 2002. Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (9):6286-6291.
- Zangar, R. C., D. R. Davydov, and S. Verma. 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology* 199 (3):316-331.
- Zhai, S., L. Yang, and W. Hu. 2009. Observations of atmospheric nitrogen and phosphorus deposition during the period of algal bloom formation in northern Lake Taihu, China. *Environ Manage* 44 (3):542-551.
- Zhou, M., Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, and R. P. Haugland. 1997. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem* 253 (2):162-168.

