Etude de la pollution marine par les hydrocarbures et caractérisation de leurs effets biochimiques et moléculaires sur la palourde de Ruditapes sp.

Houssem Chalghmi

▶ **To cite this version:**

Houssem Chalghmi. Etude de la pollution marine par les hydrocarbures et caractérisation de leurs effets biochimiques et moléculaires sur la palourde de Ruditapes sp.. Géochimie. Université de Bordeaux; Université de Monastir (Tunisie), 2015. Français. NNT : 2015BORD0175 . tel-01583022

HAL Id: tel-01583022

https://theses.hal.science/tel-01583022

Submitted on 6 Sep 2017

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.

THÈSE EN COTUTELLE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ET DE L'UNIVERSITÉ DE MONASTIR

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES BIOLOGIQUES, BIOTECHNOLOGIE ET SANTÉ

SPÉCIALITÉ : GÉOCHIMIE ET ÉCOTOXICOLOGIE

Par **Houssem CHALGHMI**

ÉTUDE DE LA POLLUTION MARINE PAR LES HYDROCARBURES ET CARACTÉRISATION DE LEURS EFFETS BIOCHIMIQUES ET MOLÉCULAIRES SUR LA PALOURDE *RUDITAPES SP.*

Sous la direction de : Jean-Paul BOURDINEAUD et Dalila SAIDANE-MOSBAHI

Soutenue le 06 octobre 2015

Membres du jury :

M. BOUSSETTA, Hamadi	Professeur, Université de Sousse	Président
Mme MOUNEYRAC, Catherine	Professeur, Université Catholique de l'Ouest	Rapporteur
M. BANNI, Mohamed	Professeur, Université de Monastir	Rapporteur
Mme GIAMBÉRINI, Laure	Professeur, Université de Lorraine	Examinatrice
M. BOURDINEAUD, Jean-Paul	Professeur, Université de Bordeaux	Directeur de thèse
Mme SAIDANE-MOSBAHI, Dalila	Professeur, Université de Monastir	Directrice de thèse

Titre : Étude de la pollution marine par les hydrocarbures et caractérisation de leurs effets biochimiques et moléculaires sur la palourde *Ruditapes sp*.

Résumé :

Dans notre étude, la biosurveillance de la lagune de Tunis a été réalisée durant une année en employant une approche combinant les analyses chimiques et biologiques et en utilisant la palourde *Ruditapes decussatus* comme espèce bioindicatrice. Cette approche a permis de mettre en évidence la forte contamination de la lagune de Tunis par les métaux traces et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). La variation saisonnière des niveaux de bioaccumulation de ces contaminant par la palourde s'avère être fortement associée aux changements des paramètres physico-chimiques du milieu et aux processus physiologiques de l'animal. L'étude de la réponse biologique basée sur l'utilisation d'une batterie de biomarqueurs d'exposition et d'effet situés à différents niveaux de l'organisation biologique : moléculaire (l'expression de cinq gènes d'intérêt), biochimique (les activités benzo(a)pyrène hydroxylase, glutathion S-transférase, acétylcholinestérase, catalase et taux de malondialdéhyde) et tissulaire (altérations histopathologiques), a permis de mettre en évidence une modulation des processus de défense contre les perturbations induites par la pollution et l'identification des altérations histopathologiques (structurales) au niveau des branchies et de la glande digestive impliquant un impact sévère des contaminants sur l'état de santé de la palourde. L'étude des interactions spatio-temporelles entre les facteurs abiotiques et biotiques a permis d'identifier la température et la reproduction comme paramètres principaux affectant la réponse biochimique de défense et d'effet. L'analyse en composante principale (ACP), regroupant tous les paramètres analysés pendant le printemps, nous a permis d'identifié le site Z2 comme le site le plus affecté par la pollution. Dans un second temps, le benzo(a)pyrène (BaP), déjà identifié dans la lagune de Tunis, a été employé dans des conditions contrôlées au laboratoire afin de caractériser les réponses moléculaires et biochimiques chez les bivalves (*Ruditapes philippinarum* et *Crassostrea gigas*) face à des expositions subaiguës et aiguës à ce contaminant. Cette étude nous a permis d'identifier une modulation des biomarqueurs biochimiques de métabolisation, de stress oxydant et de neurotoxicité et de l'expression des gènes impliqués dans les processus de métabolisation, de respiration mitochondriale, de défense antioxydante, de reproduction et de défense immunitaire. L'analyse de l'altération de l'ADN a révélé un pouvoir génotoxique précoce et élevé du BaP chez les deux bivalves.

Mots-clés : Lagune de Tunis, bivalves, HAPs, métaux, benzo(a)pyrène, marqueurs biochimiques, histologie, réponse transcriptomique, génotoxicité.

Title : Study of the marine pollution by hydrocarbons and characterization of their biochemical and molecular effects on clam *Ruditapes sp.*

Abstract :

Firstly, biomonitoring of Tunis lagoon was conducted during one year using an approach combining chemicals and biological analyses and the bioindicator species *Ruditapes decussatus*. This approach highlighted the high contamination of the Tunis lagoon by trace metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Seasonal variation of contaminant bioaccumulation levels in clam was found to be strongly associated with physicochemical changes in surrounding environment and physiological processes in organism. Biological responses investigated through a battery of exposure and effect biomarkers located at different levels of biological organisation: molecular (expression of five genes), biochemical (benzo(a)pyrene hydroxylase, glutathione S-transferase, acetylcholinesterase and catalase activities and malondialdehyde concentration) and tissular (histopathological damages), demonstrated a defense process modulation by pollution and showed histopathological alterations in gills and digestive gland involving severe impact of contaminants on health state of clam. The study of spatiotemporal interactions between abiotic and biotic factors identified temperature and reproduction as main parameters affecting defense and effect biochemical response. The principal component analysis (PCA), using all analyzed parameters during the spring, allowed to identify site Z2 as the most affected by pollution. Secondly, benzo(a)pyrene (BaP), already identified in Tunis lagoon, was used in controlled conditions at the laboratory in order to characterize the molecular and biochemical responses in bivalves (*Ruditapes philippinarum* and *Crassostrea gigas*) facing a subacute and acute exposures to this contaminant. This study showed a modulation of biochemical biomarkers of metabolism, oxidative stress and neurotoxicity and expression of genes involved in process of metabolisation, mitochondrial respiration, antioxidant defense, reproduction and immune defense. The analysis of DNA damages revealed a high and early genotoxicity effect of BaP in both bivalves.

Keywords: Tunis lagoon, bivalves, PAHs, metals, benzo(a)pyrene, biochemical biomarkers, histology, transcriptomic response, génotoxicity.

UMR CNRS 5805 EPOC, Équipe Écotoxicologie Aquatique, Station Marine d'Arcachon, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France.

Laboratoire d'Analyse, Traitement et Valorisation des Polluants de l'Environnement et des Produits, Faculté de Pharmacie, Université de Monastir, 5000 Monastir, Tunisie.

Dédicaces

A mes très chers parents Hatem et Nourhène

Qui par leur bonne volonté, leur patience, leurs conseils pertinents, leur assistance, m'ont aidé et m'ont soutenue tant sur le plan moral que financier pour voir se réaliser un de leurs vœux les plus chers. Sans leur soutien permanent cette thèse n'aurait pas pu voir le jour. J'aimerais vous remercier pour votre confiance en moi, votre encouragement, pour tous les efforts et les sacrifices que vous avez faits pour que je devienne ce que je suis. Puisse Dieu vous préserver en bonne santé et vous accorder bonheur et longue vie.

A ma chère fiancée Siwar

Pour ton amour, soutien, disponibilité et ta compréhension. Merci de m'avoir aidé dans les moments difficiles, tes encouragements m'ont été d'une grande rescousse. L'ampleur de tes sacrifices n'a d'égal que la grandeur de tes sentiments. Puisse ce travail te témoigner mon immense gratitude et surtout mon éternel amour.

A mes chers frères Zied, Mahmoud et Achraf

Pour votre encouragement et votre présence morale. Je vous souhaite un grand avenir et une vie prospère et rayonnante.

A la mémoire de mes grands pères

A toute la famille CHALGHMI et BEN KAHLA

A ma belle famille SANDID

Aimablement
Houssem

Remerciements

Ce travail a été réalisé en cotutelle internationale entre l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir (Université de Monastir) et l'Université de Bordeaux au sein du Laboratoire d'Analyse, Traitement et Valorisation des Polluants de l'Environnement et des Produits à la Faculté de Pharmacie de Monastir et de l'UMR CNRS 5805 EPOC-Station Marine d'Arcachon.

J'exprime toute ma gratitude à ma directrice de thèse, Madame le Professeur **Dalila Saidane-Mosbahi**, je vous remercie de m'avoir proposé un sujet de Master, de l'avoir transformé en sujet de thèse et pour avoir encadré mes travaux jusqu'à leurs aboutissements, pour m'avoir fait partager sa passion pour la recherche, son ouverture d'esprit et sa rigueur scientifique durant toutes ces années passées à ses côtés. Merci de m'avoir fait confiance en me permettant de présenter mes travaux au cours de différents congrès, de co-encadrer différents travaux de recherches et de mener différentes collaborations scientifiques. Vous étiez toujours à mes cotés pour me soutenir sans cesse et me redonner courage et force. J'espère que je serai à la hauteur de vos attentes et de votre confiance.

Je voudrais exprimer aussi ma gratitude à mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur **Jean-Paul Bourdineaud**, merci pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Merci également de m'avoir encadré, accordé du temps et donné de si précieux conseils. Je vous remercie pour m'avoir donné l'occasion de bénéficier de votre grande expérience. Merci de m'avoir fait confiance.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Hamadi Boussetta** pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse et pour ses conseils et son attitude bienveillante. Qu'il agrée ma profonde gratitude et toute mon estime.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame le Professeur **Catherine Mouneyrac** et Monsieur le Professeur **Mohamed Banni** pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse et ce malgré leurs engagements et les contraintes de temps et de délais. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie également Madame le Professeur **Laure Giambérini** d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse en tant qu'examinatrice. Qu'elle trouve ici l'expression de mon immense estime.

Je remercie Dr. **Ines Zrafi** pour son aide, ses conseils et ses encouragements. Elle a toujours fait preuve à mon égard de compréhension de respect et de confiance, et elle m'a été proche par ses conseils et son soutien scientifique et moral. Merci pour votre soutien dans les moments difficiles. Je suis particulièrement reconnaissant envers toi.

Je tiens à remercier Pr. **Antoine Grémare**, directeur de l'UMR EPOC 5805, Pr. **Frédéric Garabetian**, directeur de la Station marine d'Arcachon, ainsi que Dr. **Jean-Charles Massabuau**, directeur de l'équipe Ecotoxicologie Aquatique, pour m'avoir accueillie dans ce laboratoire et m'avoir donné la chance de d'accomplir ce travail.

Je voudrais remercier Pr. **Amina Bakhrouf**, directrice du Laboratoire d'Analyse, Traitement et Valorisation des Polluants de l'Environnement et des Produits, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, je la remercie de bien vouloir malgré ces occupations suivre l'évolution de mes activités durant les réunions de laboratoire et de résoudre mes problèmes financiers.

Je tiens particulièrement à remercier **Pr. Hassan Er-Raioui**, Responsable de l'équipe de recherche en Géosciences et Environnement FST – Tanger, pour l'occasion qu'il m'a offert pour réaliser les analyses chimiques des hydrocarbures. Je remercie au travers votre personne toute l'équipe de recherche : **Saida Bouzid**, **Ikram Chbani** et **Soumaya Chouikha**. Je vous remercie pour votre précieuse aide.

Je tiens également à remercier Dr. **Zohra Haouas** pour son accueil chaleureux, sa gentillesse, sa disponibilité et pour l'occasion qu'elle m'a offerte pour profiter de ces compétences dans le domaine de l'histologie.

Merci à Dr. **Hamadi Guerbej** pour toute l'aide qu'il m'a apportée pendant la réalisation de mes activités de recherche sur les palourdes.

Mes remerciements vont également à l'ensemble de l'équipe Ecotoxicologie Aquatique de la Station marine d'Arcachon, avec une attention particulière pour Dr. **Damien Tran** pour ces précieux conseils et réponses à toutes mes questions et Dr. **Mohamedou Sow** pour son aide en statistique et ses précieuses et aimables discussions.

Merci également à **Patrice Gonzalez**, **Alexia legeay**, **Magalie Baudrimont**, **Angés Feurtet-Mazel**, **Fabien Pierron**, **Pierre Ciret**, **Régine Maury-Brachet**, **Nathalie Mesmer-Dudons** et **Cerise**, ainsi qu'à l'ensemble de l'équipe Ecotoxicologie Aquatique. Merci également à **Sabrina** et l'ensemble de l'équipe ECOBIOC.

Je tiens aussi à remercier **Bruno Etcheverria** pour sa précieuse aide pour la mise en place et l'installation de mes expérimentations. Merci à **Florence Daniel** pour son aide et sa gentillesse, tu as toujours été présente pour moi et pour tous les étudiants. Un grand Merci aussi à **Catherine Charlot** pour ton aide avec les bons de commandes et les livraisons.

La réalisation de cette thèse n'aurait pas été la même sans la présence et le soutien de tous ceux qui m'ont accompagné à la station marine d'Arcachon et dans le bureau des thésards, un grand merci à **Adeline**, **Audery**, **Hugues**, **Amina**, **Mohcine**, **Pierre-Yves**, **Lucie** et **Laura** pour votre gentillesse, bonne humeur, disponibilité et surtout votre aide.

Je remercie aussi les membres de notre groupe de recherche à la Faculté de Pharmacie de Monastir, Monsieur **Hassen Ben Abdennebi**, **Asma**, **Faika**, **Kaouthar**, **Chalbia**, **Rahma**, **Raouf**, **Amine**, **Nacira**, **Rafika**, ainsi que mes collègues au labo LATVPEP, **Sadok** et **Rihab**, merci pour nos précieuses discussions et pour la bonne ambiance. Je n'oublierai jamais les merveilleux moments que j'ai passés en votre compagnie au laboratoire.

Au terme de ce travail, je tiens à adresser mes vifs remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de prés ou de loin à sa réalisation par leur soutien scientifique ou moral.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

A. La mer Méditerranée: Un écosystème menacé 7
1. CARACTERISTIQUES DU BASSIN MEDITERRANEEN 7
2. LES LAGUNES COTIERES MEDITERRANEENNES 8
2.1. Généralités 8
2.2. Les écosystèmes lagunaires en Tunisie 9
3. PRESSIONS ANTHROPIQUES SUR LA MEDITERRANEE ET SES ECOSYSTEMES LAGUNAIRES 10
3.1. Les facteurs anthropiques de la pollution méditerranéenne 11
3.1.1. Littoralisation, urbanisation et industrialisation 11
3.1.2. Tourisme 13
3.1.3. Agriculture, pêche et aquaculture 13
3.1.4. Trafic maritime 14

B. Polluants majeurs en Méditerranée: Les hydrocarbures et les métaux lourds 16
1. LES HYDROCARBURES 16
1.1. Composition chimique des hydrocarbures 16
1.2. Sources des hydrocarbures en milieu marin 19
1.2.1. Origines naturelles des hydrocarbures en milieu marin 20
1.2.2. Origine anthropique des hydrocarbures 20
1.2.2.1. Sources pyrolytiques 20
1.2.2.2. Sources pétrogéniques 21
1.3. Devenir des hydrocarbures en milieu marin 22
1.3.1. Dégradation abiotique 22
1.3.2. Facteurs biologiques 23
1.4. Conséquences de la pollution marine par les hydrocarbures sur la biocénose 25
1.5. Contamination des bivalves par les hydrocarbures 26
1.5.1. Biodisponibilité des hydrocarbures 26
1.5.2. Accumulation des hydrocarbures chez les bivalves 27
1.5.3. Les facteurs influençant le mécanisme d'accumulation 28
1.6. Biotransformation des hydrocarbures 29
1.6.1. La fonctionnalisation ou phase I 29
1.6.2. La conjugaison ou phase II 30
1.6.3. La phase III 30
1.7. Outils d'identification des sources des hydrocarbures: approche moléculaire 31
1.8. Composé utilisé durant l'approche expérimentale : Le benzo(a)pyrène 32
2. LES METAUX LOURDS 34
2.1. Caractéristiques des métaux et leurs sources en Méditerranée 34
2.2. Spéciation et biodisponibilité des métaux en milieu aquatique 35

2.3. Transfert des métaux vers les organismes aquatiques 36
2.3.1. Métaux dissous 36
2.3.2. Métaux particulaires 37
2.4. Mécanismes de détoxication des métaux 38
2.5. Voies d'élimination des métaux 39

C. Moyens d'évaluation de la pollution et de son impact sur l'environnement marin 40
1. APPROCHE CHIMIQUE 41
2. APPROCHE BIOLOGIQUE 42
2.1. Notion de biomarqueurs 42
2.2. Les biomarqueurs étudiés 44
2.2.1. Les marqueurs biochimiques 44
2.2.1.1. La benzo(a)pyrène hydroxylase : biomarqueur de phase I de métabolisation 44
2.2.1.2. Les glutathion *S*-transférases (GST) : biomarqueurs de phase II de métabolisation 45
2.2.1.3. Les biomarqueurs de stress oxydant 46
2.2.1.3.1. Le stress oxydant 46
2.2.1.3.2. Les catalases 48
2.2.1.3.3. La peroxydation lipidique 48
2.2.1.4. L'acétylcholinestérase : biomarqueur de neurotoxicité 50
2.2.2. La génotoxicité 52
2.2.3. La réponse transcriptomique à la contamination 56
2.2.4. Les réponses histopathologiques 58

CHAPITRE II : BASES METHODOLOGIQUES

A. Modèles biologiques utilisés 61
1. CHOIX DES ESPECES 61
2. LES PALOURDES : *R. DECUSSATUS* ET *R. PHILIPPINARUM* 62
2.1. Morphologie et taxonomie des palourdes 62
2.2. Anatomie 63
2.3. Alimentation 64
2.4. Croissance 64
2.5. Reproduction 65
2.6. Biotope et répartition géographique 65
3. L'HUITRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS* 66
3.1. Morphologie et taxonomie de l'huître 66
3.2. Anatomie 67
3.3. Alimentation 68
3.4. Reproduction 68
3.5. Biotope et répartition géographique 68

B. Approche de terrain (*in situ*) 69
1. PRESENTATION DU SITE D'ETUDE 69
1.1. Situation géographique de la lagune de Tunis 69
1.2. Environnement sédimentaire 69
1.3. Sources de pollution et aménagement de la lagune 70
2. LOCALISATION DES STATIONS D'ECHANTILLONNAGE 71
3. STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS 73

3.1. Collecte des palourdes *R. decussatus* 74
3.2. Echantillonnage des sédiments 74
3.3. Détermination des paramètres physico-chimique de l'eau de mer 74

C. Approche expérimentale (*in vivo*) 75
1. COLLECTE ET CONDITIONNEMENT DES BIVALVES 75
2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL 76
2.1. Expérimentation n°1 : Contamination des palourdes par le BaP via la voie trophique 76
2.1.1. Culture et contamination d'algues *Isochrisis galbana* 76
2.1.2. Exposition des palourdes aux microalgues prétraitées 76
2.2. Expérimentation n°2 : Exposition des palourdes à des concentrations chroniques de BaP via l'eau de mer 77
2.3. Expérimentation n°3 : Exposition des palourdes à des concentrations aigües de BaP via l'eau de mer 78
2.4. Expérimentation n°4 : Etude cinétique de l'exposition des palourdes au BaP 78
2.5. Expérimentation n°5 : Exposition des huîtres à l'eau de mer contaminée par le BaP 78
2.6. Dissection des bivalves 79

D. Analyses chimiques 80
1. PRETRAITEMENT DES ECHANTILLONS DES SEDIMENTS ET DES TISSUS MOUS 80
2. DETERMINATION DES TENEURS EN HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAPs) 80
2.1. Extraction des hydrocarbures à partir de l'eau de mer 80
2.2. Extraction des hydrocarbures à partie des matrices solides 81
2.2.1. Extraction à partir des sédiments 81
2.2.2. Extraction à partir des tissues biologiques 81
2.3. Fractionnement des hydrocarbures 84
2.4. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) 85
3. DETERMINATION DES TENEURS EN METAUX TRACES 86
3.1. Minéralisation des échantillons 86
3.2. Dosage des métaux 86

E. Analyse des biomarqueurs 88
1. DOSAGE DES MARQUEURS BIOCHIMIQUES 89
1.1. Préparation de l'extrait brut 89
1.2. Dosage des protéines totales 89
1.3. Dosage de l'activité enzymatique spécifique de l'acétylcholinestérase 90
1.3.1. Principe 90
1.3.2. Mesure de l'activité enzymatique 90
1.4. Dosage de l'activité enzymatique spécifique des catalases 91
1.4.1. Principe 91
1.4.2 Mesure de l'activité enzymatique 92
1.5. Dosage de l'activité enzymatique spécifique des glutathion S-transférases 92
1.5.1. Principe 92
1.5.2. Mesure de l'activité enzymatique 93
I.6. Dosage de l'activité enzymatique spécifique de la benzo(a)pyrène hydroxylase 94
I.6.1. Principe 94
1.6.2. Préparation de la fraction microsomale 94

1.6.3. Mesure de l'activité enzymatique 95
1.7. Dosage du taux d'accumulation du malondialdéhyde 95
1.7.1. Principe 95
1.7.2. Mesure du taux de malondialdéhyde 95
2. ANALYSE DE L'EXPRESSION GENETIQUE 96
2.1. Principe de la qPCR en temps réel 98
2.2. Extraction des ARN totaux 100
2.3. La rétro-transcription en ADNc 100
2.4. La PCR quantitative en temps réel 101
3. EVALUATION DES ALTERATIONS DE L'ADN PAR LA TECHNIQUE RAPD-QPCR 105
3.1. Extraction de l'ADN génomique 105
3.2. RAPD-PCR en temps réel 106
4. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES 108
5. ANALYSES STATISTIQUES 110

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

A. Approche *in situ* : Combinaison des approches chimique et biologique pour la biosurveillance de la lagune de Tunis 111
1. INTRODUCTION 111
2. LES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EAU DE MER 112
3. CONTAMINATION DE LA LAGUNE DE TUNIS PAR LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAPs) 115
3.1. Distribution des HAPs dans l'eau de mer 115
3.2. Distribution des HAPs dans les sédiments 116
3.3. Accumulation des HAPs dans les tissus de *Ruditapes decussatus* 119
4. CONTAMINATION METALLIQUE DANS LA LAGUNE DE TUNIS 123
4.1. Distribution des métaux traces dans les sédiments 123
4.2. Accumulation des métaux traces dans les tissus de *Ruditapes decussatus* 125
5. ETUDE DA LA VARIABILITE SPATIO-TEMPORELLE DES BIOMARQUEURS BIOCHIMIQUES CHEZ *RUDITAPES DECUSSATUS* 127
5.1. Evaluation des marqueurs biochimiques au niveau des branchies de *R. decussatus* 127
5.1.1. L'activité glutathion S-transférase (GST) : biomarqueur de métabolisation 127
5.1.2. Les biomarqueurs de stress oxydant 128
5.1.3. L'activité acétylcholinestérase (AChE) : biomarqueur de neurotoxicité 130
5.2. Evaluation des marqueurs biochimiques au niveau de la glande digestive de *R. decussatus* 131
5.2.1. Les biomarqueurs de métabolisation 131
5.2.2. Les biomarqueurs de stress oxydant 133
6. ETUDE DE LA REPONSE TRANSCRIPTOMIQUE CHEZ LA PALOURDE *RUDITAPES DECUSSATUS* 135
6.1. Expression génétique relative au niveau des branchies 135
6.2. Expression génétique relative au niveau de la glande digestive 136
7. ETUDE DES REPONSES HISTOPATHOLOGIQUES CHEZ LA PALOURDE *RUDITAPES DECUSSATUS* 137
7.1. Les altérations histopathologiques au niveau des branchies 137
7.2. Les altérations histopathologiques au niveau de la glande digestive 139
8. DISCUSSION 143
8.1. Contamination des sédiments par les HAPs et les métaux traces 143

8.2. Contamination de *R. decussatus* par les HAPs et les métaux traces 146
8.3. Réponse biochimique chez *R. decussatus* 149
8.4. Réponse transcriptomique chez *R. decussatus* 156
8.5. Altérations histopathologiques chez *R. decussatus* 158

B. Approche expérimentale : Caractérisation des effets biochimiques, génétiques et génotoxiques du benzo(a)pyrène chez les bivalves marins 165
1. INTRODUCTION 165
2. EFFETS DU BENZO(A)PYRENE ADMINISTRE PAR VOIE TROPHIQUE CHEZ *R. PHILIPPINARUM* 166
2.1. Concentrations de BaP dans les cultures de *I. galbana* et les tissus de *R. philippinarum* 166
2.2. Effet du BaP sur le taux d'accumulation du malondialdéhyde (MDA) 166
2.3. Effet génotoxique du BaP 167
2.4. Effet du BaP sur l'expression relative des gènes 170
3. REPONSE BIOLOGIQUE DE LA PALOURDE *R. PHILIPPINARUM* EXPOSEE A L'EAU DE MER CONTAMINEE PAR DES CONCENTRATIONS SUBAIGUËS DE BENZO(A)PYRENE 173
3.1. Effets du BaP sur la réponse biochimique 173
3.2. Effet génotoxique du BaP 175
3.3. Effets du BaP sur l'expression relative des gènes 177
4. REPONSE BIOLOGIQUE DE LA PALOURDE *R. PHILIPPINARUM* EXPOSEE A L'EAU DE MER CONTAMINEE PAR DES CONCENTRATIONS AIGUËS DE BENZO(A)PYRENE 180
4.1. Effet du BaP sur la réponse biochimique 180
4.2. Effet génotoxique du BaP 182
4.3. Effets du BaP sur l'expression relative des gènes 187
5. ETUDE CINETIQUE DE LA TOXICOLOGIE DU BENZO(A)PYRENE CHEZ LA PALOURDE *R. PHILIPPINARUM* 191
5.1. Cinétique des effets biochimiques du BaP chez la palourde *R. philippinarum* 191
5.2. Cinétique des effets génotoxiques du BaP chez la palourde *R. philippinarum* 193
5.3. Cinétique des effets du BaP sur l'expression relative des gènes chez la palourde *R. philippinarum* 199
6. REPONSE BIOLOGIQUE DE L'HUITRE *CRASSOSTREA GIGAS* EXPOSEE A DES CONCENTRATIONS SUBAIGUËS ET AIGUES DE BENZO(A)PYRENE 202
6.1. Effets du BaP sur la réponse biochimique chez l'huître *C. gigas* 202
6.2. Effet génotoxique du BaP chez l'huître *C. gigas* 204
6.3. Effets du BaP sur l'expression relative des gènes chez l'huître *C. gigas* 210
7. DISCUSSION 214
7.1. Accumulation du BaP dans les cellules de la microalgue *I. galbana* et dans les tissus de la palourde *R. philippinarum* nourrie avec la microalgue 214
7.2. Réponse biochimique au BaP chez les bivalves 215
7.3. Effets génotoxiques du BaP chez les bivalves 223
7.4. Effets du BaP sur la réponse transcriptionelle chez *R. philippinarum* et *C. gigas* 226
7.4.1. Expression des gènes de détoxication 226
7.4.2. Expression des gènes de la défense antioxydante 231
7.4.3. Expression des gènes du métabolisme mitochondrial 234
7.4.4. Expression des gènes de la défense immunitaire et de la reproduction chez *C. gigas* 240

CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE 242

CONCLUSION GENERALE 257

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Liste des abréviations

% : Pourcentage
°C : Degré Celsius
ε : Cœfficient d'extinction molaire
µg : Microgramme
µL : Microlitre
µM : Micromolaire
µm : Micromètre
µmole : Micromole
3-OH BaP : 3-hydroxybenzo(a)pyrène
8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihydro-20-déoxyguanosine
AChE : Acétylcholinestérase
ACh : Acétylthiocholine
ACP : Analyses en composantes principales
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AE : Altération de l'épithélium
Ag : Argent
Ahr : Aryl hydrocarbon receptor
AL : Altération des lamelles
An : Anthracène
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messager
ARNr 12S : Acide ribonucléique ribosomique 12S
ARNr 16S : Acide ribonucléique ribosomique 16S
ARNt : Acide ribonucléique de transfert
As : Arsenic
ATP : Adénosine triphosphate
AVS : acide volatile sulfide
B[a]A : Benzo[a]anthracène
BAF : Facteur de bioaccumulation
BaP : Benzo(a)pyrène
BCF : Facteur de bioconcentration
B[ghi]Pér : Benzo[g,h,i]pérylène
BPDE : Benzo(a)pyrene diolepoxide
BPH : Benzo(a)pyrène hydroxylase
BPM : Bas poids moléculaire
BSA : Albumine bovine sérique
C : Carbone
CAT : Catalase
CAR/ASP : Centre d'Activités Régionales pour les Aires Spécialement Protégées
Cd : Cadmium
CD : Cellules digestives
CDNB : 1-chloro 2,4-dinitrobenzène
CEDRE : Centre de documentation de recherche et d'expérimentation sur les pollutions accidentelles des eaux
CF : Cils frontaux

CGDD-SOeS : Commissariat général au développement durable - Service de l’observation et des statistiques
CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
Chry : Chrysène
CIESM : Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Méditerranée
CL : Cils latéraux
cm : Centimètre
CMC : Cellules muqueuses caliciformes
cox1: cytochrome c oxydase sous-unité 1
CPL : Chromatographie en phase liquide
CSB : Cellules sécrétrices basophiles
Ct : Cycle seuil
Cu : Cuivre
cyp1a1 : Cytochromes P450 famille 1A1
CYP450 : Cytochromes P450
cyp4 : Cytochromes P450 famille 4
cytb: cytochrome b
DC : Débris cellulaires
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DO : Densité optique
DTNB : 5-5’-dithio-bis (2-nitrobenzoate)
EC : Erosion ciliaire
EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
EEA : European Environment Agency
ERO : Espèces réactives de l’oxygène
FAO: Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
Fb : Fibrose
FCA : Fragmentation du cytoplasme apical
FER : Facteurs d’expression relative
FL : Fusion des lamelles
Flt : Fluoranthène
g : Gramme
GPx ou gpx : glutathion peroxydase
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
GST : Glutathion S-transférase
H : Hydrogène
HA : Hydrocarbures aromatiques
ha : Hectare
HAPs : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCl : Acide chloridrique
HCT : Hydrocarbures totaux
H.E : Hématoxyline-Eosine
Hg : Mercure
HNA : Hydrocarbures non aromatiques
H_2O : Molécule d’eau
H_2O_2 : Peroxyde d’hydrogène
HPM : Haut poids moléculaire
H_3PO_4 : Acide phosphorique
hsp70 : Heat shock proteins 70 (protéines de stress thermique)

IAEA : International Atomic Energy Agency
IARC : Agence Internationale de Recherche sur le Cancer
ICP-OES: Plasma à couplage inductif/spectrométrie d'émission optique
ID: Indice de dommage
IH : Infiltration hémocytaire
ilk: Interleukine
INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
IP : Indéno[1,2,3-cd]pyrène
KCl : Chlorure de potassium
kDa : Kilodalton
kg : Kilogramme
km : Kilomètre
KOH : Hydroxyde de potassium
K_{ow} : Coefficient de partage octanol-eau
L: Litre
l : Longueur du trajet optique
LB : Lamelles branchiales
LD : Dilatation de la lumière
LPO : Peroxydation lipidique
Lu : Lumière
m : Mètre
M : Molaire
MDA : Malondialdéhyde
mdr : Multi-Drug Resistance (résistance multi-drogues)
MES : Matière en suspension
MF : Malformations
mg : Milligramme
$MgCl_2$: Chlorure de magnésium
min : Minutes
mL : Millilitre
mm : Millimètre
mM : Millimolaire
Mn : Manganèse
mt : Métallothionéine
m/z : rapport masse/charge
NaCl : Chlorure de sodium
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
Na^+/K^+-ATPase : Sodium-potassium adenosine triphosphatase
NC : Nécrose cellulaire
ng : Nanogramme
Ni : Nickel
nm : Nanomètre
nmole : Nanomole
NSO : Composés lourds
NT : Nécrose des tubules
O_2 : Oxygène
$^{\cdot}OH$: Radical hydroxyle
OMI : Organisation maritime internationale
OPECST : Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques
P : mg de protéines par mL de la fraction à doser

PAM ou MAP : Plan d’action pour la Méditerranée
Pb : Plomb
PCBs : Polychlorobiphényles
PCR : Polymerase chain reaction
pH : Potentiel hydrogène
Phé : Phénanthrène
pmol : Picomole
PNUE ou UNEP : Programme des Nations Unies pour l’Environnement
ppm : Partie par million
prot : Protéines
psu : Practical salinity unit
Py : Pyrène
qPCR: PCR quantitative
RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA (Amplification aléatoire d'ADN polymorphe)
RE : Rétrécissement épithéliale
RLB : Rupture de la lame basale
$R^{\cdot}$: Radical alkyle
$RO^{\cdot}$: Radical alkoxyle
$ROO^{\cdot}$: Radical peroxyle
ROOH : Hydroperoxyde lipidique
RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction
s : Secondes
SD : Standard Deviation
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SEM: Standard Error of Mean
sod : Superoxyde dismutase
t : tonnes
TBA : Acide 2-thiobutirique
TBARS : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TCS : Tissu chitineux de soutien
TD : Tubules digestifs
TI : Tissu interstitiel
TM : Trichrome de Masson
T*m* : Température de fusion
TMP 1,1,3,3- tétraméthoxypropane
TNB : 5-thio-2-nitrobenzoate
UCM : Unresolved complex mixture (fraction non résolue des hydrocarbures)
US-EPA : United States Environmental Protection Agency
UV : ultraviolet
V: Vanadium
Vs : volume de l’échantillon en mL
Vt : volume total dans la cuve
vtg : Vitellogénine
Zn : Zinc

Liste des figures

Figure 1 : Carte de la mer Méditerranée et des pays riverains (source: http://www.cosmovisions.com/MerMediterranee.htm).

Figure 2 : Côte tunisienne avec les zones de préoccupation environnementale majeure et les «points chauds» de pollution (EEA, 2006).

Figure 3 : Ensemble des hydrocarbures présents dans les pétroles bruts (d'après Bertrand et Mille, 1989).

Figure 4 : Liste des HAPs prioritaires selon les recommandations de l'US-EPA (Wilson et Jones, 1993).

Figure 5 : Cycle biogéochimique des hydrocarbures (d'après McElroy et al., 1989, *dans* Le Dû-Lacoste, 2008)

Figure 6 : Métabolisme des hydrocarbures au niveau cellulaire (d'après Beaune et Loriot, 2000).

Figure 7 : Formule semi-développée du benzo(a)pyrène (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Figure 8: Spectre des tailles (en mètre) de particules dans le milieu aquatique et schématisation des différentes fractions (Lesven, 2008).

Figure 9 : Principaux mécanismes membranaires permettant l'entrée des métaux dans la cellule (adapté de Mason, 2013).

Figure 10 : Représentation schématique des interactions possibles entre les métaux et les structures intracellulaires (Paul-Pont, 2010).

Figure 11 : Représentation des méthodologies chimiques et biologiques permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques (modifié d'après Lagadic et al., 1997).

Figure 12 : Représentation de l'ordre chronologique des différentes atteintes induites au sein de l'organisation des systèmes biologiques. (D'après Von Der Oost et al., 2003).

Figure 13 : Effets des espèces réactives de l'oxygène et des intermédiaires réactifs sur les macromolécules cellulaires (lipides, protéines et ADN) (d'après Kehrer, 1993).

Figure 14: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

Figure 15 : Schéma général des phénomènes physiologiques intervenants au moment de la transmission de l'influx nerveux (http://www.apteronote.com/revue/histoire/article_21.shtml). 1. Synthèse de l'acétylcholine (ACh) dans le cytoplasme de la terminaison nerveuse à partir de l'acétylCoA (ACoA) et de la choline, 2. Les molécules d'acétylcholine sont stockées par vésicule synaptique, 3. Libération des ACh dans la synapse, 4. Fixation de l'ACh sur les récepteurs cholinergiques qui se trouvent sur la membrane post-synaptique, 5. Hydrolyse de l'ACh par l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) afin de stopper la stimulation du récepteur.

Figure 16 : Les principaux dommages à l'ADN (d'après Favier, 2003).

Figure 17: Schéma représentant le principe de la réaction de RAPD et son utilisation pour détecter les impacts génotoxiques avec le cas de la suppression du site d'hybridation n°3 simultanément à la création du site n°6 par un xénobiotique (Cambier, 2009).

Figure 18: Schéma simplifié montrant l'application de l'expression génétique pour identifier le mécanisme d'action potentiel d'un contaminant environnemental inconnu (adapté de Nuwaysir et al., 1999, *dans* Snape et al., 2004).

Figure 19 : Schéma montrant l'anatomie de la palourde du genre *Ruditapes* (Schéma modifié d'après Cesari et Pellizzato, 1990).

Figure 20 : Schéma montrant l'anatomie de *Crassostrea gigas* dans sa valve inférieure. Par ordre alphabétique : Bo. : bouche ; Br. : branchies ; Cc. : capuchon céphalique ; Cp. : cavité péricardique ; G. : gonade ; Gt. : gonoducte ; Lc. : ligament charnière ; M. : manteau ; Ml. : muscle lisse ; Ms. : Muscle strié ; Mv. : masse viscérale ; Pl. : palpes labiaux ; Te. : tentacules ; U. : umbo ; Vi. : valve inférieure (Schéma d'après illustration provenant de Normand, 2009).

Figure 21 : Localisation des sites d'échantillonnage dans la lagune de Tunis et la région de Louza. * sites de prélèvement des palourdes et des sédiments, * sites de prélèvement des sédiments.

Figure 22 : Photo montrant le système expérimental de contamination des palourdes *R. philippinarum* par le benzo(a)pyrène via la voie trophique.

Figure 23 : Schéma représentant les protocoles opératoires suivis pour l'analyse des hydrocarbures tissulaires et sédimentaire.

Figure 24 : Représentation schématique du fractionnement par chromatographie en Phase liquide (CPL).

Figure 25 : Schéma montrant les différents organes utilisés chez la palourde *R. decussatus* pour l'analyse des biomarqueurs.

Figure 26 : Schéma montrant les différents organes utilisés chez les bivalves *R. philippinrum* et *C. gigas* pour l'analyse des biomarqueurs.

Figure 27 : Principe de mesure de l'activité acétylcholinestérase.

Figure 28 : Principe général de la PCR en temps réel avec utilisation du SYBR Green. (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green libre exhibe peu de fluorescence. (b) A la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel.

Figure 29 : Démarche d'extraction d'ADN génomique à partir d'un tissu biologique (d'après Miller et al., 1988).

Figure 30: Variation spatio-temporelle de l'activité glutathion S-transférase au niveau des branchies de la palourde *Ruditapes decussatus* collectée, saisonnièrement, dans les trois sites de la lagune de Tunis et le témoin entre septembre 2008 et août 2009. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Les différentes lettres a, b, c et d indiquent une différence significative entre les sites durant la même saison, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

Figure 31 : Variation spatio-temporelle de l'activité catalase (A) et du taux d'accumulation du malondialdéhyde (B) au niveau des branchies de la palourde *Ruditapes decussatus* collectée, saisonnièrement, dans les trois sites de la lagune de Tunis et le témoin entre septembre 2008 et août 2009. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Les différentes lettres a, b, c et d indiquent une différence significative entre les sites durant la même saison, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

Figure 32 : Variation spatio-temporelle de l'activité acétylcholinestérase au niveau des branchies de la palourde *Ruditapes decussatus* collectée saisonnièrement dans les trois sites de la lagune de Tunis et les témoins entre septembre 2008 et août 2009. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Les différentes lettres a, b, c et d indiquent une différence significative entre les sites durant la même saison, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

Figure 33 : Variation spatio-temporelle des activités benzo(a)pyrène hydroxylase (A) et glutathion S-transférase (B) au niveau de la glande digestive de la palourde *Ruditapes decussatus* collectée dans les trois sites de la lagune de Tunis et les témoins entre septembre 2008 et août 2009. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Les différentes lettres a, b, c et d indiquent une différence significative entre les sites durant le même mois, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

Figure 34 : Variation spatio-temporelle de l'activité catalase (A) et du taux d'accumulation du malondialdéhyde (B) au niveau de la glande digestive de la palourde *Ruditapes decussatus* collectée dans les trois sites de la lagune de Tunis et les témoins entre septembre 2008 et août 2009. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD.

Les différentes lettres a, b, c et d indiquent une différence significative entre les sites durant le même mois, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

Figure 35 : Observations microscopiques des branchies de *R. decussatus* collectées dans la lagune de Tunis et témoins pendant le printemps. Coloration au Trichrome de Masson. (**A**-**B**-**C**) Coupe histologique des branchies témoins. Structure normale des branchies présentant un arrangement uniforme des filaments (FB) et des lamelles (LB) branchiaux avec des cils frontaux (CF) et latéraux (CL) et un épithélium lamellaire intact. SH: sinuse hémolymphatique. TCS: Tissu chitineux de soutien. CMC: cellule muqueuse caliciforme (**A**, *G*×100; **B**, **C**, *G*×1000).

(**D**-**E**-**F**-**G**) Altérations de l'histoarchitecture des branchies de *R. decussatus* du site Z1. Infiltration hémocytaire (HI), fusion des lamelles (FL), malformation (MF) des extrémités des lamelles, altération de l'épithélium lamellaire (AE), érosion ciliaire des lamelles (EC) et altération des lamelles branchiales (AL) (**D**, **E**, *G*×400; **F**, **G**, *G*×1000).

(**H**-**I**-**J**-**K**) Altérations de l'histoarchitecture des branchies de *R. decussatus* du site Z2. Infiltration hémocytaire (HI) diffuse dans les filaments branchiaux, malformation (MF) des extrémités des lamelles, altération de l'épithélium lamellaire (AE), érosion ciliaire des lamelles (CE) et altération des lamelles branchiales (AL) (**H**, **I**, *G*×100; **J**, **K**, *G*×1000).

(**L**-**M**-**N**-**O**) Altérations de l'histoarchitecture des branchies de *R. decussatus* du site Z3. Altération de l'épithélium lamellaire (AE), érosion ciliaire des lamelles (EC), fusion des lamelles (FL), altération des lamelles (AL), infiltration hémocytaire (IH) diffuse dans les filaments branchiales et formation d'une fibrose (Fb) (**L**, *G*×100; **M**, **O**, *G*×400; **N**, *G*×1000).

Figure 36 : Observations microscopiques de la glande digestive de *R. decussatus* collectées dans la lagune de Tunis et témoins pendant le printemps. Colorations à l'Hématoxyline-Eosine (**A**, **B**, **D**, **K** et **L**) et au Trichrome de Masson (**C**, **E**, **F**, **G**, **H**, **I**, **J**, **M**, **N** et **O**). (**A**-**B**-**C**) Coupe histologique de la glande digestive témoin. Une structure normale de la glande digestive montrant des tubules digestifs (TD) constitués d'une seule couche de cellules épithéliales, les cellules digestives (CD) et les cellules sécrétrices basophiles (CSB). La lumière (Lu) du tubule est étroite ou presque close. Le tissu interstitiel (TI), entre les tubules, est composé de cellules (fibrocytes et hémocytes) (**A**, *G*×400; **B**, **C**, *G*×1000).

(**D**-**E**-**F**-**G**) Altérations de l'histoarchitecture de la glande digestive de *R. decussatus* du site Z1. Les tubules présentent une lumière dilatée (LD) contenant généralement des débris cellulaires (DC), un rétrécissement épithélial (RE), une fragmentation du cytoplasme apical (FCA), une rupture de la lame basale (RLB) et des nécroses cellulaires (NC) et tubulaires (NT). Présence d'infiltration hémocytaire (IH) dans le tissu interstitiel et la formation de fibrose (Fb) dans les glandes digestives sévèrement affectés (**D**, **E**, **F**, *G*×400; **G**, *G*×1000).

(**H**-**I**-**J**-**K**) Altérations de l'histoarchitecture de la glande digestive de *R. decussatus* du site Z2. Dilatation de la lumière tubulaire (LD), fragmentation du cytoplasme apical (FCA), rétrécissement épithélial (AE) au niveau des tubules, formation de nécrose cellulaire (NC) et infiltration hémocytaire dans le tissu interstitiel (IH) (**H**, **I**, *G*×40; **J**, **K**, *G*×1000).

(**L**-**M**-**N**-**O**) Altérations de l'histoarchitecture de la glande digestive de *R. decussatus* du site Z3. Tubules avec lumière dilatée (LD) contenant des débris cellulaires (DC), rétrécissement épithélial (RE) des tubules, fragmentation du cytoplasme apical (FCA), rupture de la lame basale (RLB), formation des nécroses cellulaires (NC) et tubulaires (NT) et infiltration hémocytaire (HI) (**L**, **M**, *G*×40; **N**, **O**, *G*×100).

Figure 37 : Analyse en composantes principales appliquée à toutes les variables étudiés dans les tissus mous et les branchies des palourdes et les sédiments issus des différents sites en printemps. (A) Cercle des corrélations. (B) Projection des individus sur le plan factoriel F1-F2.

Figure 38 : Analyse en composantes principales appliquée à toutes les variables étudiés dans les tissus mous et la glande digestive des palourdes et les sédiments issus des différents sites en printemps. (A) Cercle des corrélations. (B) Projection des individus sur le plan factoriel F1-F2.

Figure 39: Taux d'accumulation du malondialdéhyde dans les branchies (A) et la glande digestive (B) de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours au BaP par voie trophique. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD ($n = 6$). * indique une différence significative par rapport au témoin selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

Figure 40 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau des branchies de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours au BaP par voie trophique. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

Figure 41: Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau de la glande digestive de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours au BaP par voie trophique. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

Figure 42 : Réponse des marqueurs biochimiques (GST, CAT, MDA et AChE) au niveau des branchies et de la glande digestive de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours à des concentrations subaiguës de BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 6). * indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

Figure 43 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau des branchies de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours à des concentrations subaiguës de BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

Figure 44 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau des branchies de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours à des concentrations subaiguës de BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

Figure 45 : Réponse des marqueurs biochimiques (GST, CAT, MDA et AChE) au niveau des branchies et de la glande digestive de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours à des concentrations aiguës de BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 6). * indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

Figure 46 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau des branchies de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours à des concentrations aiguës de BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin (DMSO), [a] indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA sur rangs et les tests de Tukey et de Dunn, $p<0,05$.

Figure 47 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau de la glande digestive de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours à des concentrations aiguës de BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin (DMSO), [a] indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA sur rangs et les tests de Tukey et de Dunn, $p<0,05$.

Figure 48 : Réponse des marqueurs biochimiques (GST, CAT, MDA et AChE) au niveau des branchies et de la glande digestive de *R. philippinarum* exposée pendant 1, 3, 7 et 14 jours au BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 6). * indique une différence significative comparée au témoin pour la même période d'exposition, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

Figure 49 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau des branchies de *R. philippinarum* exposée pendant 1, 3, 7 et 14 jours à 10 µg BaP/L. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin pour la même période d'exposition, selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

Figure 50 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau de la glande digestive de *R. philippinarum* exposée pendant 1, 3, 7 et 14 jours à 10 µg BaP/L. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin pour la même période d'exposition, selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

Figure 51 : Réponse des marqueurs biochimiques (GST, CAT, MDA et AChE) au niveau des branchies et de la glande digestive de *C. gigas* exposée pendant 7 jours au BaP (5, 20, 100, 400 et 1000 µg/L). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 6). * indique une différence significative comparée au témoin, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

Figure 52 : Expressions génétiques relatives des 11 gènes étudiés au niveau des branchies de *C. gigas* exposée pendant 7 jours au BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin, selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

Figure 53 : Expressions génétiques relatives des 11 gènes étudiés au niveau de la glande digestive de *C. gigas* exposée pendant 7 jours au BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin, selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

Figure 54 : Réponse biochimique étudiée au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes *R. philippinarum* exposées aux différentes concentrations de BaP via l'eau de mer pendant 7 jours. Pour chaque condition, les biomarqueurs ont été calculés par rapport à leurs témoins relatifs. *différence significative par rapport au témoin ($p < 0,05$).

Figure 55 : Variation des sites d'hybridation dans l'ADN génomique au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes *R. philippinarum* exposées aux différentes concentrations de BaP via l'eau de mer pendant 7 jours. Pour chaque condition, le nombre des sites d'hybridation a été calculé par rapport à son témoin relatif. *différence significative par rapport au témoin ($p < 0,05$).

Figure 56 : Expressions différentielles des gènes sélectionnés dans les branchies des palourdes *R. philippinarum* après 7 jours d'exposition à différentes concentrations de BaP via l'eau de mer. Pour chaque condition, les expressions des gènes ont été calculées par rapport à leurs témoins relatifs. *différence significative par rapport au témoin ($p < 0,05$).

Figure 57 : Expressions différentielles des gènes sélectionnés dans la glande digestive des palourdes *R. philippinarum* après 7 jours d'exposition à différentes concentrations de BaP via l'eau de mer. Pour chaque condition, les expressions des gènes ont été calculées par rapport à leurs témoins relatifs. *différence significative par rapport au témoin ($p < 0,05$).

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques des principales lagunes de la Tunisie (source : http://www.chm-biodiv.nat.tn).

Tableau II : Indices caractéristiques des origines des HAPs dans l'environnement.

Tableau III : Paramètres physico-chimiques du benzo(a)pyrène (INERIS, 2006).

Tableau IV : Les caractéristique du lac sud de Tunis avant et après l'aménagement (Ben Souissi, 2002 ; Jouini et al., 2005).

Tableau V: Les gènes étudiés dans ce travail et la fonction des protéines associées.

Tableau VI : Gènes étudiés chez la palourde *R. decussatus* et séquences des amorces correspondantes.

Tableau VII : Gènes étudiés chez la palourde *R. philippinarum* et séquences des amorces correspondantes.

Tableau VIII : Gènes étudiés chez l'huître *C. gigas* et séquences des amorces correspondantes.

Tableau IX : Amorces spécifiques et non spécifiques utilisées pour la RAPD-qPCR

Tableau X: Variation mensuelle des paramètres physico-chimiques de l'eau de mer de la lagune de Tunis (septembre 2008 – août 2009).

Tableau XI : Concentrations des HAPs (µg/L) dans l'eau de mer prélevée dans la lagune de Tunis en automne 2008.

Tableau XII : Distribution des HAPs (ng/g poids sec) dans les sédiments de surface collectés saisonnièrement dans la lagune de Tunis.

Tableau XIII : Rapports de diagnostique visant à identifier la source des apports en HAPs dans les sédiments.

Tableau XIV : Accumulation des HAPs (ng/g poids sec) dans les tissus de *Ruditapes decussatus* collectée saisonnièrement dans la lagune de Tunis et le témoin.

Tableau XV: Rapports de diagnostique visant à identifier la source des apports en HAPs dans les palourdes.

Tableau XVI: Distribution des métaux traces dans les sédiments de surface (µg/g poids sec) collectés saisonnièrement dans la lagune de Tunis (septembre 2008- août 2009).

Tableau XVII : Accumulation des métaux traces (µg/g poids sec) dans les tissues de *Ruditapes decussatus* collectée saisonnièrement dans la lagune de Tunis et les témoins.

Tableau XVIII : Expression relative des gènes étudiés au niveau des branchies de *Ruditapes decussatus* collectée dans les trois sites de la lagune de Tunis et témoin en printemps.

Tableau XIX : Expression relative des gènes étudiés au niveau de la glande digestive de *Ruditapes decussatus* collectée dans les trois sites de la lagune de Tunis et témoin en printemps.

Tableau XX : Intensité des altérations histopathologiques au niveau des branchies de *R. decussatus* collectée dans lagune de Tunis et le témoin.

Tableau XXI : Intensité des altérations histopathologiques au niveau de la glande digestive de *R. decussatus* collectée dans lagune de Tunis et le témoin.

Tableau XXII : Concentrations de BaP (µg/g poids sec) dans les cellules de *I. galbana* contaminées et témoin.

Tableau XXIII : Nombre des sites d'hybridation relatifs des amorces RAPD par génome au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Tableau XXIV : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs Tm appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau des branchies des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Tableau XXV : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs Tm appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau de la glande digestive des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Tableau XXVI : Nombre des sites d'hybridation relatifs des amorces RAPD par génome au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Tableau XXVII : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs Tm appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau des branchies des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Tableau XXVIII : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs Tm appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau de la glande digestive des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Tableau XXIX : Nombre des sites d'hybridation relatifs des amorces RAPD par génome au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Tableau XXX : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs Tm appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau des branchies des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Tableau XXXI : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs Tm appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau de la glande digestive des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Tableau XXXII : Nombre des sites d'hybridation relatifs des amorces RAPD par génome au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes exposées à 10 µg BaP/L pendant différentes périodes et témoin.

Tableau XXXIII : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs Tm appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau des branchies des palourdes exposées à 10 µg BaP/L pendant différentes périodes et témoin.

Tableau XXXIV : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs Tm appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau de la glande digestive des palourdes exposées à 10 µg BaP/L pendant différentes périodes et témoin.

Tableau XXXV : Nombre de sites d'hybridation relatifs des amorces RAPD par génome au niveau des branchies et de la glande digestive des huîtres exposées à différentes concentrations de BaP (5, 20, 100, 400 et 1000 µg/L) pendant 7 jours et témoin.

Tableau XXXVI : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs Tm appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau des branchies des huîtres exposées à différentes concentrations de BaP pendant 7 jours et témoin.

Tableau XXXVII : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs Tm appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau de la glande digestive des huîtres exposées à différentes concentrations de BaP pendant 7 jours et témoin.

Tableau XXXVIII : Récapitulatif des résultats obtenus à partir des branchies des bivalves utilisés dans nos expérimentations *in vivo*.

Tableau XXXIX : Récapitulatif des résultats obtenus à partir de la glande digestive des bivalves utilisés dans nos expérimentations *in vivo*.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La totalité des écosystèmes de la planète sont désormais affectés d'une façon ou d'une autre par le développement des sociétés humaines et les phénomènes de pollution qui en résultent. Le développement des activités humaines est devenu aujourd'hui une menace pour l'environnement marin qui subit depuis plusieurs décennies des agressions majeures. En effet, les mers et les océans ont été toujours considérés par l'Homme comme une solution pour se débarrasser de tout ce qui est nocif et toxique et représentaient, ainsi, le réceptacle final et un réservoir important pour tous les déchets anthropiques.

La Méditerranée est une des mers les plus appréciées au monde. La région comprend un vaste ensemble d'écosystèmes marins et côtiers qui offrent d'importants avantages à tous les habitants du littoral. Il s'agit notamment des lagunes d'eau saumâtre, des estuaires ou des zones de transition, des plaines côtières, des zones humides, des côtes rocheuses et des zones littorales, des herbiers, des communautés coralligènes, etc. Cependant, cette mer est fortement impactée par l'activité humaine et les apports en produits contaminants car c'est une zone caractérisée par une grande activité industrielle, un intense développement urbain et des grandes concentrations touristiques littorales. En plus, sur cette région il règne un important trafic maritime lié aux activités aussi bien industrielles que touristiques. Ces activités ont engendré des contraintes sur l'environnement causant souvent la dégradation du milieu marin et modifiant ses écosystèmes (D'Adamo et al., 2008). Dans certains écosystèmes, les produits chimiques introduits dans le milieu marin peuvent être à l'origine de la disparition de certaines espèces animales et/ou végétales et par conséquent, entraînent le dysfonctionnement de la chaîne trophique (Gold, 2002).

Les hydrocarbures pétroliers sont parmi les déchets les plus toxiques, déversés en mer. Ils auront comme conséquence une pollution importante et précoce à l'échelle globale. La Méditerranée est considérée comme une des surfaces marines les plus affectées par la contamination pétrolière (Mille et al., 2007). L'exploitation humaine des gisements de pétrole n'a cessé d'augmenter depuis le début du siècle dernier. Cependant, l'extraction, le transport et l'utilisation de cette source d'énergie entraînent des risques de pollution pour l'environnement marin pouvant influencer l'équilibre écologique et parfois entraîner la destruction de l'écosystème. La consommation mondiale de pétrole brut avoisine 3,5 milliards

de tonnes par an, représentant 40% de l'énergie consommée par l'Homme (CEDRE, 2006). La moitié de cette quantité consommée circule par voie maritime. L'introduction des hydrocarbures dans le milieu marin peut aller des apports chroniques diffus jusqu'aux déversements massifs souvent d'origine anthropique ou accidentels tels que les échouements et les naufrages des pétroliers. Ces contaminants, et plus particulièrement les hydrocarbures aromatiques polycycliques, sont connus par leur rémanence dans le milieu marin, ainsi que leur toxicité. Ceci constitue un danger pour la vie marine ainsi que pour l'Homme, en tant que consommateur des produits de la mer. C'est pour ces raison que plusieurs études de surveillance sont menés pour la détection et la prévention de la pollution par les hydrocarbures (Louiz et al., 2008 ; khédir-Ghenim et al., 2009 ; Zrafi et al., 2013).

Outre les hydrocarbures, les métaux lourds sont considérés aussi comme polluants majeurs de la Méditerranée qui peuvent être très nocifs voire même mortels. A titre d'exemple, on peut citer le Japon où une pollution par le cadmium (dans les années 1950-1960) a déclenché de nombreux troubles rénaux et osseux, entraînant une importante mortalité dans les populations des régions contaminées (Boucheseiche et al., 2002) . Dans plusieurs cas, une contamination par les métaux lourds peut être liée à une contamination par les hydrocarbures pétroliers vu que le pétrole brut et certains de ces dérivés contiennent dans leurs compositions chimiques des composés métalliques (Bertrand et Mille, 1989).

Ces contaminants organiques et inorganiques arrivant dans la colonne d'eau marine peuvent facilement s'accumuler dans les sédiments marins et atteindre des teneurs beaucoup plus élevés que celle présentes dans la colonne d'eau. De ce fait, les sédiments peuvent jouer le rôle d'un réservoir pour ces xénobiotiques, comme ils peuvent représenter une source de contamination pour l'eau sus-jacente en libérant ces composés. De ce fait, l'analyse chimique des sédiments joue un rôle important dans l'évaluation de l'état de pollution de l'environnement marin (Bellucci et al., 2002). De plus, ces contaminants peuvent être accumulés par les organismes marins et atteindre ainsi des concentrations tissulaires plusieurs fois plus importantes que celles présentes dans leur milieu environnant (Fu et al., 2014).

Les programmes de surveillance des milieux marins utilisent généralement deux approches complémentaires. La première est chimique, basée sur la quantification des contaminants dans le biotope (eau et sédiments) qui fournie des données sur l'historique des rejets mais ne reflète pas nécessairement la biodisponibilité de ces contaminants vis-à-vis des organismes marins. Dans le but de combler cette lacune, le deuxième volet de cette approche

consiste à évaluer l'exposition des êtres vivants par le dosage des composés chimiques présents dans les tissus des organismes (Pan et al., 2012). Ces mesures permettent, en plus, d'estimer les risques sanitaires, pour l'homme, de la consommation des produits de la mer. Cependant, ces analyses chimiques, à eux seuls, ne fournissent pas de renseignements à propos de l'impact réel des molécules chimiques sur les organismes vivants. D'où, l'intérêt de la deuxième approche (biologique) qui est basée sur l'utilisation de certains biomarqueurs qui sont spécifiques aux problèmes environnementaux, appropriée pour les études de terrain et l'estimation des risques engendrés par la pollution sur la santé de l'écosystème (Viarengo et al., 2007). Les biomarqueurs (moléculaires, biochimiques, histopathologiques, physiologiques,…) sont de plus en plus utilisés dans les programmes internationaux et nationaux de surveillance de la qualité des écosystèmes aquatiques en raison de leur simplicité et leur faible coût.

Les bivalves ont été largement utilisés à l'échelle mondiale comme des espèces sentinelles dans les programmes de surveillance de l'environnement (Matozzo et al., 2010), en raison de leur large distribution, leur mode de vie sessile, leur tolérance aux variations des conditions environnementales, leur mode d'alimentation par filtration avec un métabolisme faible, la facilité de collecte et leur pouvoir accumulateur des polluants présents dans l'environnement (Widdows et al., 2002).

Dans ce contexte, le littoral tunisien s'étend sur 1400 Km et présente un milieu physique et naturel très diversifié. Cependant il présente des centres urbains (Tunis, Sousse, Sfax, Gabès) et industriels ainsi que d'importants port (de pêche, de plaisance, de marchandises). Parmi les plans d'eau économiquement importants de la Tunisie, la lagune de Tunis. Située au nord de la Tunisie, elle se présente comme étant le siège d'activité de pêche avec des productions halieutiques et conchylicoles (majoritairement les palourdes) assez élevées. Malgré son intérêt biologique et économique, la lagune est soumise à des fortes pressions environnementales. En effet, elle est le siège d'une importante pression anthropique due à sa localisation au voisinage de la capitale, ville de Tunis, qui est caractérisée par une population très dense et par la présence de plusieurs activités économiques liés au tourisme, à l'agriculture, aux ports, aux agglomérations et à plusieurs industries. Malgré qu'elle fût fortement affectée par une pression anthropique, la lagune de Tunis a été relativement moins étudiée comparée avec d'autres lagunes tunisiennes telles que la lagune de Bizerte. Les études antérieures réalisées dans la lagune de Tunis concernaient généralement les aspects écologiques de la lagune (Armi et al., 2010), l'analyse des paramètres physico-chimiques de

l'eau de mer (Trabelsi et al., 2013) et la quantification des contaminants dans les différentes matrices environnementales (Khedir-Ghenim et al., 2009). En revanche, ces travaux n'ont pas consacré d'attention vis-à-vis des effets biologiques des contaminants chez les organismes aquatiques. Dans ce cadre, ce travail fut le premier, à notre connaissance, qui s'intéressent à intégrer une batterie de biomarqueurs localisés à différent niveaux de la cellule avec des analyses chimiques des polluants prioritaires, principalement les hydrocarbures, afin de fournir des indications globales sur la santé de la lagune de Tunis.

Objectifs de la thèse

L'approche que nous avons adoptée dans ce contexte est un couplage entre des études de terrain, représentatives de la réalité du milieu naturel et des études au laboratoire, plus réductionnistes.

La première partie portera sur la surveillance de la qualité du milieu lagunaire de Tunis, dont les objectifs majeurs consiste à :

- Evaluer le niveau de contamination des sédiments lagunaires par les hydrocarbures pétroliers et les métaux traces et étudier l'accumulation de ces contaminants chez une espèce sentinelle de la lagune, la palourde commune *Ruditapes decussatus*.

- Etudier les effets biologiques des contaminants (hydrocarbures et métaux traces) chez la palourde *Ruditapes decussatus* à travers une approche multi-marqueurs, moyennant une combinaison des réponses moléculaires (expression des gènes), biochimiques (AChE, BPH, GST, CAT et MDA) et histopathologiques.

- Suivre la variation temporelle durant une année (septembre 2008 – août 2009) :

    - des niveaux de contamination des sédiments marins et de la palourde *R. decussatus* par les hydrocarbures et les métaux traces,

    - des facteurs physico-chimiques de l'eau de mer,

    - de la variation des biomarqueurs biochimiques chez la palourde.

La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale (au laboratoire) des effets biologiques d'une contamination par le benzo(a)pyrène (BaP) chez deux espèces de bivalves, dont les objectifs majeurs consiste à :

- Etudier les réponses biochimiques, transcriptomiques, ainsi que la génotoxicité chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* contaminée par des concentrations différentes de BaP à travers la voie trophique.

- Etudier les réponses biochimiques, transcriptomiques, ainsi que la génotoxicité chez *Ruditapes philippinarum* exposée, à travers l'eau de mer, à des concentrations chroniques et aigues de BaP.

- Etudier la cinétique des réponses biochimiques et moléculaires et de la génotoxicité chez *Ruditapes philippinarum* exposée au BaP à différents intervalles de temps.

- Etudier les réponses biochimiques, transcriptomiques, ainsi que la génotoxicité chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* exposée au BaP et les comparer aux réponses biologiques déterminées chez la palourde *R. philippinarum*.

Ce manuscrit est organisé de la manière suivante :

Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique décrivant l'état de contamination la mer méditerranéenne et les caractéristiques de ses écosystèmes lagunaires, ainsi que l'ensemble des polluants majeurs rencontrés dans ce milieu. Une autre partie est consacrée à l'état de connaissance relative au concept de biosurveillance et l'ensemble des approches d'évaluation de la qualité des milieux marins.

Le deuxième chapitre est consacré à la présentation détaillée des modèles biologiques utilisés, des caractéristiques du site d'étude, de la méthodologie d'échantillonnage, de la mise en place des dispositifs expérimentaux et des différentes méthodes et techniques utilisées.

Le troisième chapitre est conçu pour l'ensemble des résultats et leurs discussions relatives et il comprend deux parties :

- la première décrit et discute les résultats de l'approche *in situ* concernant l'évaluation et le suivi saptio-temporel de la contamination de la lagune de Tunis par les hydrocarbures et les métaux traces et de leurs effets chez la palourde *R. decussatus* en utilisant une batterie de biomarqueurs à différents niveaux cellulaires (moléculaire, biochimique et tissulaire).

- la deuxième partie présente les expérimentations *in vivo* menées durant ces travaux de thèse concernant la caractérisation des effets biochimiques, génétiques et

génotoxiques d'une contamination par le BaP chez *R. philippinarum* et l'étude comparative de la réponse biochimique et génétique chez les deux espèces *R. philippinarum* et *C. gigas*.

Le quatrième chapitre est consacré à une discussion générale qui permettra enfin d'intégrer l'ensemble des résultats, de tirer les conclusions principales émises lors de cette étude et d'en tirer des perspectives de recherches.

CHAPITRE I :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

A. La mer Méditerranée: Un écosystème menacé

1. CARACTERISTIQUES DU BASSIN MEDITERRANEEN

La mer Méditerranée est un bassin semi-fermé et un espace étroit avec une superficie de 2,6 millions de km^2, soit 0,8% de la surface des eaux océaniques. La Méditerranée apparaît comme un grand lac, entouré de trois continents, Europe, Asie et Afrique, dont les côtes accueillent 22 pays et plus de 460 millions d'habitants, desquels 130 millions environ, c'est-à-dire 35%, vivent dans les zones côtières (PNUE/PAM-Plan Bleu, 2009). Elle est délimitée par un littoral qui se déroule sur environ 46000 km, qui illustre l'union étroite de la terre et de la mer (EEA, 2006). La mer Méditerranée est quasi fermée dont les seules liaisons sont le détroit de Gibraltar avec l'océan Atlantique, les détroits des Dardanelles et du Bosphore, avec la mer Noire, et le canal de Suez, ouverture artificielle, vers la mer Rouge (figure 1). Sa profondeur atteint rapidement plus de 2000 m sur l'ensemble du bassin maritime avec des fosses de plus de 5000 m (OPECST, 2011).

Figure 1 : Carte de la mer Méditerranée et des pays riverains (source: http://www.cosmovisions.com/MerMediterranee.htm).

La Méditerranée est fragmentée par les masses de terres qui l'entourent. Elle est d'abord scindée en deux grands ensembles, occidental et oriental, qui sont séparés par le seuil qui s'étend de la Calabre au Cap Bon en Tunisie (seuil sicilo-tunisien). Chacun de ces

deux grands bassins est lui-même scindé en sous-ensembles plus ou moins individualisés. Le système climatique est principalement caractérisé par des étés chauds et secs et des hivers relativement doux et humides, à l'exception de diverses régions du sud et sud-est soumises à un climat aride, voire désertique. L'effet des vents se conjugue avec l'aridité du climat pour générer une évaporation intense (3130 km^3/an), qui crée, en moyenne sur le bassin, un déficit d'eau que l'apport par les pluies et par les fleuves ne suffit pas à compenser. Ce déficit est comblé par les apports hydrologiques de la mer Noire (180 km^3/an) et surtout de l'Atlantique (1520 km^3/an) (OPECST, 2011). Le rapport entre le volume aquatique de la Méditerranée et ces débits permet de calculer un taux de renouvellement des eaux estimé en moyenne à 100 ans (OPECST, 2011). Ces mouvements hydrologiques créent des courants dont la mécanique repose principalement sur les différences de température et de salinité ; les eaux les plus salées ou les plus froides circulent en profondeur.

La mer Méditerranéenne présente une grande diversité biologique avec plus de 25000 espèces de végétaux, 650 espèces d'animaux marins et 19 des 80 espèces connues de cétacés. Elle abrite de 7 à 8 % des espèces marines connues. L'inventaire effectué par la FAO dénombre 1526 espèces d'utilisation alimentaire dont 240 poissons osseux, 55 crustacés, 51 végétaux marins, 46 bivalves (PNUE/PAM-Plan Bleu, 2009 ; OPECST, 2011).

2. LES LAGUNES COTIERES MEDITERRANEENNES

2.1. Généralités

Les lagunes sont des plans d'eau séparés de la mer par un cordon littoral appelé « lido ». Elles occupent 13% des étendues côtières mondiales (Barnes, 1980). Comprises entre terre et mer, elles entretiennent des relations étroites avec la mer, le bassin versant qui les alimente en eau douce et les zones humides périphériques qui les entourent (marais, deltas). Plans d'eau littoraux, généralement de faible profondeur, les lagunes communiquent avec le milieu marin par des ouvertures plus ou moins nombreuses dans le cordon littoral sableux appelées « graus ». Le caractère temporaire ou permanent de ces ouvertures ainsi que la quantité des apports en eau douce du bassin versant confèrent aux eaux lagunaires un caractère saumâtre, allant des eaux sur salées aux eaux presque douces (Franco et al., 2008). Les lagunes sont classées en quatre catégories (Nicholas et Allen, 1981) :

- Les lagunes estuariennes : aires où les intensités de courants de marées sont à peu près égales à celles des courants fluviaux.

- Les lagunes ouvertes : ces lagunes sont caractérisées par un marnage très important qui permet un auto-dragage des passes et ainsi une alimentation permanente par les eaux marines.

- Les lagunes semi fermées : dans lesquelles le marnage n'est pas assez intense pour balayer le matériel apporté par la dérive littorale au niveau du grau, c'est le cas de la lagune de Tunis.

- Les lagunes fermées : ce sont des étangs coupés de la mer par l'interposition d'un cordon littoral et caractérisés par l'absence de courants de marée.

Réceptacle final des eaux douces du bassin versant, caractérisées par un faible renouvellement des eaux et soumises à de nombreuses pressions humaines, les lagunes sont des milieux riches en éléments nutritifs et donc à forte productivité. Les apports en nutriments et en matière organique issus du bassin versant induisent une productivité primaire élevée de l'ordre de 200 à 400 g cm^{-2} an^{-1} (Nixon, 1981). Cette richesse en matière organique, mais également la faible profondeur d'eau qui caractérise ces lagunes, sont à l'origine d'une forte diversité de producteurs primaires (Pérez-Ruzafa et Marcos, 2012). En effet, outre le phytoplancton, les microalgues benthiques, les macrophytes et leurs épiphytes associées contribuent également à la production primaire des lagunes (Knoppers, 1994). Ces lagunes sont très nombreuses en Méditerranée. On dénombre environ 626 lagunes méditerranéennes (OPECST, 2011).

2.2. Les écosystèmes lagunaires en Tunisie

En Tunisie, il y a 28 lagunes qui couvrent une superficie d'environ 105000 ha (OPECST, 2011). Ces écosystèmes présentent des caractéristiques hydrodynamiques, hydrobiologiques et d'exploitations différentes, révélant différentes catégories de lagunes, en fonction de la répartition géographique, de la superficie et de la profondeur moyenne. Le tableau I présente les caractéristiques des 10 principales lagunes en Tunisie.

Selon le Ministère de l'Environnement et du Développement Durable de la Tunisie (Direction Générale de l'Environnement et de la Qualité de la Vie - DGEQV), l'ensemble de ces lagunes font l'objet d'une pêche traditionnelle basée sur la migration des poissons aux cours des dernières années, des activités aquacoles diverses se sont greffés à ces lagunes. L'enrichissement récent de ces milieux, provoqué par les fermetures et les obstructions des graus, les rejets aquacoles et la pollution urbaine, s'est manifesté par des blooms presque cycliques aboutissant à des perturbations des milieux et de mortalités au niveau des peuplements. La diversité biologique des lagunes de Tunisie est riche de 200 espèces de

microflores, 142 espèces de macroflore, 95 espèces de microfaune et 250 espèces de macrofaune 45 poissons, 2 tortues, 1 mammifère aquatique et plus de 220 oiseaux (source : http://www.chm-biodiv.nat.tn)

Tableau I : Caractéristiques des principales lagunes de la Tunisie (source : http://www.chm-biodiv.nat.tn).

Lagunes	Superficie (ha)	Profondeur (m)	Activités	Rendement kg/ha/an	Espèces communes	Echanges mer/lagunes
Ichkeul	8500	1	réserve pêche	7 à 9	mugilidae sanguilles	Oued Tinja écluse
Bizerte	15000	7	pêche aquaculture	7 à 10	sparid ae huitre/moule	Canal de Bizerte
Ghar El Melh	2800	1	pêche	15 à 25	mugilidae anguilles	Passe
Tunis	2900	1,5	pêche	13 à 30	anguilles mugilidae	Canal Kheireddine Canal Rades
Korba	175	0,5	aquaculture		mugilidae	Passe
Hergla	800	0,5	pêche		anguilles sparidae	Oued
Khneiss	340	1	pêche aquaculture		sparidés mugilidae	Hauts fonds
Bou Grara	50000	7	pêche aquaculture	6 à 11	sparidés mugilidae	Canal Ajim El Kantara
Biban	30000	5	pêche	9 à 25	sparidae mugilidae moronidés	Passes

3. PRESSIONS ANTHROPIQUES SUR LA MEDITERRANEE ET SES ECOSYSTEMES LAGUNAIRES

La mer Méditerranée est l'une des bassins semi-fermés les plus pollués du monde. Des millions de tonnes de déchets toxiques sont jetées directement en mer par l'industrie. D'autres facteurs tel que le transport maritime, la pollution urbaine et agricole avec les effets de tourisme contribuent à la pollution de la mer Méditerranée. La Tunisie est un pays s'ouvrant sur la mer méditerranée souffre de la pollution et ses dangers sur les espèces marines et la santé humaine. La situation est de plus en plus aggravée suite à la succession de milliers de facteurs qui engendrent des effets nuisibles sur la faune et la flore.

3.1. Les facteurs anthropiques de la pollution méditerranéenne

3.1.1. Littoralisation, urbanisation et industrialisation

De 1970 à 2000, la population de l'ensemble des pays riverains de la Méditerranée a crû fortement, de 285 millions à 427 millions d'habitants, soit 50 % au total dont 14 % pour les pays de la rive Nord et 101 % pour les pays des rives Est et Sud, ils mettent en évidence deux phénomènes : la littoralisation et l'urbanisation (OPECST, 2011).

Le processus de littoralisation, soit la concentration des hommes et des activités sur les littoraux, est initialement engagé par la migration des populations rurales des arrière-pays vers les zones côtières. Cette densification des littoraux atteint aujourd'hui des stades avancés sur certains rivages des côtes méditerranéennes (Liziard, 2013). Au total, les populations côtières sont passées de 96 millions d'habitants à 145 millions entre 1970 et 2000, soit 51 % d'augmentation dont 17,2 % pour la rive Nord et 84 % pour les rives Est et Sud (OPECST, 2011). Cette croissance de la population côtière continue à exister jusqu'à l'année 2015.

Ce mouvement de littoralisation s'est accompagné d'une croissance des implantations urbaines. La population urbaine des régions côtières, mesurée par les agglomérations de plus de 10000 habitants, a également progressé en 2000. Les rives de la Méditerranée comprennent 85 villes dont la population évolue entre 300 000 et un million d'habitants et 601 villes de plus de 10000 habitants (OPECST, 2011). Cette pression démographique et tous les aménagements qui en découlent sont directement liés à la fragilisation des milieux naturels et notamment des lagunes. Etroitement liées à la pression démographique, quatre principales menaces sont identifiées sur les écosystèmes lagunaires :

- Les atteintes hydromorphologiques perpétrées en partie lors du développement touristique de masse (urbanisation, voie de communication…).
- Les apports du bassin versant à l'origine d'une dégradation de la qualité des eaux (eutrophisation, pollution toxique).
- Les usages à l'origine d'incohérences de gestion des milieux (surfréquentation, etc.), compte tenu des besoins souvent contradictoires.
- La compétition biologique (espèces envahissantes).

Depuis 30 ans, le monde méditerranéen évolue vite et on voit croître le nombre des branches industrielles et le nombre des localités animées par l'industrie. Cette industrie méditerranéenne fait peser une menace tellurique réelle. Certaines pollutions industrielles

correspondent à des industries déjà anciennes dans la rive Nord (textile, engrais, chimie, cimenterie, etc.) mais qui ont été transférées depuis une vingtaine d'années sur la rive Sud de la Méditerranée. Ces activités industrielles sont assez « sales » et la plupart du temps très peu contrôlées. C'est le cas du phosphogypse qui est rejeté dans le golfe de Gabès, de l'industrie du delta du Nil ou de celle de l'aire d'extension urbaine d'Istanbul (OPECST, 2011).

Dans le cas de la Tunisie, les principaux pôles urbains, industriels et touristiques se sont développés dans les zones côtières notamment orientales : 65% des agglomérations urbaines et 94% des capacités hôtelières sont concentrées sur 250 km (Euronet Consortium, 2012). Les industries lourdes et les centrales énergétiques les plus importantes sont concentrées également sur le littoral ou sur des lacs en communication avec la mer, avec des apports directs de pollution (Gabès, Sfax, Sousse, Tunis, Bizerte). L'urbanisation a connu un développement exceptionnel au cours des 50 dernières années, suite à l'exode rural et au développement industriel. Cette congestion des zones littorales se traduit par une métropolisation et une pression croissante sur les ressources naturelles marines, par l'érosion côtière, et autres dysfonctionnements et pollutions diverses. Les principaux problèmes environnementaux sont les eaux usées industrielles et urbaines, les déchets solides industriels (phosphogypse) et urbains, et l'urbanisation côtière (EEA, 2006). Les zones les plus menacées sont indiquées sur la figure 2.

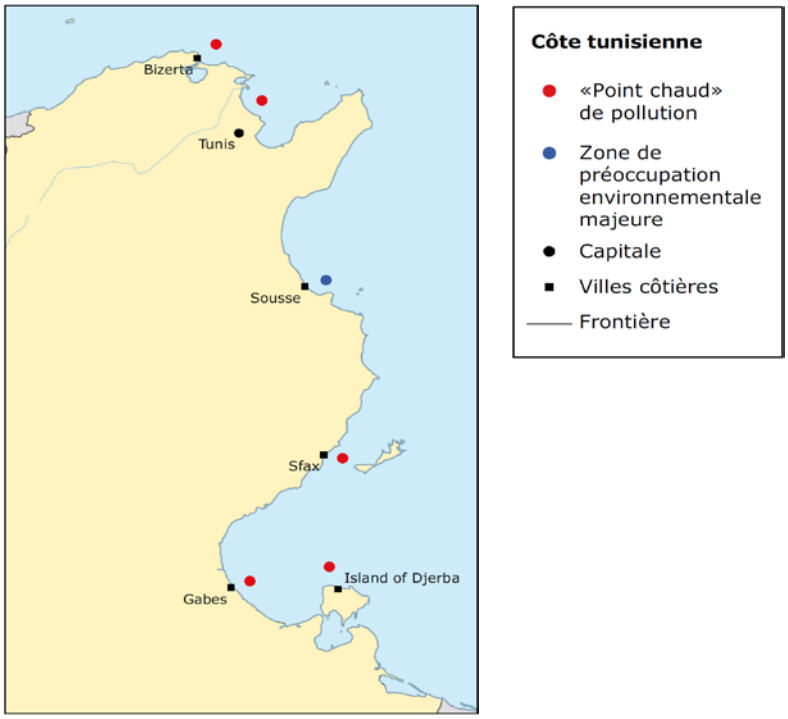


Figure 2 : Côte tunisienne avec les zones de préoccupation environnementale majeure et les «points chauds» de pollution (EEA, 2006).

3.1.2. Tourisme

Le bassin méditerranéen concentre 31 %, soit le tiers, du tourisme mondial (OPECST, 2011). Ce dernier constitue l'une des sources de revenus les plus importantes de nombreux pays méditerranéens. L'une des caractéristiques du tourisme méditerranéen est qu'il est de type balnéaire et donc largement concentré sur le littoral, déjà surchargé. On ne peut pas nier les bénéfices économiques qu'il représente pour la région. Cependant, il a joué un rôle majeur dans la dégradation de l'environnement marin et côtier. Le littoral méditerranéen a subi une profonde modification avec une importante phase d'aménagements touristiques (ports de plaisance, stations balnéaires et voies de communication), cet aménagement a été encouragé par les gouvernements des pays méditerranéens pour répondre à la demande. Ce développement et cette surpopulation ont engendré de graves problèmes d'érosion et de pollution en de nombreux points du pourtour méditerranéen. De plus, le tourisme se concentre souvent dans des zones où la nature offre les plus grandes richesses et constitue une grave menace pour les habitats d'espèces méditerranéennes en danger. Concernant les lagunes, les aménagements touristiques ont entraîné par endroit le fractionnement des milieux lagunaires et une dégradation hydromorphologique (enrochement des berges des lagunes,…) qui perturbent les échanges hydrauliques des lagunes avec la mer et leurs zones humides périphériques.

En Tunisie, le tourisme est d'un développement ancien et présente une augmentation spectaculaire et est essentiellement localisé sur le littoral principalement (95% des activités touristiques). Selon le programme MedWetCoast, 35% des espèces (tous taxons confondus) seraient menacées sur les côtes de la Tunisie (CAR/ASP, 2003).

3.1.3. Agriculture, pêche et aquaculture

Le monde agricole méditerranéen n'a pas échappé à la modernisation, avec son corollaire de restructuration, d'amendements en nitrates et en phosphates et d'emploi de pesticides, dont l'exutoire final est la mer. Si ces épandages d'engrais et de pesticides commencent à être plus mesurés sur la rive Nord, ils sont très présents au Sud et à l'Est de la Méditerranée. Les quantités de phosphore et azote arrivant en Méditerranée en provenance de l'agriculture ont été estimées respectivement à 976000 t/an et à 1 570000 t/an (EEA, 2006). Outre un usage excessif des pesticides, l'agriculture est une source de pollutions :

- chimique, du fait du stockage incontrôlé de pesticides interdits (polluants organiques persistants) depuis des décennies dont les installations sont lessivées, en cas de fortes pluies vers les bassins versants, puis vers la mer.

- physique, du fait de la présence, aux fins d'irrigation, d'une centaine de barrages réservoirs qui bloquent les limons et accroissent l'érosion naturelle des zones côtières.

La pêche s'effectue souvent sur les zones où les biotopes sont les plus riches. Elle a augmenté en Méditerranée à raison de 48 % environ depuis 1970 avec une forte exploitation des stocks vivant dans les fonds et des stocks de gros poissons pélagiques comme les thons et les espadons (EEA, 2006). La situation de certaines espèces méditerranéennes d'importance économique et commerciale est alarmante du fait de la surexploitation des stocks. Plus de 65% des stocks commerciaux sont surexploitées (UNEP/MAP, 2012). La perturbation physique du fond de la mer par la traction des engins de pêche peut causer des altérations à long terme des habitats fragiles et affecter le nombre et la diversité des organismes qui y vivent.

Les activités aquacoles méditerranéennes en eau de mer, en eau saumâtre ou encore en eau douce sont en plein développement (OPECST, 2011). Bien que l'aquaculture offre des avantages économiques considérables, elle peut aussi avoir un impact sur la biodiversité locale. Elle a plusieurs effets nocifs pour le milieu marin: la pollution organique et l'eutrophisation à partir de déchets et la nourriture non consommée (dans certains cas, conduit à l'hypoxie et l'anoxie locale); la dégradation des habitats benthiques sous les cages ; libération des antibiotiques et des biocides; propagation des agents pathogènes benthiques et l'introduction d'espèces non-indigènes (UNEP/MAP, 2012 ; CIESM, 2007).

3.1.4. Trafic maritime

La situation géographique de la mer Méditerranée est très importante, pour cette raison cet espace est une route maritime stratégique pour transporter les personnes et les marchandises surtout les hydrocarbures et les produits pétro-chimiques. La Méditerranée permet les échanges de produits manufacturés entre l'Europe et l'Asie et l'approvisionnement de l'Europe en produits énergétiques à partir des pays du Golfe. Environ 24 % du tonnage des marchandises est composé de produits énergétiques. Les capacités de transport maritime en circulation en Méditerranée ont augmenté de plus de 50 %, entre 1997 et 2006. La croissance annuelle du transport de pétrole s'est élevée à 6 % du transport maritime ; elle est de 7 à 8 %

pour le transport de gaz naturel liquéfié, de 10 % pour les conteneurs et de 5 % pour le roulier. Le fort taux de croissance du trafic conteneurs, est dû au développement des échanges avec l'Asie (Plan Bleu, 2010).

Le transport maritime représente une source de pollution moindre que la pollution tellurique. Mais la nature des produits concernés, la pollution chronique par les hydrocarbures et la menace réelle d'un accident pétrolier majeur dans une mer semi-fermée font qu'il constitue un facteur de risque non négligeable. Les rejets des bateaux en mer peuvent être volontaires ou accidentels du fait de collisions, d'avaries, d'échouages, de chute de conteneurs ou de pertes de filets, de cordes et de lignes. Les rejets volontaires sont dus au fonctionnement des navires. Ils peuvent être licites ou non et concernent tous types de produits dont surtout des hydrocarbures (CGDD-SOeS, 2011). Il est estimé qu'environ 220000 navires de plus de 100 tonnes croisent en Méditerranée chaque année, déversant 250000 tonnes d'hydrocarbures (EEA, 2006). Ce déversement est le résultat d'opérations de navigation tels que :

- le dégazage : opération consistant à débarrasser une cuve de carburant ou de pétrole brut, des gaz et traces de produit qui subsistent une fois la cuve vidée ;
- le déballastage : vidange des ballasts pour corriger l'assiette d'un navire, ces ballasts pouvant être des cuves à carburant remplies d'eaux souillées ;
- le rejet des résidus d'huile et de carburant : résidus dus au filtrage du fioul lourd avant son utilisation comme carburant, eaux huileuses provenant des séparateurs…

Environ 80000 tonnes d'hydrocarbures ont été déversées accidentellement dans la mer Méditerranée et dans ses parages durant la période 1990-2005 en raison d'accidents de la navigation. Les quatre principaux sont responsables de 77 % de la quantité déversée accidentellement (EEA, 2006).

B. Polluants majeurs en Méditerranée: Les hydrocarbures et les métaux lourds

La pollution du bassin méditerranéen est causée par les rejets d'origine naturelle ou anthropique arrivant en mer par les fleuves, l'air, le drainage des territoires littoraux ou par rejet direct en mer (navires et émissaires de rejet en mer). Les polluants ont des origines diverses et prennent différentes formes : sacs plastiques, conteneurs tombés d'un navire, nappes d'hydrocarbures, matières organiques, nitrates, métaux lourds, substances pharmaceutiques, pesticides…

Les rivières, les estuaires, les mers côtières et les abysses forment un continuum écologique où les polluants transitent. D'après le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE), plus de 80 % de la pollution des mers proviennent de la terre via les fleuves ou par ruissellement et déversement à partir des zones côtières. Près de 20 % des pollutions marines ont pour origine les activités en mer dont les rejets d'hydrocarbures ou d'autres substances chimiques, les pertes de cargaison ou les immersions de déchets et les rejets atmosphériques (CGDD-SOeS, 2011). Le faible renouvellement des eaux rend la mer Méditerranée un écosystème très vulnérable à l'accumulation de ces polluants. Dans ce travail on s'est intéressé à deux types de polluants différents ; les hydrocarbures (contaminants organiques) et les métaux lourds (polluants inorganiques) qui représentent les contaminants majeurs dans la mer méditerranéenne.

1. LES HYDROCARBURES

1.1. Composition chimique des hydrocarbures

Les hydrocarbures sont des molécules formées d'une association d'atomes de carbone et d'hydrogène ayant une formule générale (Cx, Hy). Les hydrocarbures sont groupés selon leur composition chimique en trois grandes classes à savoir : les hydrocarbures saturés et insaturés non aromatiques, les hydrocarbures aromatiques et les hydrocarbures lourds. Ces trois classes d'hydrocarbures sont présentes aussi bien pour les hydrocarbures d'origine biogène et pétrolière, à l'exception des alcènes qui sont absents dans les pétroles. La figure 3 représente les différents types des hydrocarbures qui sont présent dans les pétroles bruts et leurs teneurs.

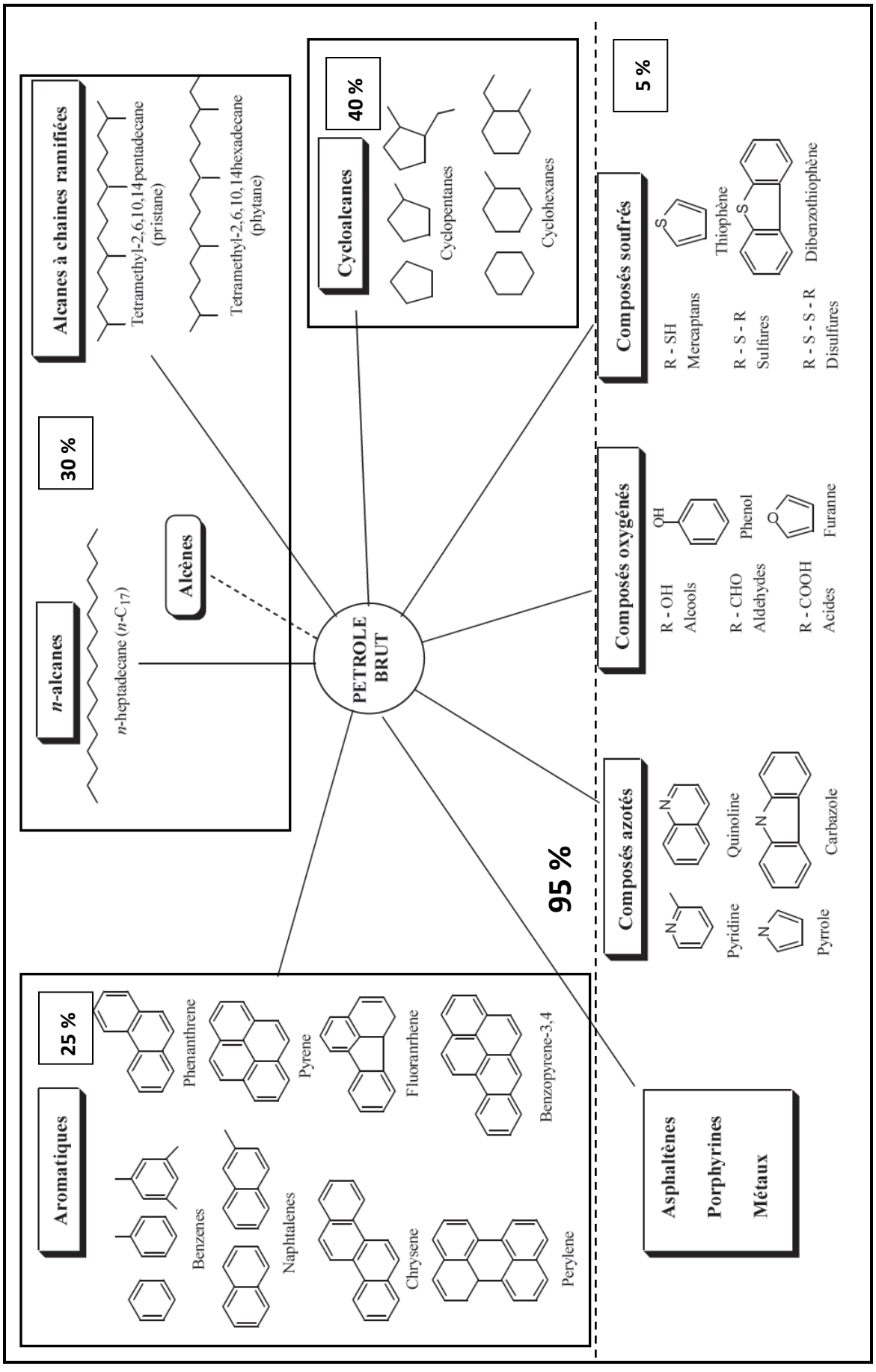


Figure 3 : Ensemble des hydrocarbures présents dans les pétroles bruts (d'après Bertrand et Mille, 1989).

Un hydrocarbure aromatique est une substance dont les molécules possèdent de 1 à 7 cycles benzéniques de formule générale C_nH_{2n-6} (Conjan et Renard, 1999). Ces hydrocarbures peuvent être mono-aromatiques, di-aromatiques ou polyaromatiques et des ramifications aliphatiques peuvent être associées. Des études ont suggéré que les hydrocarbures aromatiques pourraient être produits par plusieurs organismes (algues, plantes ou bactéries) cependant, d'autre études démontrent que ces hydrocarbures sont simplement accumulés dans les organismes (Borneff et al., 1968; Hase et Hite, 1976) et sont donc exclusivement anthropogéniques. La classe des hydrocarbures aromatique la plus étudiée est celle des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont des molécules composées d'au moins deux noyaux aromatiques accolés. Ils diffèrent par le nombre de noyaux accolés ainsi que par leur agencement. A ce jour, environ 130 HAPs sont identifiés mais seulement 16 sont généralement recherchés dans les études environnementales (figure 4). Ce sont les composés définis comme polluants prioritaires par l'agence environnementale américaine (US-EPA) et considérés comme les plus toxiques de cette famille (Keith et al., 1979). On considère généralement les HAPs légers qui possèdent 3 cycles ou moins, et les lourds qui présentent plus de 3 cycles.

Les HAPs sont très stables, peu volatils et hydrophobes, leur stabilité chimique et leur hydrophobicité augmente avec le nombre de cycles et la masse moléculaire (Kim et al., 2013). Ces propriétés les rendent relativement résistants à la biodégradation. De ce fait, ils persistent dans l'environnement, faisant courir un risque sanitaire. En effet, des études ont montré que certains HAPs sont génotoxiques, mutagènes et cancérigènes (Randerath et al., 1999). En fonction de la présence de groupement alkyle, les HAPs peuvent avoir diverses origines. La présence de groupement alkyle sur les noyaux aromatiques indique un précurseur biologique ayant subi une réaction d'aromatisation lors de la diagenèse. Les HAPs non alkylés proviennent de la combustion de biomasse végétale (Youngblood et Blumer, 1975). Les HAPs peuvent avoir deux origines majeures. La plus importante est la source pyrolytique qui correspond à la combustion incomplète de la matière organique (forêt, charbon, pétrole, transports) à haute température aboutissant à leur émission dans l'atmosphère. La seconde est pétrogénique correspondant aux déversements de pétrole dans l'environnement (naturels ou d'origine anthropique). Les fossiles combustibles, comme le charbon et la houille, contiennent

des HAPs. Ils sont peu dégradables. Il existe un autre mode de formation qualifié de « biogénique ». Cela signifie que certains organismes vivants, microscopiques (champignons, plantes, ou bactéries) sont susceptibles de synthétiser une grande variété de précurseurs de HAPs (Young et Cerbiglia, 1995). Toutefois, l'existence de ce mode de formation reste controversée. Les HAPs de faible poids moléculaire sont en grande partie présents dans l'atmosphère sous forme gazeuse. Les HAPs ayant cinq noyaux et plus se retrouvent surtout sous forme particulaire.

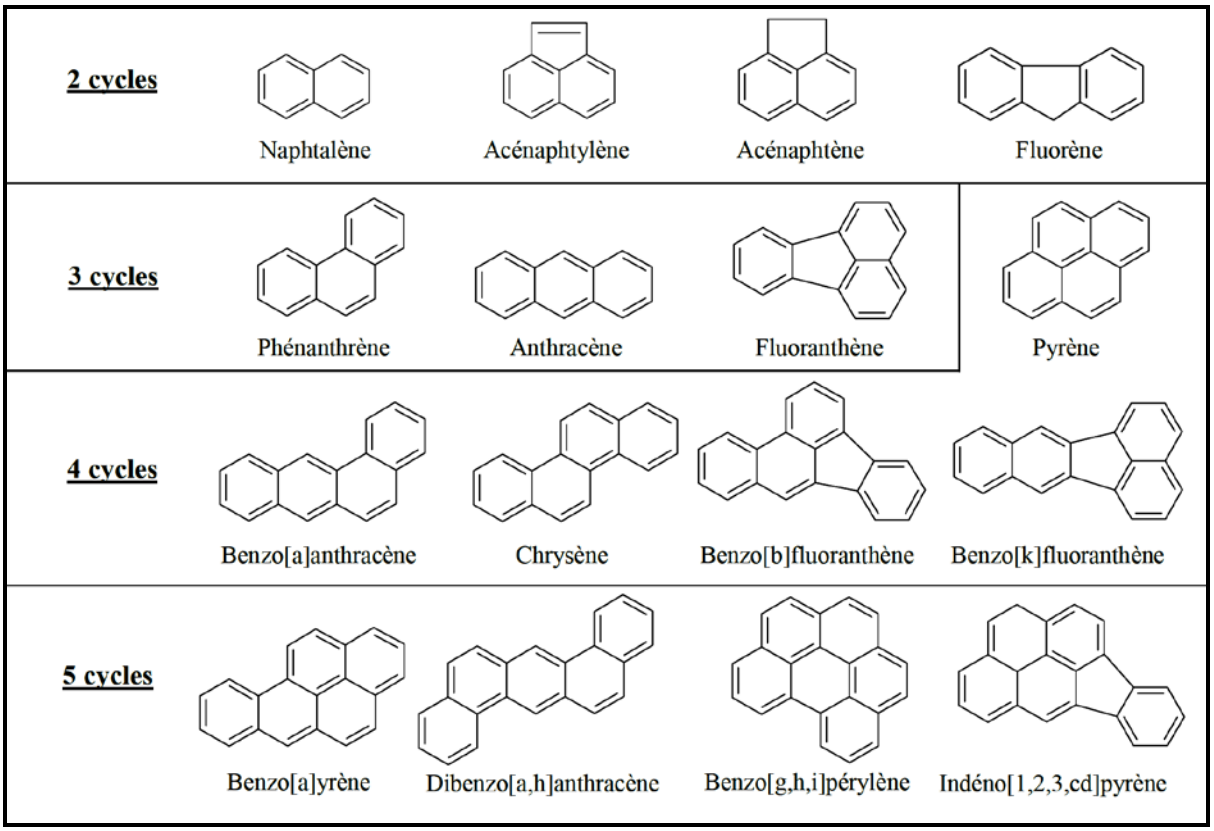


Figure 4 : Liste des HAPs prioritaires selon les recommandations de l'US-EPA (Wilson et Jones, 1993).

1.2. Sources des hydrocarbures en milieu marin

Les hydrocarbures représentent la plus importante source de pollution des eaux océaniques. Cette pollution peut être accidentelle ou volontaire (Galaf et Ghannam, 2003). Ainsi les sources des hydrocarbures en milieu marin peuvent être naturelles et/ou anthropogéniques.

1.2.1. Origines naturelles des hydrocarbures en milieu marin

- *Suintements sous marins*

En raison de différence de pression, de densité et de perméabilité des roches, le pétrole a été souvent déplacé, de la zone de formation vers d'autres zones. Une partie atteint la surface de la terre au niveau des bassins sédimentaires érodés ou des failles pour former des suintements naturels dans le fond marin (Mcloughlin, 1986). La contribution de ces hydrocarbures en milieu marin s'élève à 47 % de l'ensemble des hydrocarbures rejetés. Des estimations données par Lacaze (1980) ont considéré que 0,6 millions de tonnes d'hydrocarbures par année ont une origine géochimique.

- *Diagenèse précoce de la matière organique*

La diagenèse précoce de la matière organique dans les gisements sous marins est le résultat de la combinaison de plusieurs processus biologiques, chimiques et physiques (bioturbation, décomposition de la matière organique par l'activité bactérienne et des phénomènes de recristallisation/dissolution) (Cojan et Renard, 1997) qui peuvent accélérer la maturation de la matière organique déposée à la surface des sédiments sous forme de pétrole.

- *Libération lors des feux naturels de forêts*
- *Origine biogène*

Les hydrocarbures peuvent être biosynthétisés et libérés dans le milieu marin par l'activité métabolique des organismes aquatiques et terrestre ou par la décomposition de leurs matières organique (Zaghden et al., 2007; Mille et al., 2007). D'après le « National Research Council » (1985) l'apport en hydrocarbures biogènes à l'océan est d'environ 180 millions de tonnes/an.

1.2.2. Origine anthropique des hydrocarbures

La pollution anthropique par les hydrocarbures résulte de plusieurs activités liées à l'extraction du pétrole, à son transport et en aval à l'utilisation de produits finis (carburants, lubrifiants,…).

1.2.2.1. Sources pyrolytiques

En milieu marin une provenance atmosphérique des hydrocarbures est possible suite à la combustion incomplète de la matière organique (incinération, fumée des voitures, fumées

industrielles, incendies…). Les hydrocarbures d'origine pyrolytique peuvent parvenir en milieu marin soit par dépôt direct sec ou humide rabattues par les eaux de pluie, soit indirectement suite au déversement des déchets de lessivage des sols et des zones urbaines dans la mer (Bousquet, 2003).

1.2.2.2. Sources pétrogéniques

Bien que les règlementations soient de plus en plus contraignantes, la quantité de pétrole déversée dans la mer Méditerranée demeure aujourd'hui encore élevée.

- *Rejets industriels et domestiques des hydrocarbures*

Les rejets industriels et domestiques des stations d'épuration contiennent des quantités non négligeables en hydrocarbures suites à leurs utilisations en tant que sources d'énergie et de matière primaire pour divers produits tout au long de la chaîne industrielle. D'après les estimations, 77% environ de la charge de pollution atteignant les océans sont liés à des sources terrestres (44% provenant des eaux de ruissellement et des décharges directes terrestres et 33% provenant de l'atmosphère). Le reste provient du transport maritime (12%), des décharges en mer (10 %), de l'exploration et de l'exploitation off-shore des ressources minérales, en particulier du pétrole (1%) (Pizon, 2005).

- *Activités pétrolières*

Les activités pétrolières engendrent une contamination continue et chronique des points de rejets souvent marins et aussi peuvent causer des déversements accidentels au cours des différentes étapes des activités pétrolières: les fuites des oléoducs, les opérations de vidange réalisées par les pétroliers en mer, les opérations offshore (rejet des eaux de gisement), rejet urbain (Raffineries et industries pétrochimiques installées dans des zones portuaires). En Méditerrané, 9000 trajets de pétroliers, transportant plus de 400 millions de tonnes de pétrole brut, ont été enregistrés en 2006. D'après certaines études, environ 0,1% du pétrole brut transporté est délibérément déversé dans la mer chaque année à la suite d'opérations de nettoyage des citernes (UNEP/MAP, 2006). Tous les autres types de navires sont également des sources potentielles de rejet de déchets pétroliers. La quantité de HAPs pénétrant la mer Méditerranée varie selon les types et les quantités de pétrole rejetés. Les entrées annuelles sont estimées entre 0,3 et 1000 tonnes (EEA, 2006). La quasi-totalité (99%) des rejets d'hydrocarbures d'origine minérale et de phénols sont déclarés par le secteur du

raffinage pétrolier de quelques pays méridionaux tels que l'Egypte, la Libye, l'Algérie et la Tunisie. Ce secteur est aussi responsable de 66% des rejets de composés organiques volatils.

Aussi et dans le cadre des activités pétrolières, il est important de noter la contribution des accidents pétroliers. Au cours de la dernière décennie, 47 % des accidents ayant conduit à des déversements importants (plus de 100 tonnes) ont eu lieu dans l'ouest de la Méditerranée. Un tiers (33 %) des accidents ont eu lieu dans l'est de la Méditerranée et un cinquième des accidents en Méditerranée centrale (PNUE/PAM, 2012).

1.3. Devenir des hydrocarbures en milieu marin

Une fois déversé en mer, le pétrole est soumis à différents processus qui vont entraîner des modifications de son aspect général et de ses caractéristiques physico-chimiques. La figure 5 illustre les sources des hydrocarbures et les différents processus qu'ils peuvent subir en milieu marin. Ces processus sont soumis au contrôle de facteurs abiotiques et biologiques.

1.3.1. Dégradation abiotique

- **L'évaporation** : qui, selon le type de pétrole, peut affecter la quasi totalité ou une partie insignifiante du pétrole déversé. Elle agit sur les fractions légères et elle s'intensifie lorsque l'étalement des hydrocarbures est important. L'agitation de la mer et des vents favorisent fortement l'évaporation (Harrisson et al., 1975).
- **La photo-oxydation** : elle se produit en surface de l'eau suite à l'exposition des hydrocarbures à l'air libre et aux radiations solaires. Elle aboutit à des dérivés polaires généralement solubles dans l'eau (Marchand et Kantin, 1997). La photo-oxydation sera plus rapide lorsque les hydrocarbures sont étalés en film mince (OMI/PNUE, 2002).
- **L'émulsification** : c'est le mélange de deux fractions non miscibles : l'eau et le pétrole. Les émulsions directes « huile dans l'eau » peuvent être facilement dispersées par les courants et les mouvements de turbulence. Par contre, les émulsions de type inverse tendent vers une consistance semi-solide et sont à l'origine des boulettes de goudron, que l'on trouve échouées sur la côte. L'émulsification est un facteur très important dans la disparition du pétrole de la surface de la mer (Bertrand et Mille, 1989).
- **La dissolution** : la solubilité des hydrocarbures dans l'eau est très faible. Généralement, la dissolution des hydrocarbures est d'autant plus importante que sa masse moléculaire est faible est que sa polarité est élevée. Il est à noter qu'aux températures d'ébullition égales, les hydrocarbures aromatiques sont beaucoup plus solubles que les hydrocarbures aliphatiques

(Marchand et kantin, 1997). La présence de sels minéraux contribue à réduire l'espace limité disponible pour les molécules d'hydrocarbures. En fait, plus l'eau de mer est salée (c'est le cas de la Méditerranée) et plus la dissolution est faible.

- **La sédimentation** : elle résulte de l'augmentation de la densité du pétrole par rapport à celle de l'eau de mer. Divers processus interviennent dans l'accroissement de cette densité, à savoir l'évaporation, la dissolution des composés légers, l'oxydation des paraffines, la formation d'agrégats et l'adsorption du pétrole dispersé sur les particules en suspension. Les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques à haut poids moléculaires, sont plus facilement adsorbés par les matières organiques particulaires et colloïdales et donc incorporés plus rapidement dans les sédiments (Bertrand et Mille, 1989).

1.3.2. Facteurs biologiques

- **La biodégradation** : La biodégradation des hydrocarbures par les bactéries et les champignons marins contribue de façon significative à la transformation des hydrocarbures en produits oxydés. La vitesse de dégradation dépend de la chaleur, des éléments nutritifs et de la teneur en oxygène dissous ainsi que du type d'hydrocarbure. Les composés les plus légers se dégradent plus vite que ceux qui ont un poids moléculaire élevé (Sauer et al., 1993).
- **Pénétration dans la chaîne alimentaire** : Suite à leur exposition à des composés pétroliers variés, plusieurs organismes marins tels que les organismes planctoniques, les invertébrés (bivalves) et les poissons, peuvent accumuler les hydrocarbures sous forme de vésicules intracytoplasmique (Bertrand et Mille, 1989). Les organismes planctoniques qui sont solidaires des masses d'eau dans lesquelles ils sont en suspension, sont incapables d'éviter les zones contaminées par des déversements pétroliers et ils incorporent ainsi les hydrocarbures directement dans leurs cellules ce qui constitue une voie de pénétration de ces composés dans la chaîne alimentaire. Par conséquent une altération affectant le plancton se répercute forcement sur les niveaux trophiques les plus élevés de la chaîne alimentaire (Lacaze, 1980).

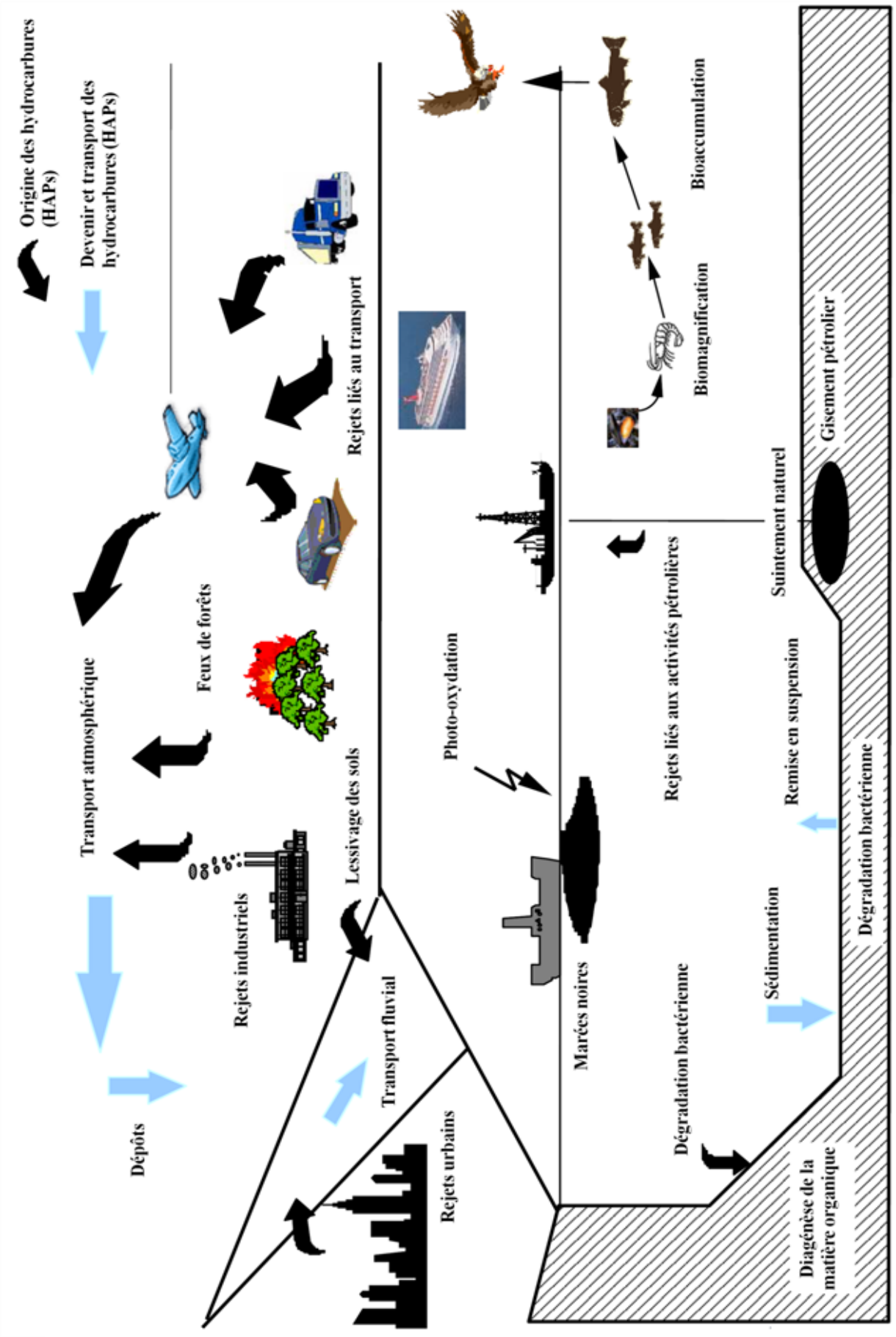


Figure 5 : Cycle biogéochimique des hydrocarbures (d'après McElroy et al., 1989, *dans* Le Dû-Lacoste, 2008).

1.4. Conséquences de la pollution marine par les hydrocarbures sur la biocénose

La libération des hydrocarbures en milieu marin a des conséquences graves aussi bien sur le plan économique que sur le plan écologique. Les hydrocarbures déversés en mer, peuvent influencer l'équilibre écologique et parfois entraîner la destruction de l'écosystème (Bouchez et al., 1996). Ceci se traduit par des plages souillées, des oiseaux englués et des faunes et flores aquatiques en danger. La contamination par ces composés pourrait être immédiate ou à long terme.

Les produits pétroliers rejetés dans le milieu marin ont des répercussions énormes sur la faune et la flore marines. Le colmatage de la surface par les nappes peut entraîner l'absence d'échanges gazeux à l'interface. Le pétrole peut également se «dissoudre » sous forme de gouttelettes dans la masse d'eau, voire sédimenter sous la forme de fractions vieillies et ainsi atteindre les organismes pélagiques et benthiques. La contamination est généralement mécanique (alourdissement du corps, trouble des mouvements, trouble de respiration) ce qui causent dans la majorité des cas une mortalité immédiate. Certaines espèces éprouvent des changements de comportements ou des problèmes de santé à court terme, d'autres espèces éprouvent des effets toxiques instantanés et aigus parfois mortels (OMI/PNUE, 2002).

En milieu marin tous les niveaux trophiques sont vulnérables à la contamination par les hydrocarbures commençant des planctons aux mammifères marins. En effet toute altération affectant le plancton se répercutera sur les niveaux trophiques plus élevés (les organismes auxquels il sert de nourriture) (Tukivène, 1995). Les mollusques et les crustacés de mer (huître, moule, crevette, crabe) sont les plus susceptibles d'accumuler les hydrocarbures à cause de leur mode de vie. Ils ont une aptitude naturelle à bioaccumuler des contaminants même si la concentration est faible dans le milieu pollué ou si la source est éliminée. Les crustacés qui se nourrissent de détritus ou de particules en suspension seront affectés par perturbation de leur taux de reproduction (réduction du taux d'éclosion) ou leurs habitudes alimentaires. Par contre, les huîtres accumulent moins d'hydrocarbures que les moules, car elles sont capables de se fermer pendant des périodes assez longues une fois soumises à l'agression d'un agent chimique toxique. Les moules, par contre, ne peuvent pas empêcher les polluants de pénétrer.

La génotoxicité, la cancérogénicité, l'effet sur la reproduction et le développement (Arkoosh et al., 1996 ; Johnson et al., 1998 ; Rice et al., 2000) et l'immunotoxicité de certains hydrocarbures tels que les HAPs (Reynaud et Deschaux, 2006) ont été principalement mis en

évidence à des degrés divers selon les HAPs. Les mécanismes de toxicité des hydrocarbures sont en général liés à leur métabolisation. Une fois dans la cellule, ces composés sont pris en charge par des systèmes enzymatiques de métabolisation de phase I (oxydation) qui vont contribuer à diminuer leur hydrophobicité en vue d'une excrétion ultérieure. Certains métabolites sont cependant hautement réactifs et peuvent soit contribuer à la production d'espèces réactives d'oxygènes (ERO) et ainsi à un stress oxydant ou bien directement interagir avec les composants cellulaires tels que l'ADN pour former des adduits ou générer des cassures (Akcha et al., 2000a, 2000b). Une contamination par les HAPs peut aussi affecter le système immunitaire des organismes. Des échantillons prélevés *in situ* et *in vivo* ont montré une diminution du nombre d'hémocytes circulants (Fournier et al., 2002 ; Oliver et al., 2001) pouvant provenir de la lyse cellulaire, d'une diminution du recrutement ou du départ des cellules du système circulatoire vers les tissus (Pipe et Coles, 1995). De nombreux hydrocarbures aliphatiques présentent des risques toxicologiques, mutagènes voire même cancérigènes pour de nombreux organismes dont l'Homme (Spencer et al., 2002). Cependant, les mécanismes d'action des hydrocarbures aliphatiques au niveau cellulaire sont assez mal connus comparés à ceux des HAPs.

1.5. Contamination des bivalves par les hydrocarbures

1.5.1. Biodisponibilité des hydrocarbures

La biodisponibilité des hydrocarbures dépend des propriétés intrinsèques des molécules et des caractéristiques physico-chimiques du milieu. Dans l'eau, les hydrocarbures sont présents : sous forme dissoute, sous forme adsorbée et/ou complexée sur la matière organique dissoute et sous forme adsorbée sur les particules en suspension. Les matières organiques présentes en milieu marin peuvent avoir une origine naturelle ou anthropique. Par conséquent, elles ont différentes natures et peuvent avoir ainsi différentes influences sur la biodisponibilité des hydrocarbures qui leurs sont adsorbés. La matière organique naturelle est constituée principalement de substances humiques et elle est faiblement dégradable, alors que celle d'origine anthropique, moins hydrophobe et moins stable, est plus facilement dégradée, ce qui peut rendre les hydrocarbures plus biodisponibles (Gourlay et al., 2003). La biodisponibilité des hydrocarbures varie à travers la colonne d'eau, et entre des systèmes peu ou très profonds. Les hydrocarbures, en raison de leur caractère hydrophobe, ont tendance à s'accumuler facilement dans les sédiments où ils peuvent atteindre des concentrations 3 à 4 fois plus élevées que dans les eaux surnageantes (Notar et al., 2001). La séquestration des

hydrocarbures dans les sédiments a été mise en évidence dans différentes études (Fu et al., 1994 ; Kraaij, 2001). La séquestration des hydrocarbures tels que les HAPs se fait par piégeage dans les micropores et par les interactions avec les couches aromatiques de la matière organique (Jonker et Koelmans, 2002). Les composés de faible masse moléculaire (origine pétrogénique) se retrouvent plutôt en phase dissoute et ceux de haut poids moléculaire (origine pyrolytique) sont préférentiellement adsorbés sur la phase particulaire réduisant ainsi leur disponibilité envers les organismes (Cailleaud et al., 2007). La granulométrie peut influencer les phénomènes d'adsorption des hydrocarbures sur le sédiment et donc influencer leur distribution relative. Les particules les plus fines sont généralement enrichies en HAPs de plus grande masse moléculaire relativement aux fractions de sédiment plus grossières enrichies en HAPs de plus faible masse moléculaire (Dachs et al., 1997). Les hydrocarbures sont majoritairement présents dans la phase particulaire de la colonne d'eau. Cependant, certains facteurs peuvent augmenter la solubilité de ces contaminants comme la température, la présence de matière organique dissoute, les phénomènes de photo-oxydation ou la présence de microorganismes dégradant ces composés en une forme plus soluble (Lee, 2003 ; Viamajala et al., 2007). Par conséquent, tous les paramètres ayant un effet sur ces processus comme le pH ou la salinité auront également un impact sur la solubilité des hydrocarbures.

1.5.2. Accumulation des hydrocarbures chez les bivalves

Du fait de leur caractère hydrophobe Les hydrocarbures ingérés par un organisme vont être retenus dans les réserves lipidiques tissulaires (Lacaze, 1980) ou biotransformés puis excrétés. La bioaccumulation de ces composés organiques concerne principalement les organismes invertébrés lesquels ne possèdent que de faibles capacités de métabolisation (Neff, 1979 ; Varanasi et al., 1985). La concentration maximale d'hydrocarbures pétroliers dans les bivalves exposés au pétrole in situ ou au laboratoire se situe entre 300 et 400 µg/g. Les bivalves diffèrent par leur taux d'accumulation en hydrocarbures, qui résulte probablement de différences dans les taux de filtration et les teneurs en lipides (Bourgeat, 2002).

- **Bioconcentration**

La voie de pénétration la plus rapide étant une pénétration par simple absorption des polluants se trouvant dans l'eau de mer à travers la surface de contact et de respiration (branchies, siphons respiratoires) (Fisher, 1995). Une bioconcentration de ces polluants au

niveau tissulaire est ainsi possible. Le facteur de bioconcentration (BCF) peut être définie comme le rapport de la concentration d'un polluant dans un organisme à sa concentration dans l'eau : dans le cas des hydrocarbures (HC) par exemple, on aura BCF = [HC]organisme / [HC]eau. Il n'y a véritablement bioconcentration que si Fc > 1 (Bourgeat, 2002). Ce facteur dépend de la nature des contaminants et particulièrement de leur caractère hydrophobe.

- **Bioaccumulation**

Le facteur de bioaccumulation (BAF) est calculé pour estimer la fraction d'un contaminant issu du sédiment accumulé par un organisme (rapport entre la concentration du contaminant dans l'organisme et la concentration du contaminant dans le sédiment). Dans le cas des contaminations en HAPs, les particules les plus fines sont les plus enrichies en HAPs de haut poids moléculaire. Les organismes benthiques, vivant au contact ou à proximité des sédiments, seront exposés à un milieu enrichi en HAPs de plus haut poids moléculaire et les moins solubles (Baumard et al., 1999a).

- **Bioamplification**

Si la concentration du contaminant connaît un accroissement au fur et à mesure qu'il circule vers les maillons supérieurs d'un réseau trophique on parle de bioamplification qui peut être considérée comme un cas particulier de la bioaccumulation. Ce phénomène est rare dans les cas des hydrocarbures pétroliers et surtout pour les HAPs due à la grande capacité des organismes à métaboliser ces composés (Fisher, 1995).

1.5.3. Les facteurs influençant le mécanisme d'accumulation

Les mécanismes d'accumulation des hydrocarbures par les bivalves sont des phénomènes lents et complexes. En effet à des niveaux de contamination égale du milieu tous les bivalves n'accumulent pas les hydrocarbures d'une façon identique. Trois facteurs principaux interviennent :

- *Les variations entre les espèces*

Les taux de bioaccumulation varient dans des proportions importantes d'une espèce à l'autre.

- *Les variations saisonnières*

Les niveaux de polluants dans les organismes varient cycliquement de façon très importante selon les saisons. Cela peut être dû aux variations du métabolisme des bivalves (en

particulier effet de la reproduction), à la variabilité des masses d'eau arrivant sur la zone, ou même à la périodicité des rejets dus à l'activité humaine, si celle-ci est très marquée (Bourgeat, 2002).

- *Les variations dus à la taille des individus* (Claisse, 1992).

1.6. Biotransformation des hydrocarbures

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

Dans la quasi-totalité des cellules, il existe des systèmes enzymatiques prenant en charge le métabolisme (généralement oxydatif) de multiples composés liposolubles endogènes (hormones, acides gras, cholestérol, vitamines,...). Cette fonction enzymatique porte le nom de biotransformation. Ces systèmes enzymatiques prennent également en charge les xénobiotiques dans le but d'augmenter leur hydrosolubilité afin de faciliter leur excrétion dans les fluides biologiques.

La biotransformation des hydrocarbures s'effectue en trois phases que sont la fonctionnalisation (ou phase I), la conjugaison (ou phase II) et la phase III (figure 6). Ces processus de biotransformation se déroulent principalement au niveau du foie chez les poissons, des glandes antennaires, de l'hépatopancréas et de l'estomac chez les crustacés (Khan et al., 1972 ; Singer et Lee, 1977 ; Singer et al., 1980) et de la glande digestive chez les mollusques (Livingstone, 1989) :

1.6.1. La fonctionnalisation ou phase I

Les enzymes de cette phase ont pour rôle essentiel d'oxyder le xénobiotique de manière à le rendre plus hydrophile (addition de groupements polaires). L'oxydation se fait dans de nombreux cas par une réaction de mono-oxygénation, c'est-à-dire par une introduction d'un atome d'oxygène dans le xénobiotique. Dans certains cas, le produit de la réaction est plus toxique que la molécule initiale. Cette phase regroupe essentiellement les mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYP) et les mono-oxygénases à flavine.

Le cytochrome P450 a été étudié notamment par Stegeman et Hahn (1994) chez différentes espèces aquatiques, par Buhler et Wang-Buhler (1998) chez les poissons, par Livingstone (1991) et James et Boyle (1998) chez les crustacés ainsi que par Livingstone (1988 et 1991) chez les mollusques. Ces études montrent que de grandes différences dans les capacités de biotransformation existent entre ces organismes. Ainsi, les poissons ont un niveau de biotransformation plus élevé que celui des crustacés (crabes, homards, crevettes), lui-même supérieur à celui des mollusques (moules, huîtres, palourdes, coques, coquilles Saint-Jacques, balanes), alors que les mammifères ont généralement des capacités plus importantes que les poissons.

1.6.2. La conjugaison ou phase II

La majeure partie des métabolites issus de la phase de fonctionnalisation est ensuite prise en charge par les enzymes dites de phase II (George, 1994). Cette phase consiste en la liaison des molécules oxydées avec des groupements hydrophiles dans le but de favoriser leur excrétion (Vermeulen et al., 1992 ; Commandeur et al., 1995). Ces molécules hydrophiles peuvent être l'acide glucuronique, l'acide sulfurique, le glutathion, des acides aminés (Foureman, 1989 ; James et Boyle, 1998). Parmi les enzymes actives dans cette phase, on trouve les glutathion-S-transférases (GST), les UDP-glucuronosyle-transférases (UGT), les sulfotransférases (ST) et les époxydes hydrolases (EH). Dans la plupart des cas, les molécules résultant de l'action des enzymes de phase II sont beaucoup moins toxiques que les xénobiotiques de départ. Cependant, ces enzymes sont parfois impliquées dans l'activation de composés carcinogènes.

1.6.3. La phase III

Cette phase met en action des protéines membranaires capables d'expulser hors de la cellule un xénobiotique modifié ou non par les enzymes de phase I et / ou de phase II. Le mode d'action de ces protéines repose sur un mécanisme ATP-dépendant. Chez les mammifères, la protéine de phase III la plus étudiée est la protéine MRP (multidrug resistance related protein) (Parant, 1998).

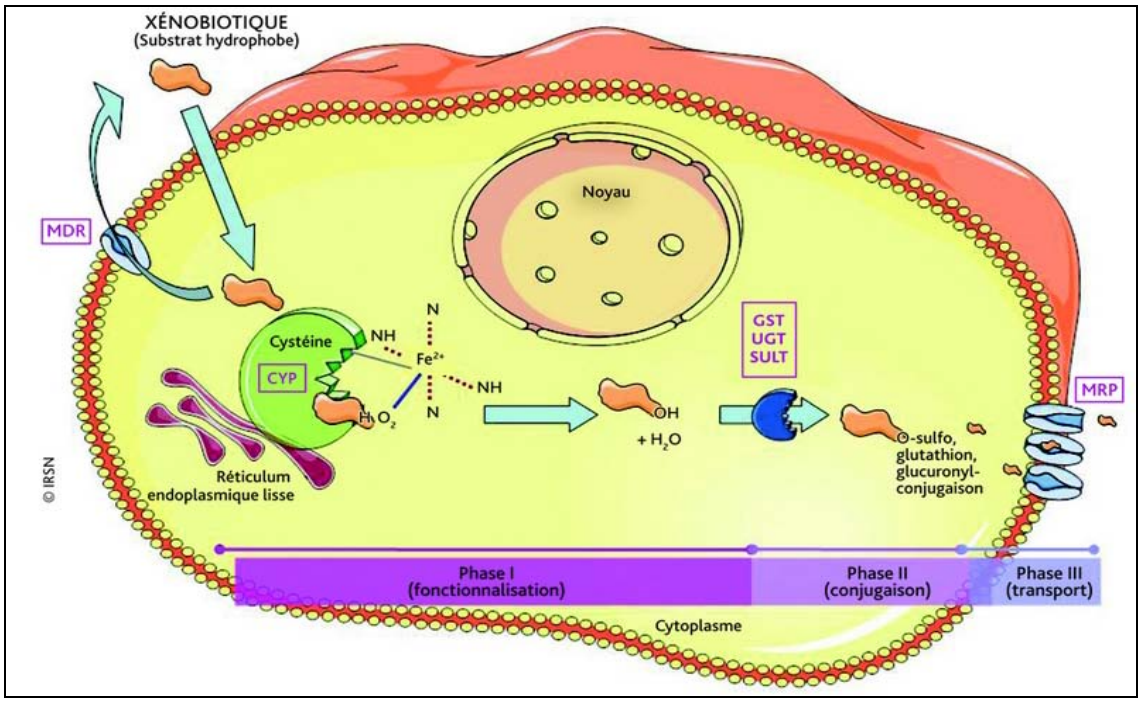


Figure 6 : Métabolisme des hydrocarbures au niveau cellulaire (d'après Beaune et Loriot, 2000).

1.7. Outils d'identification des sources des hydrocarbures: approche moléculaire

L'étude de la distribution des alcanes linéaires, ramifiés et polycycliques (marqueurs biogéochimiques) et des HAPs dans l'environnement marin permet d'identifier les différentes sources de matière organique : sources biologiques, pyrolytiques naturelles et anthropiques (pétrolières et pyrolytiques liées aux activités humaines). La comparaison de certains de ces composés de résidus pétroliers entre eux permet également de déterminer leur état d'altération dans l'environnement.

Les traceurs d'origine aromatiques

Les HAPs sont des bons marqueurs d'une contamination pétrolière. En effet, la voie biogénique de la formation des HAPs reste un sujet de controverse alors que leurs origines pyrolytique et pétrogénique sont bien confirmés (Farrington, 1989).

Les HAPs pyrolytiques sont caractérisés par une dominance des HAPs à haut poids moléculaires de 4-6 cycles (HPM) par rapport aux HAPs de bas poids moléculaires de 2-3 cycles (BPM). Ils sont caractérisés aussi par une dominance des composés non substitués par rapport à leurs homologues alkylés correspondants ce qui traduit un profil de distribution croissants (C0>C1 > C2 > C3 > C4) (Benlahcen et al., 1997).

Inversement, les environnements principalement marqués par des pollutions pétrogéniques présenteront une dominance des HAPs de bas poids moléculaires relativement aux HAPs à haut poids moléculaire et des fortes proportions de HAPs alkylés (C1-C4) et/ou soufrés, ainsi que la présence de mélange complexe non résolu chromatographiquement (UCM) (Wang et al., 2004).

D'autre part, différents indices ont été établis pour déterminer une origine pyrolytique ou pétrogénique de la contamination par les hydrocarbures. Ces indices correspondant aux rapports entre les teneurs de ces composés, se sont avérés représentatifs de leurs origines (Budzinski, 1993; Gschwend et Hites, 1981; Soclo, 1986; Garrigues et al., 1987; Colombo et al., 1989 ; Parlanti, 1990). Ces rapports sont exposés dans le tableau II.

Tableau II : Indices caractéristiques des origines des HAPs dans l'environnement.

Rapports	**Sources**			
	Pétrogénique	Pyrolytique industrielle	Pyrolytique naturelle	Aérosols atmosphériques
Aromatiques à 1 et 2 noyaux	+	-	-	
Substitués/parentaux (MN/N, MP/P, MDBT/DBT) C0, C1, C2	<1 C0 < C1	= fonction T° C0 > C1	> 1	C0<C1<C2
Phénanthrène /Anthracène	> 25	> 10	> 10	10<P/A<25
Benzo(a)Pyrène/Benzo(e)Pyrène	= 0,5	< 0,1	= 0	
Chrysène/Benzo(a)Anthracène	> 1	> 1	> 1	< 1
Fluoranthène /Pyrène		= 1	> 1	> 1

C0 = composé parent, C 1 = monométhyl, C2 = diméthyl, M = méthyl, DM = diméthyl, P = phénanthrène, N = naphtalène, DBT = dibenzothiophène.

1.8. Composé utilisé durant l'approche expérimentale : Le benzo(a)pyrène

Le benzo(a)pyrène (BaP) (figure 7) est l'un des plus connus des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). De tels hydrocarbures se rencontrent dans les produits complexes formés lors de la combustion incomplète ou de la pyrolyse de matériaux organiques. Les sources naturelles d'émission sont les éruptions volcaniques et les feux de forêts. Le BaP est également synthétisé par des plantes, des bactéries et des algues (INERIS, 2006).

Sa présence dans l'environnement est d'autre part d'origine anthropique : raffinage du pétrole, du schiste, utilisation du goudron, du charbon, du coke, du kérosène, sources d'énergie et de chaleur, revêtements routiers, fumée de cigarette, échappement des machines à moteur thermique, huiles moteur, carburants, aliments fumés ou grillés au charbon de bois, huiles, graisses, margarines, etc…(INERIS, 2006).

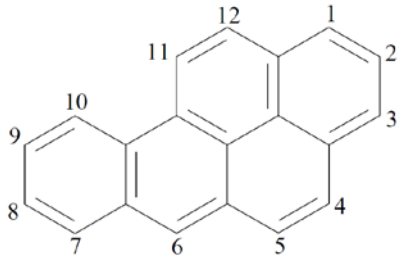


Figure 7 : Formule semi-développée du benzo(a)pyrène (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Le BaP est une substance stable jusqu'à des températures très élevées. En solution, il s'oxyde sous l'influence de la lumière, de l'air et de la chaleur. Sa solubilité dans l'eau de mer est fortement dépendante de la salinité. La solubilité du BaP apparaît cependant comme étant plus faible en eau de mer qu'en eau douce (Turner et Rawling, 2002). Ses principales caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le tableau III.

Tableau III : Paramètres physico-chimiques du benzo(a)pyrène (INERIS, 2006).

N° CAS	50-32-8
Formule brute	$C_{20}H_{12}$
Masse molaire	252,32 g/mol
Log K_{ow}	6,0
Densité	1,351
Température de fusion	175 °C
Température d'ébullition	475 °C à la pression atmosphérique
Solubilité dans l'eau	3.10^{-3} mg/L à 25 °C

En termes de cancérogénicité, le BaP est classé par l'Union Européenne comme substance cancérogène pour l'homme (catégorie 2). Au niveau mondial, il est identifié comme

cancérogène pour l'homme par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) (groupe 1) et comme probablement cancérogène pour l'homme par l'US-EPA (classe B2).

L'Union Européenne a également classé le BaP comme ayant des effets toxiques sur la reproduction (catégorie 2). En effet, chez les rongeurs, il induit une diminution du poids des gonades chez les femelles et des modifications morphologiques du sperme chez les mâles (Wyrobeck et al., 1983). De plus, une réduction de la fertilité chez les individus exposés in utero a été démontrée (IARC). Le BaP est principalement connu pour ses effets mutagènes, génotoxiques et cancérigènes. Des effets immunotoxiques du BaP ont également été rapportés chez le poisson (Carlson et al., 2002).

2. LES METAUX LOURDS

2.1. Caractéristiques des métaux et leurs sources en Méditerranée

A la différence de la plupart des contaminants organiques, les métaux lourds sont des constituants naturels dans les roches et dans les gisements minéraux. Ces composés sont souvent retrouvés à l'état de traces (moins de 0,1%) dans l'environnement (Alloway et Ayres, 1997 ; Callender, 2003), dans lequel ils sont introduits par l'intermédiaire de phénomènes naturels tels que l'érosion, l'activité volcanique ou les dépôts atmosphériques. Par ailleurs, les propriétés thermiques et électriques de ces composés en font des éléments de choix dans de nombreuses activités humaines, favorisant ainsi leur dispersion dans l'environnement.

D'après l'inventaire « National Baseline Budget » (Bilan Bases Nationales, BBN), mené dans les pays méditerranéens, les émissions atmosphériques de métaux sont principalement liées à l'industrie cimentière (Hg, Cu), à la production d'énergie (As, Cd, Ni), et à la métallurgie (Pb, Zn). Les rejets aquatiques semblent être principalement liés à l'industrie des engrais (Hg, As, Pb), à la métallurgie (Ni, Zn) et aux usines de traitements des eaux usées (Cd, Cu), auxquels s'ajoute une part non négligeable provenant du secteur de l'énergie et de l'industrie chimique. Quant au raffinage pétrolier, il représente la principale source de rejet de chrome dans l'eau comme dans l'atmosphère (UNEP/MAP/MED POL, 2012). Les métaux rencontrés dans l'environnement peuvent être classés selon leur caractère essentiel ou non. Un métal est considéré comme essentiel lorsqu'il remplit des fonctions biochimiques bien précises dans l'organisme et que son absence entraîne l'apparition de symptômes pathologiques qui disparaissent lorsque le composé est à nouveau présent (Kucuksezgin et al., 2006). Inversement, un élément métallique est dit non-essentiel

lorsqu'on ne lui connait aucune fonction biologique particulière. Généralement ces composés entraînent des effets toxiques délétères à partir de concentrations pouvant être très faibles.

2.2. Spéciation et biodisponibilité des métaux en milieu aquatique

Les éléments métalliques peuvent être présents dans l'environnement sous différentes formes physiques et chimiques, en interaction avec les ligands du milieu, c'est ce que l'on appelle la spéciation (Templeton et al., 2000). En milieu aquatique, les métaux existent sous deux forme : dissoute ou particulaire. Le concept dissous/particulaire avec quelques exemples de tailles d'entités habituellement rencontrées dans le milieu aquatique naturel est représenté dans la figure 8. Parmi ces entités, on retrouve généralement un mélange de cations, d'anions et de molécules inorganiques (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, HCO^{3-}, $PO4^{3-}$, $Si(OH)^{4}$…), et de matières organiques dissoutes (urée, acides aminés, acides humiques et fulviques). Il faut ajouter à cela les colloïdes et les particules en suspension issus des sols et des sédiments ainsi que des particules d'origines biologiques (phytoplancton et zooplancton notamment). Ces entités sont caractérisées par des surfaces d'échange variables. Ainsi, les métaux peuvent être présents en tant qu'ions libres hydratés, complexés par des ligands organiques et/ou inorganiques, adsorbés sur des colloïdes ou des MES, (co)précipités (Lesven, 2008).

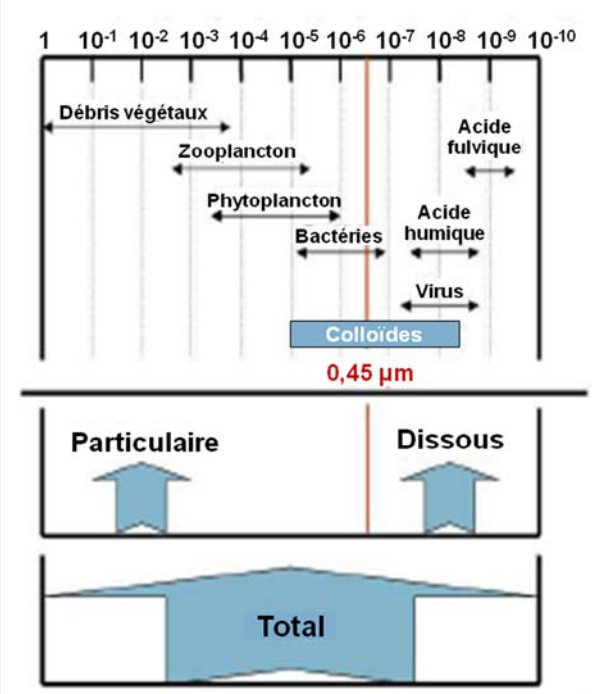


Figure 8 : Spectre des tailles (en mètre) de particules dans le milieu aquatique et schématisation des différentes fractions (Lesven, 2008).

En milieu aquatique, la toxicité des métaux dépend généralement de leur biodisponibilité, c'est à dire des formes chimiques sous lesquelles ils se trouvent dans le milieu, les rendant plus ou moins accessibles aux organismes. Dans des échantillons bruts, la concentration en métal total peut ainsi être élevée alors que la quantité de métal biodisponible est faible. Les principaux paramètres qui semblent conditionner la biodisponibilité des métaux sont les teneurs en matière organique (ou carbone organique), en hydroxydes métalliques et en AVS (acide volatile sulfide), qui fixent fortement les métaux en formant des complexes insolubles, ainsi que le pH (Ankley et al., 1996 ; Di Toro et al., 2005). Cependant, les interactions intervenant à l'interface biotique/abiotique jouent également un rôle primordial dans la biodisponibilité/activité des métaux. En effet, l'élément métallique peut rencontrer à ce niveau des sites de liaison physiologiquement inertes où dans ce cas, il n'induira pas d'effets notables, ou des sites physiologiquement actifs où, en se liant, le métal affectera directement ou indirectement un certain nombre de mécanismes cellulaires (Campbell et Couillard, 2004).

2.3. Transfert des métaux vers les organismes aquatiques

Les métaux ne peuvent traverser les membranes biologiques par simple diffusion, ils sont alors pris en charge par transport facilité. Le processus de bioaccumulation métallique s'effectue en trois étapes principales : la diffusion du métal vers la surface biologique, la diffusion au travers de la couche externe puis la complexation du métal à des sites physiologiques inertes ou actifs, affectant ou non le métabolisme (Campbell et Couillard, 2004).

2.3.1. Métaux dissous

La prise en charge des métaux dissous par la membrane épithéliale des branchies (voie directe de contamination) constitue l'interface clé pour les mécanismes de transport transmembranaire et peut s'effectuer selon trois mécanismes généraux (Campbell et Couillard, 2004) (figure 9):

- le transport facilité du cation par des transporteurs transmembranaires protéiques ou des canaux transmembranaires.
- le transport facilité d'un complexe métallique anionique.
- le transport passif par simple diffusion d'un complexe métallique lipophile.

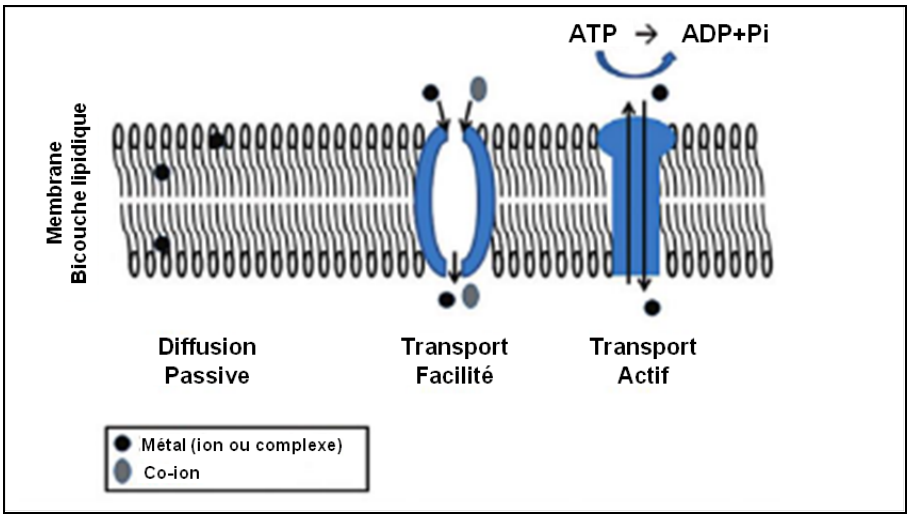


Figure 9 : Principaux mécanismes membranaires permettant l'entrée des métaux dans la cellule (adapté de Mason, 2013).

2.3.2. Métaux particulaires

Les métaux particulaires vont en effet être réellement assimilés uniquement après ingestion de la particule et solubilisation du métal. Cette étape de solubilisation peut se produire directement dans le tractus digestif ou dans les vacuoles créées par invagination de la membrane biologique. Dans ces deux cas, les conditions physico-chimiques (pH, oxydo-réduction…) vont favoriser la solubilisation des métaux initialement liés à la particule. Une fois solubilisés, les métaux doivent franchir la membrane digestive ou vacuolaire selon les mêmes processus que les membranes épithéliales des branchies (Campbell et Couillard, 2004).

L'endocytose peut également jouer un rôle important dans le transfert des métaux chez les organismes aquatiques. Ce mécanisme, décrit au niveau des branchies, de l'épithélium du manteau et au niveau de la barrière intestinale (Depledge and Rainbow, 1990; Roesijadi and Robinson, 1994), induit l'incorporation des métaux aux lysosomes et leur relargage dans le cytosol.

Il a été démontré qu'une contamination par les métaux lourds peut affecter la croissance, la consommation de l'oxygène, la reproduction etc (Viarengo, 1989). Au niveau cellulaire, le principal mode de toxicité des métaux réside dans la création d'un stress oxydant (Tatrai et al., 2001).

2.4. Mécanismes de détoxication des métaux

Après avoir franchi la membrane apicale des cellules épithéliales des branchies, les métaux seront pris en charge selon deux mécanismes : ils peuvent traverser la cellule, le plus souvent associés aux ligands intracellulaires, et accéder ainsi à la membrane baso-latérale, où ils seront libérés dans le milieu circulant (sang ou hémolymphe) ou vers les cellules adjacentes. (Martin and Rainbow, 1998a et b). Ils peuvent aussi subir des séquestrations intracellulaires, avec des composants structuraux des membranes, des organites et des composés cytosoliques (figure 10). Cette séquestration est dépendante du niveau et du temps d'exposition, du type cellulaire, de l'espèce et du cycle de vie des organismes (Ahearn et al., 2004; Shi et Wang, 2004).

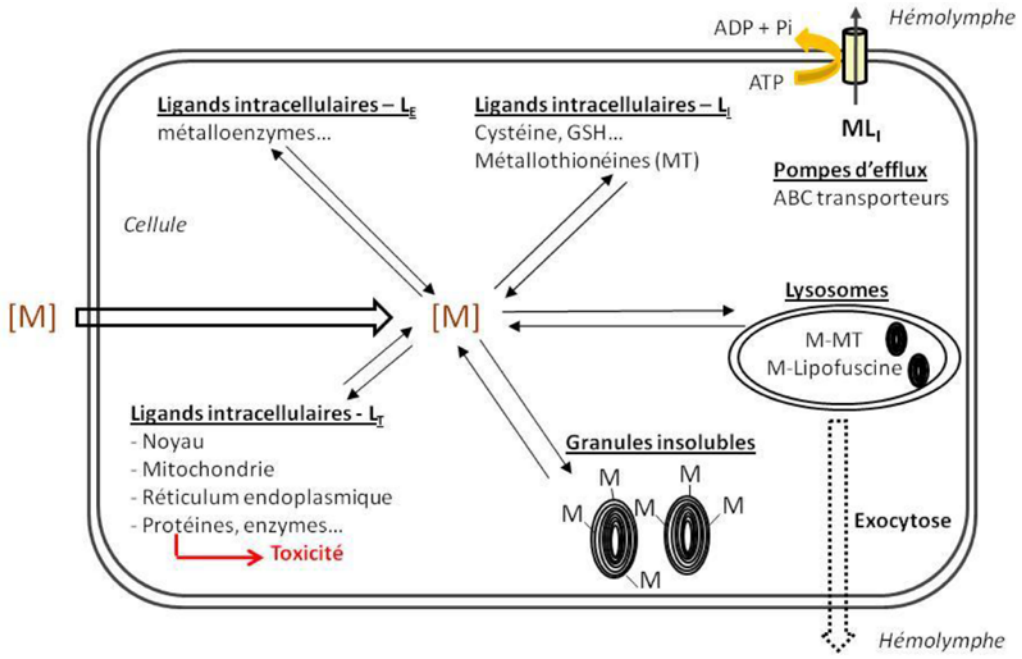


Figure 10 : Représentation schématique des interactions possibles entre les métaux et les structures intracellulaires (Paul-Pont, 2010).

Les métallothionéines constituent les principaux ligands intracellulaires des métaux (Baudrimont et al., 2003). Ces protéines interviennent dans la détoxication des métaux essentiels lorsqu'ils sont présents en excès. Leurs groupements thiols non spécifiques, permettent également la séquestration de métaux toxiques non essentiels (Cd, Hg, Pb, Ag,…). Ces protéines de faible poids moléculaire (6 à 7 kDa) et très riches en cystéine (30%), possèdent de fortes potentialités de fixation, basées sur les propriétés thioloprives des métaux (forte affinité pour les groupements thiols).

La séquestration des métaux dans des structures compartimentées a été également décrite chez les invertébrés aquatiques. Ce mécanisme de séquestration limite la dispersion du métal au sein de la cellule et favorise son élimination en mettant à contribution le système lysosomal ou la précipitation sous forme de granules ou de concrétions insolubles (Viarengo, 1989 ; Viarengo et Nott, 1993).

Etant présentes dans l'hémolymphe des organismes invertébrés, les hémocytes jouent aussi un rôle dans la séquestration et le transport des métaux (Robinson et al., 1997). Elles sont capables de phagocyter les corps étrangers et ainsi d'accumuler les éléments métalliques présents dans l'hémolymphe (Marigómez et al., 2002).

2.5. Voies d'élimination des métaux

L'élimination des métaux chez les bivalves se fait principalement par les voies rénales et digestives (Roesijadi et Robinson, 1994 ; Marigómez et al., 2002) (figure 17). Elle peut être réalisée par voie rénale via les processus d'ultrafiltration qui ont lieu au niveau de la glande péricardique qui a été décrite chez *Dreissena polymorpha* (Giamberini and Pihan, 1996). L'élimination peut aussi se faire par voie digestive avec la formation de pseudofécès qui correspond au relargage des corps résiduels du tissu digestif, par exocytose au niveau des cellules de la glande digestive (Morton, 1983 ; Marigómez et al., 2002). Quant aux métaux séquestrés à l'intérieur des hémocytes des mollusques, ils sont éliminés par migration depuis les tissus intestinaux, à travers la barrière épithéliale, vers la lumière du tube digestif ou vers l'eau environnante par le mécanisme de diapédèse (Roesijadi et Robinson, 1994). Enfin, les phénomènes de mue chez les invertébrés aquatiques possédant une cuticule externe participent à l'élimination de métaux, de même que la formation de la coquille, de la dentition ou encore du byssus chez les bivalves (Mason et Jenkins, 1995).

C. Moyens d'évaluation de la pollution et de son impact sur l'environnement marin

De nombreuses méthodes permettent de surveiller la qualité de l'environnement à savoir la détection des polluants, leur quantification dans les milieux physiques, ainsi que l'évaluation des effets des polluants sur les organismes vivants, soit au niveau des individus, soit au niveau des populations et/ou communautés (figure 11). Ces deux approches sont complémentaires et indispensables pour un bon diagnostic de l'état de "santé" du milieu marin. En d'autres termes, c'est l'association de ces deux approches qui permet d'évaluer de façon précise l'état des milieux et des organismes qui y vivent.

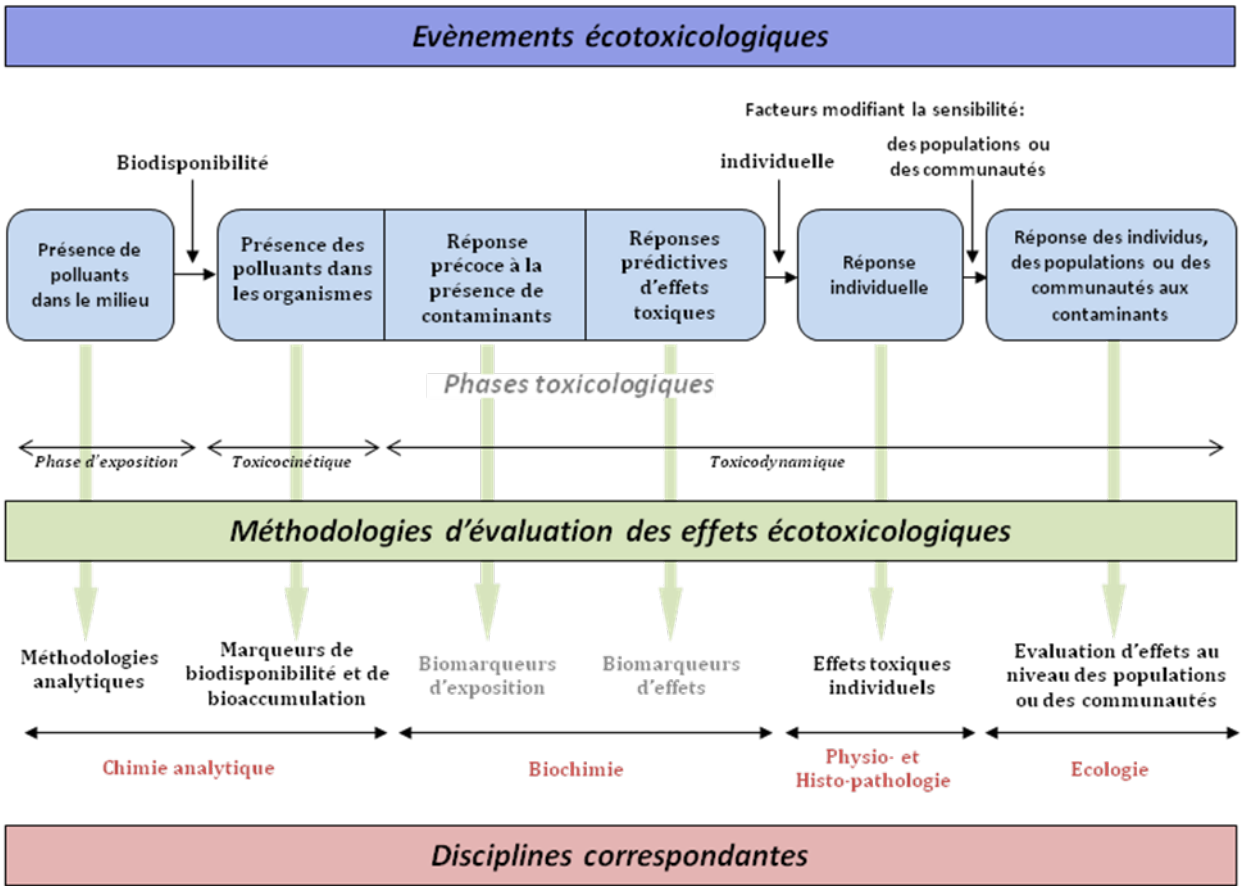


Figure 11 : Représentation des méthodologies chimiques et biologiques permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques (modifié d'après Lagadic et al., 1997).

1. APPROCHE CHIMIQUE

Depuis de nombreuses années, la surveillance des polluants chimiques dans l'environnement est effectuée par des techniques d'analyses physico-chimiques plus ou moins sensibles. Ces analyses physico-chimiques de la colonne d'eau, du sédiment et des organismes vivants donnent des indications sur la présence ou l'absence d'un polluant et permettent d'évaluer sa concentration.

L'eau est le siège de fluctuations spatio-temporelles importantes, en particulier dans les milieux côtiers et estuariens (Avoine, 1981), qui représentent des zones particulièrement à risque en raison de leur urbanisation et de leur industrialisation importantes. Sous l'effet des fleuves et des marées, la masse d'eau présente en un point donné ne sera pas la même au cours de la journée, du mois et de l'année. Cette variation crée un problème majeur de représentativité de l'échantillon. En effet, si l'analyse en continu est actuellement maîtrisée pour les éléments majeurs, il n'en est pas de même pour les éléments à l'état de trace, ni pour les micropolluants organiques. Du fait des faibles concentrations rencontrées, les difficultés à détecter et quantifier les polluants constituent une seconde limitation à l'utilisation de la matrice d'eau pour l'évaluation de la contamination chimique du milieu marin dans des programmes de routine (Amiard-Triquet et al., 1999).

Contrairement à la matrice eau, le sédiment présente des concentrations plus élevées pour beaucoup de micropolluants, ce qui réduit généralement les difficultés analytiques. Le sédiment apparaît comme un intégrateur à long terme, ce qui présente un aspect positif quand à la représentativité de ce type d'échantillon à l'égard de la situation de contamination qui a prévalu sur le site étudié, dans la période qui précède la collecte (Amiard-Triquet et al., 1999). La teneur en matière organique du sédiment est un facteur important de sa capacité à fixer les micropolluants minéraux ou organiques.

La matière biologique apparaît comme un intégrateur à moyen terme pour un grand nombre de micropolluants. Les concentrations déterminées dans les tissus vivants sont généralement plus élevées que celles mesurées dans le milieu environnant. Du fait de cette capacité de bioaccumulation, les quantités de contaminants présentes dans la matière biologique sont généralement suffisantes pour que les difficultés analytiques soient raisonnables (Amiard-Triquet et al., 1999). L'analyse chimique des tissus biologiques permettra de déterminer la biodisponibilité des contaminants pour les organismes vivants.

Les méthodes analytiques chimiques utilisées dans les programmes de surveillance, nécessite pour sa mise en place, une logistique complexe et onéreuse. L'emploi de ces méthodes n'est toujours pas facile, en raison :

- des propriétés de la substance à analyser ;
- elle ne permet pas l'analyse simultanée de tous les contaminants présents dans l'échantillon et éventuellement leur produit de dégradation et de transformation ;
- de la difficulté de l'interprétation des résultats qui ne sont pas corrélables aux effets biologiques (Barra et al., 2001) ;
- le seuil de sensibilité des méthodes de détection ;
- le rejet des molécules chimiques totalement nouvelles et l'apparition de produits de dégradation ;
- le coût élevé de ces analyses.

Pour palier à ces insuffisances, des méthodes biologiques fondées sur l'observation des caractères qualitatifs et quantitatifs des organismes vivants dans le milieu marin sont apparues comme un moyen efficace et très informatif de l'état de santé de l'écosystème (López-Barea, 1995 ; Cajaraville et al., 2000), d'où l'apparition de la notion de biomarqueurs.

2. APPROCHE BIOLOGIQUE

2.1. Notion de biomarqueurs

Récemment, la notion de biosurveillance est apparue en tant que suivi de l'état sanitaire d'un écosystème moyennant des paramètres biologiques. Elle se base sur l'étude de la réponse biologique vis-à-vis des polluants qui peut être assimilée à des indicateurs biologiques (Lafaurie et al., 1992). L'approche biologique trouve sa fiabilité dans le fait qu'elle constitue l'interface de plusieurs disciplines, mettant en jeu la maîtrise et la connaissance de l'ensemble des mécanismes de toxicité des organismes vivants (figure 12).

Deux approches biologiques complémentaires sont utilisées de nos jours : la première est basée sur les communautés ou populations, il s'agit notamment des indices biocénotiques, qui de par la présence ou l'absence de telle ou telle espèce, nous renseignent sur l'état de santé

d'un milieu (Ramade, 1979 ; Timbrell, 2001), mais malheureusement à posteriori. La seconde approche est plus prédictive sur l'état de santé du milieu, elle se situe au niveau de l'individu et concerne l'utilisation de biomarqueurs.

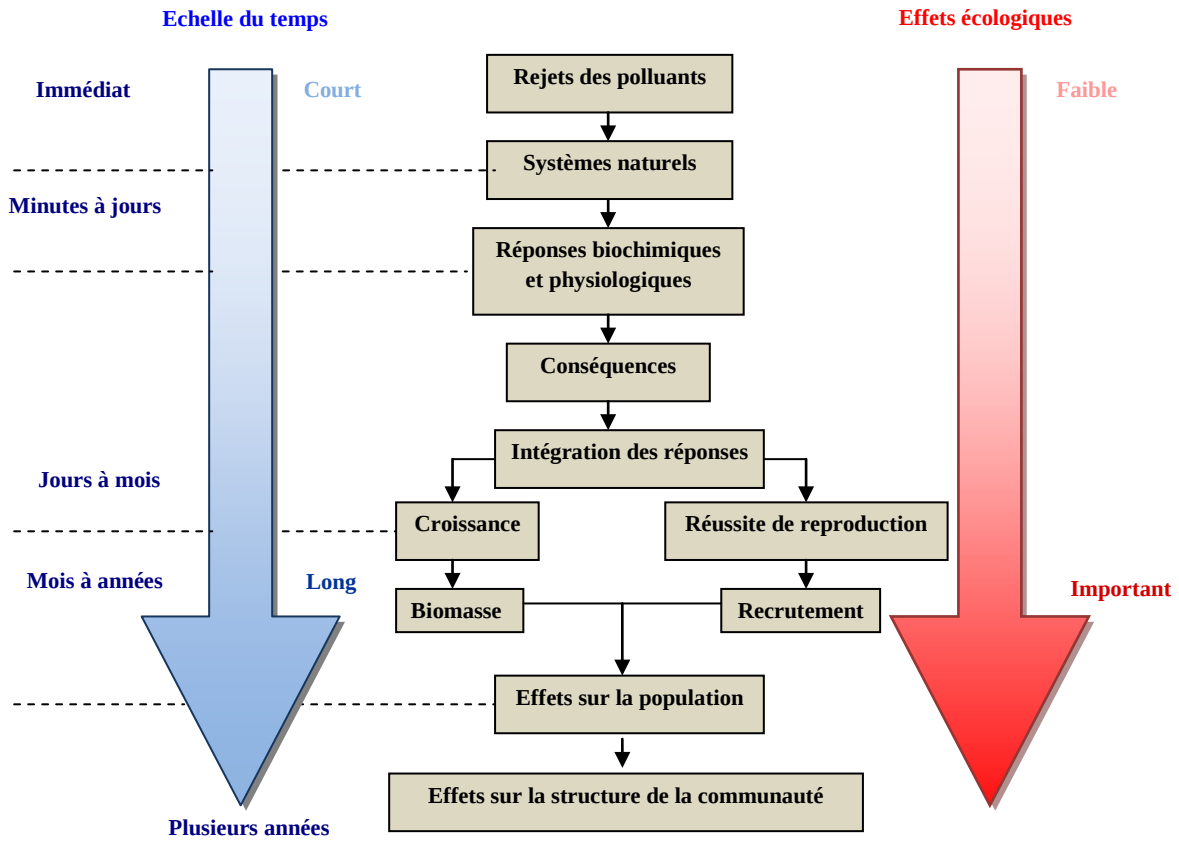


Figure 12 : Représentation de l'ordre chronologique des différentes atteintes induites au sein de l'organisation des systèmes biologiques. (D'après Von Der Oost et al., 2003).

Au début des années 80, la notion de biomarqueur est apparue et désigne les changements observables ou mesurables de certains paramètres moléculaires, biochimiques, cellulaires ou physiologiques qui révèlent une exposition présente ou passée de l'organisme à au moins une substance à caractère polluant (Lagadic et al., 1997 ; Peňa-Llpis et al., 2003). Les biomarqueurs représentent un nouvel outil qui n'est pas destiné à copier ou à remplacer la surveillance chimique, mais qui sont intégrés dans les programmes de surveillance. Complémentaires des indicateurs écologiques, les indicateurs biochimiques peuvent être des systèmes d'alarme précoces d'une contamination dont les effets sont encore réversibles.

Il existe deux types de biomarqueurs : les biomarqueurs d'exposition et les biomarqueurs d'effet. Les biomarqueurs d'exposition, sont des changements moléculaires ou

cellulaires intervenant à un moment précoce pour atténuer ou inhiber les effets des xénobiotiques. Ils sont en général impliqués dans les métabolismes de détoxication des xénobiotiques (ex.: cytochromes P450) ou dans les mécanismes de défense cellulaire (ex.: enzymes antioxydantes). Les biomarqueurs d'effets sont des changements moléculaires ou cellulaires résultant des effets xénobiotiques et utilisés pour évaluer les dommages cellulaires.

Les biomarqueurs peuvent être aussi classés selon leur degré de spécificité à une classe particulière d'un contaminant. On distingue les biomarqueurs spécifiques, utilisés pour la détection d'un polluant bien déterminé et les biomarqueurs non spécifiques qui intègrent les effets de différents facteurs de stress.

2.2. Les biomarqueurs étudiés

2.2.1. Les marqueurs biochimiques

2.2.1.1. La benzo(a)pyrène hydroxylase : biomarqueur de métabolisation de phase I

Une fois pénétré dans l'organisme, les xénobiotiques organiques vont être métabolisés par des systèmes enzymatiques en composés hydrophiles pour faciliter leur excrétion. Le cytochrome1A1 (ou CYP1A1) est le mieux connu des cytochromes P450 impliqués dans la phase I de biotransformation. Il métabolise tout particulièrement les contaminants liposolubles tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les polychlorobiphényles et les dioxines.

Chez les invertébrés marins et en particulier chez les bivalves, plusieurs travaux ont mentionné la présence de la famille des cytochromes P450 et leurs effets sur la métabolisation des HAPs (Livingstone et al., 1990 ; Narbonne, 1991). Toutefois, et avec les progrès techniques en protéomie et en génomie, on s'est rendu à l'évidence de la défaillance du cytochromes P450 chez les bivalves marins (moules, palourdes et huîtres) (Narbonne et al., 1999 ; Ackcha et al., 2000). Les enzymes de phase I chez ces organismes sont généralement des oxygénases à fonction mixte tel que la benzo(a)pyrène hydroxylase (BPH) (Osborne et al., 1981 ; Lu et al., 2000).

L'activité benzo(a)pyrène hydroxylase (BPH) est une activité enzymatique de fonctionnalisation présente dans la glande digestive chez les bivalves qui appartiennent aux activités de phase I dont le rôle est d'introduire un groupement fonctionnel au sein d'un xénobiotique généralement hydrophobe. Dans le cas de l'activité BPH, le groupement ajouté

par cette enzyme sur le substrat benzo(a)pyrène est le groupement hydroxyle OH. Parmi les substrats de la BPH, les plus connus sont les HAPs :

$$\mathbf{BaP + NADPH + H^+ + O_2 \xrightarrow{BPH} 3\text{-}OH\ BaP + NADP^+ + H_2O}$$

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

2.2.1.2. Les glutathion *S*-transférases (GST) : marqueurs de métabolisation de phase II

Dans le mécanisme de détoxification, les enzymes de phase II ont pour rôle de coupler un groupement hydrosoluble à un xénobiotique préalablement modifié ou non par les enzymes de phase I afin de le rendre lui-même plus hydrosoluble et donc plus facilement excrétable par l'organisme. Parmi les enzymes de phases II, les glutathion S-tranférases (GST) seront déployés dans ce travail.

Les GST catalysent la conjugaison d'un tripeptide, le glutathion réduit (glutamyl-cystéinyl-glycine : GSH) qui possède un groupement nucléophile –SH, à une grande variété de substrats hydrophobes (porteurs de groupements électrophiles) pour les rendre plus hydrosolubles permettra ainsi leur élimination (Habig et al., 1974). Les GST ont été mises en évidence dans la plupart des êtres vivants tels que la levure (Foley et Sheehan, 1998), les bivalves (Vidal et al., 2002), les vers de terre (Borgeraas et al., 1996), les crustacés (Gowland et al., 2002), les insectes (Prapanthadara et al., 1996), les poissons (Pérez-López et al., 2002), les mammifères (Bolton et Ahokas, 1997) et les plantes (Smith et al., 2004).

Les GST peuvent détoxifier un large spectre de xénobiotiques initialement électrophiles ou devenus électrophiles après métabolisation. Ces composés peuvent être des pesticides (thiocarbamates, organophosphates), des amines aromatiques, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (benzo(a)pyrène), des toxines (aflatoxine B1) ou des subtances pharmaceutiques (paracétamol, nitroglycérine, bromosulfophthaléine). Parmi ces xénobiotiques, certains peuvent être à l'origine de composés cancérigènes comme le BaP. Ce dernier est métabolisé par des monooxygénases à cytochrome P450 et des époxydes hydrolases en composés hautement réactifs capables de réagir avec à l'ADN et l'ARN (exemple le 7,8-diol-9,10- époxyde). Les GST sont capables de conjuguer ces métabolites et leurs dérivés et constituent donc un système essentiel de protection (Hinson et Kadlubar, 1988). Cependant, la conjugaison de certains substrats avec le GSH peut parfois conduire à la formation de composés encore plus réactifs et toxiques que le composé initial. Les xénobiotiques modifiés par les enzymes de phase II (et/ou de phase I) peuvent ensuite être expulsés de la cellule par les systèmes de phase III.

Les GST possèdent un rôle capital dans les mécanismes de protection de l'organisme vis-à-vis des effets néfastes du stress oxydant. Certains GST peuvent en effet métaboliser les peroxydes lipidiques résultant de la peroxydation lipidique. Les produits finaux de lipoperoxydation tels que les aldéhydes, le malondialdéhyde, les hydroxyalkénals peuvent également être métabolisés par certaines isoenzymes. Outre leur fonction de protection, les GST participent à la biosynthèse de molécules biologiquement actives tels que les prostaglandines et les leukotriènes (Fitzpatrick et al., 1995).

2.2.1.3. Les biomarqueurs de stress oxydant

2.2.1.3.1. Le stress oxydant

Bien que la consommation d'oxygène soit indispensable à toute forme de vie aérobie, elle entraîne également la formation de composés réactifs - les espèces réactives de l'oxygène (ERO) - pouvant exercer de multiples effets délétères sur les composants cellulaires. Les ERO sont produites naturellement, soit de manière «accidentelle» par les monooxygénases à cytochrome P450, les chaînes mitochondriales transporteuses d'électrons, via l'auto-oxydation de certaines molécules, soit de manière «délibérée» par des phagocytes activés, des lymphocytes, des fibroblastes, etc. (Halliwell et Cross, 1994). Des facteurs exogènes peuvent également initier la synthèse d'ERO: les radiations ionisantes et certains xénobiotiques dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Lemaire et Livingstone, 1993).

L'organisme possède naturellement des systèmes de défense antioxydante lui permettant de piéger ou d'inactiver ces ERO (figure 20). Ces complexes de défense sont constitués d'enzymes antioxydantes (superoxide dismutase, catalase, glutathion peroxydase), dont l'étude donne une indication sensible de la présence de contaminants générateurs d'un tel stress en milieu contrôlé et naturel (Lackner, 1998 ; Lopes et al., 2001), et de molécules qui piègent les espèces radicalaires au niveau des membranes (vitamine E, -carotène) ou de la phase aqueuse (acide ascorbique, acide urique et glutathion) (Cadet et al., 2003).

Lorsque l'équilibre entre les forces pro-oxydantes et les défenses antioxydantes est perturbé en faveur de l'oxydation, les cellules subissent un stress oxydant conduisant à des lésions potentielles (Livingstone et al., 1990). Les radicaux libres échappant aux systèmes de défense, sont capables de causer des dommages permanents ou transitoires, aux protéines, lipides et acides nucléiques (figure 13). Ces lésions, si elles ne sont pas réparées, peuvent conduire à la désorganisation membranaire, à l'inactivation enzymatique, à la fixation de mutation et à la mort cellulaire (Pedrajas et al., 1996).

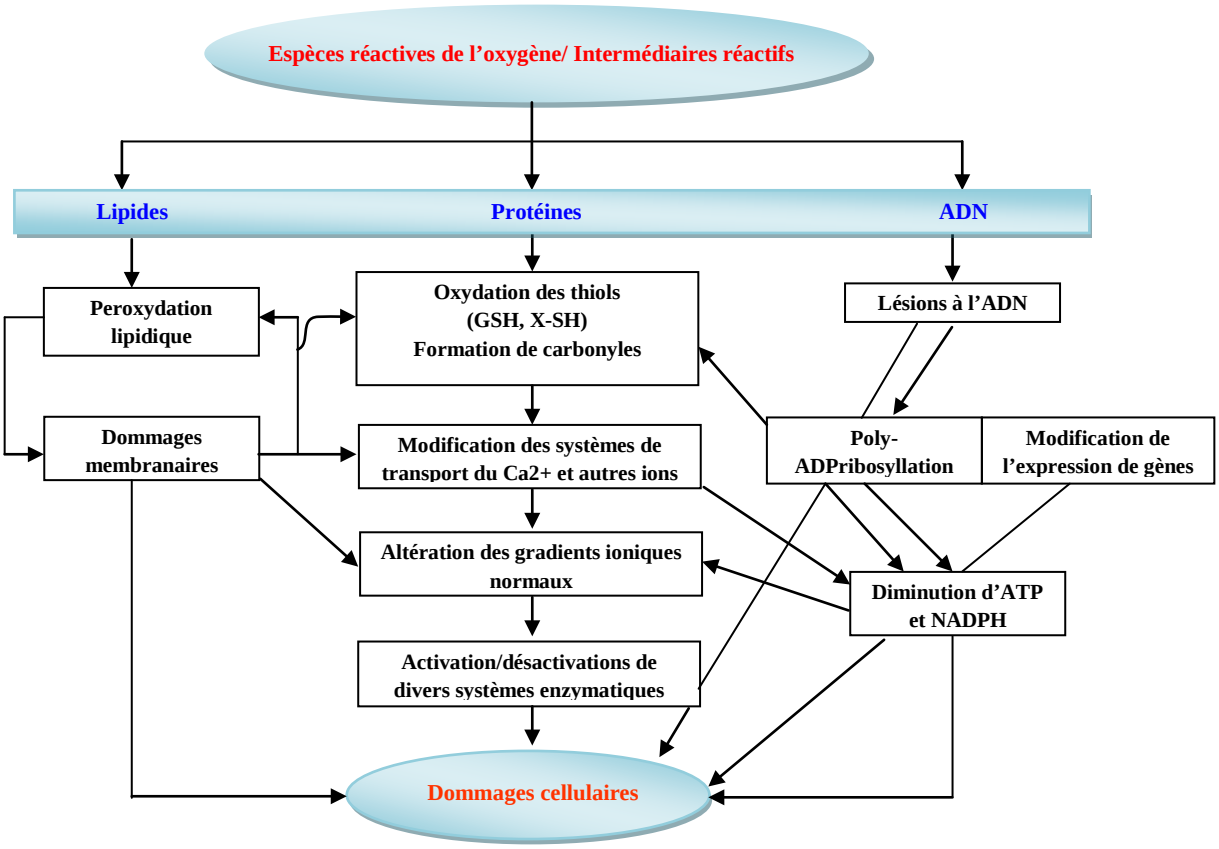


Figure 13 : Effets des espèces réactives de l'oxygène et des intermédiaires réactifs sur les macromolécules cellulaires (lipides, protéines et ADN) (d'après Kehrer, 1993).

2.2.1.3.2. Les catalases

Les catalases sont des hémoprotéines tétramériques qui, avec un atome de fer par sous-unité, ont une masse d'environ 240 kDa. Elles catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Les catalases sont des enzymes peroxysomales dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée (H_2O_2) (Livingstone et al., 1992). Les catalases sont présentes dans tout le règne animal et se retrouvent aussi chez les végétaux. Elles ont été mises en évidence chez les invertébrés aquatiques (Winston et Di Giulio, 1991; Lemaire et Livingstone, 1993). Elles sont sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydant au niveau des membranes cellulaires, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les polychlorobiphényles (Livingstone, 1993) et les métaux (Labrot et al., 1996). Il a été démontré que l'activité catalase varie selon l'espèce, les saisons, les conditions abiotiques et la présence de xénobiotiques (Geret et al., 2003). De nombreuses études réalisées au laboratoire et sur le terrain, concernant les défenses antioxydantes et les enzymes détoxifiantes chez *Mytilus edulis*, montrent généralement des corrélations directes entre les défenses antioxydantes, les enzymes détoxifiantes, les dommages occasionnés sur les biomolécules et les xénobiotiques (Lemaire et Livingstone, 1993 ; Rodriguez-Ariza et al., 1993 ; Livingstone, 1998) mais aussi des corrélations avec les saisons (Niyogi et al., 2001 ; Vidal et al., 2002).

L'augmentation de l'activité catalase a déjà été relevée chez des bivalves exposés à des polluants organiques (HAPs, PCBs et engrais chimiques) (Cossu et al., 1997). Ainsi l'activité catalase est très utilisée comme biomarqueurs de stress oxydant, particulièrement chez les bivalves, dans les études écotoxicologiques au laboratoire et sur terrain (Jebali et al., 2006 ; Banni et al., 2009a ; Attig et al., 2010).

2.2.1.3.3. La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique ou lipoperoxydation (LPO) est une réaction radicalaire en chaîne pouvant provoquer une altération structurale et fonctionnelle des membranes (Garcin, 1998 ; Martinez et Livingstone, 1995). Elle consiste en trois réactions de type radicalaire (Kappus, 1991) (figure 14):

- *Réaction d'initiation* : consiste à l'élimination d'un atome d'hydrogène au niveau d'un groupement allylique CH2 d'un acide gras polyinsaturé par une espèce

hautement réactive, en l'occurrence un radical hydroxyle ($^{\cdot}OH$), alkoxyle ($RO^{\cdot}$) ou peroxyle ($ROO^{\cdot}$) pour donner un radical alkyle ($R^{\cdot}$). Il s'ensuit un réarrangement moléculaire permettant l'obtention d'un diène conjugué. Puis ce dernier réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyle très réactif ($ROO^{\cdot}$).

- *Réaction de propagation* : le radical peroxyle peut à son tour attaquer une nouvelle chaîne d'acide gras polyinsaturé donnant naissance à un nouveau radical alkyle et à un hydroperoxyde lipidique (ROOH).

- *Réaction de terminaison* : le processus de peroxydation se poursuit jusqu'à ce que deux radicaux réagissent entre eux ou qu'une molécule antioxydante intervienne (exemple: vitamine E).

Le processus complexe de décomposition des hydropéroxydes lipidiques aboutit, d'une part, à la formation de radicaux alkoxyle et peroxyle capables d'initier de nouvelles chaînes de lipoperoxydation et d'autre part, à de multiples produits de dégradation: alcools, cétones, aldéhydes, éthers, acides et alcanes. Parmi les aldéhydes formés, le malondialdéhyde (MDA) est souvent pris en considération pour évaluer le degré de peroxydation lipidique. Il se forme à partir d'acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles liaisons successives.

Le MDA est un agent alkylant puissant capable de réagir avec les macromolécules biologiques. Le dosage de ce composé présente donc un intérêt certain, comme biomarqueurs de stress oxydant, chez les organismes soumis à des contaminations multiples (Narbonne et al., 1991).

Le dosage du taux de malondialdéhyde (MDA) cellulaire est largement utilisé chez les bivalves (Doyotte et al., 1997 ; Cajaraville et al., 2000 ; Banni et al., 2009a) et les poissons (Di Giulio et al., 1993). L'étude de Banni et al. (2014) a montré l'existence de fortes teneurs en MDA chez des moules *Mytils galloprovincialis* après 4 jours d'exposition au nickel. La mesure la plus utilisée est la mesure d'un chromophore, produit par réaction du malondialdéhyde avec l'acide 2-thiobutirique (TBA) (Goel et al., 1988 ; Depledge et Fossi, 1994). La peroxydation lipidique est estimée également par la mesure de l'activité des enzymes antioxydantes (Rodríguez-Ortega et al., 2002).

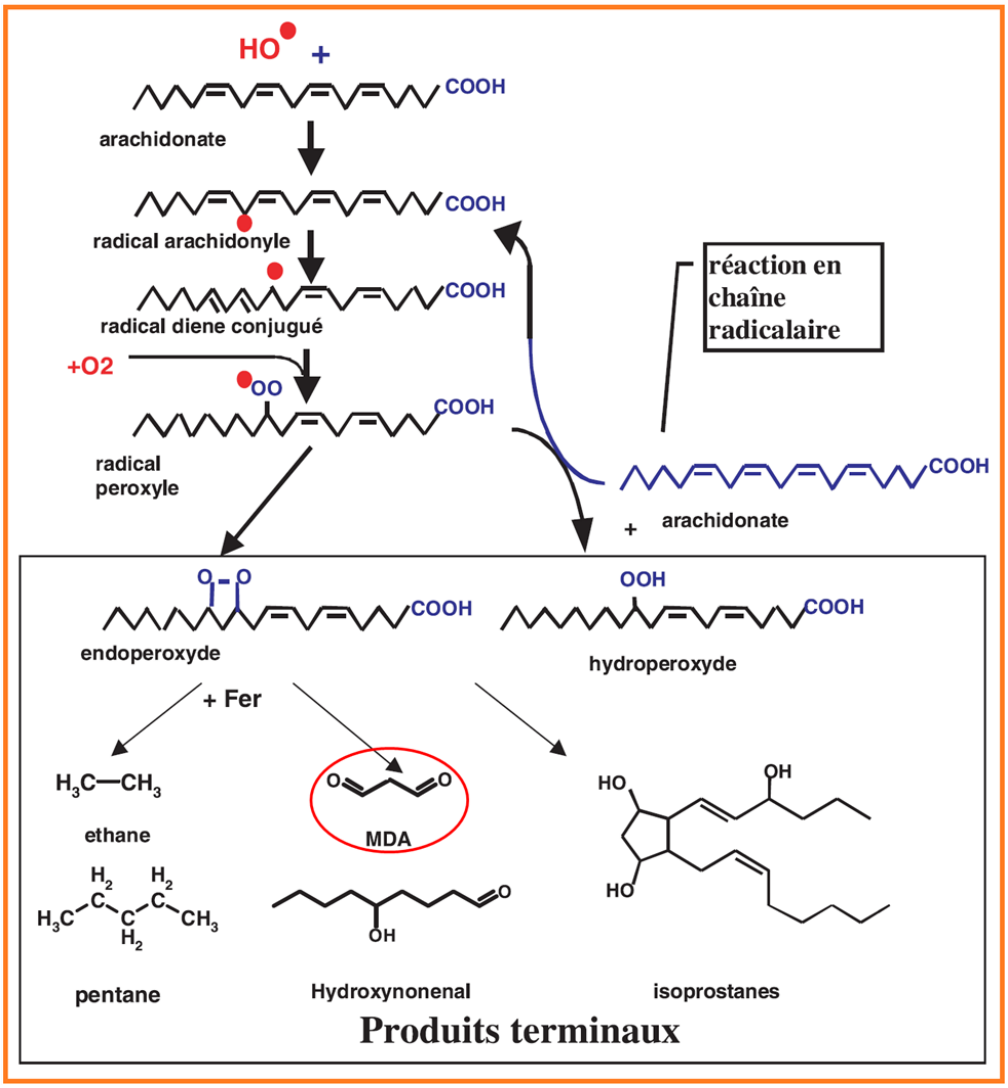


Figure 14 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

2.2.1.4. L'acétylcholinestérase : biomarqueur de neurotoxicité

Dans les jonctions neuromusculaires et inter-neuronales, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui permet la transmission de l'influx nerveux. Lorsque l'acétylcholine est libérée des terminaisons nerveuses dans l'espace synaptique, elle se fixe sur l'un des récepteurs cholinergiques qui se trouvent sur la membrane post-synaptique (nerfs, muscles lisses ou glandes).

L'interaction de l'acétylcholine avec le récepteur provoque une dépolarisation de la membrane post-synaptique, générant ainsi un potentiel d'action qui assure la transmission du signal nerveux. L'AChE, en inactivant rapidement l'acétylcholine, permet au système de revenir immédiatement à son état de repos. Le rôle de l'AChE est d'hydrolyser rapidement

l'acétylcholine afin de stopper rapidement la stimulation du récepteur, et par conséquent le transfert du signal par repolarisation de la membrane.

L'inhibition de l'AChE par de nombreux neurotoxiques, dont les pesticides organophosphorés et les carbamates, provoque l'accumulation de l'acétylcholine et une transmission permanente le l'influx nerveux. En effet, lorsque l'AChE est inhibé, l'acétylcholine reste fixée à son récepteur et de ce fait, maintient la dépolarisation de la membrane. Si la fixation de l'acétylcholine à son récepteur se prolonge excessivement, l'ensemble de la membrane post-synaptique se dépolarise, et la synapse s'en trouve bloquée. Le blocage de toutes les synapses du système nerveux central conduit rapidement à la mort. Le blocage des synapses des jonctions neuromusculaires conduit à la tétanie puis la mort de l'animal (Bocquené et al., 1997). L'ensemble des phénomènes physiologiques intervenant au moment de la transmission de l'influx nerveux est regroupé dans la figure 15.

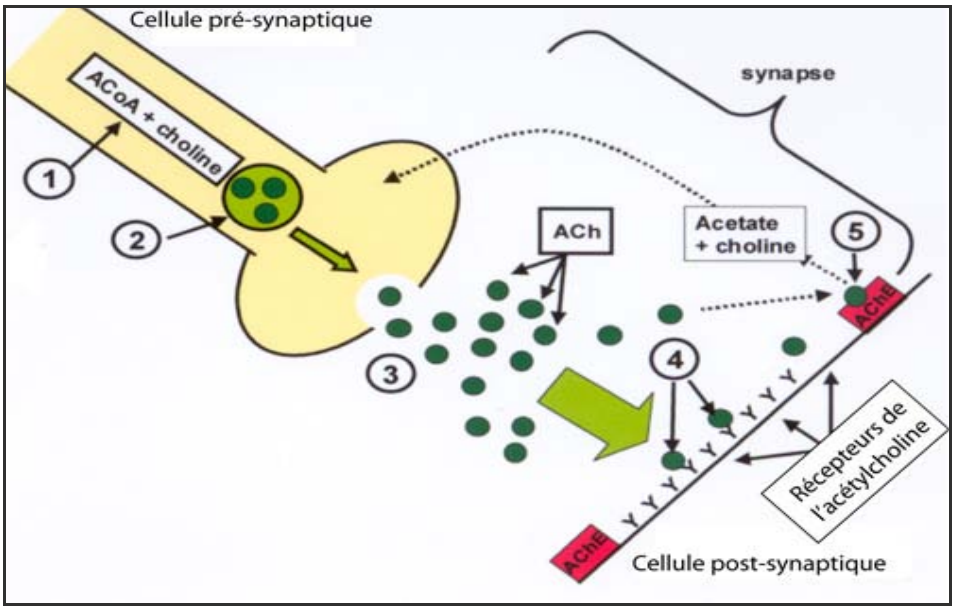


Figure 15 : Schéma général des phénomènes physiologiques intervenants au moment de la transmission de l'influx nerveux (http://www.apteronote.com/revue/histoire/article_21.shtml). 1. Synthèse de l'acétylcholine (ACh) dans le cytoplasme de la terminaison nerveuse à partir de l'acétylCoA (ACoA) et de la choline, 2. Les molécules d'acétylcholine sont stockées par vésicule synaptique, 3. Libération des ACh dans la synapse, 4. Fixation de l'ACh sur les récepteurs cholinergiques qui se trouvent sur la membrane post-synaptique, 5. Hydrolyse de l'ACh par l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) afin de stopper la stimulation du récepteur.

2.2.2. La génotoxicité

L'ADN est le support universel de l'hérédité contenant l'information génétique des êtres vivants. Il assure le fonctionnement cellulaire des organismes et permet à la cellule de rester réactive aux messages de son environnement. La molécule d'ADN a une structure complexe qui peut être modifiée par des agents exogènes.

La génotoxicité peut être définit comme étant une altération de l'intégrité structurale de l'ADN par certains agents dits «génotoxiques» pouvant conduire à des mutations géniques ou chromosomiques. Ces modifications peuvent être décelées soit par l'analyse directe de la structure de l'ADN ou par l'examen de sa traduction fonctionnelle. En raison de la grande variété de structures et de modes d'action des substances génotoxiques, il existe un grand nombre de dommages à l'ADN possibles. Ces altérations structurales de l'ADN appelées lésions primaires concernent principalement des modifications des bases constitutives de l'ADN ou des cassures affectant un seul ou les deux brins de l'ADN (Rether et al., 1997) (figure 16). Ces altérations (bases oxydées, sites abasiques, les adduits, les cassures simples brins et les pontages ADN-protéines) peuvent servir d'indicateurs de stress génotoxique.

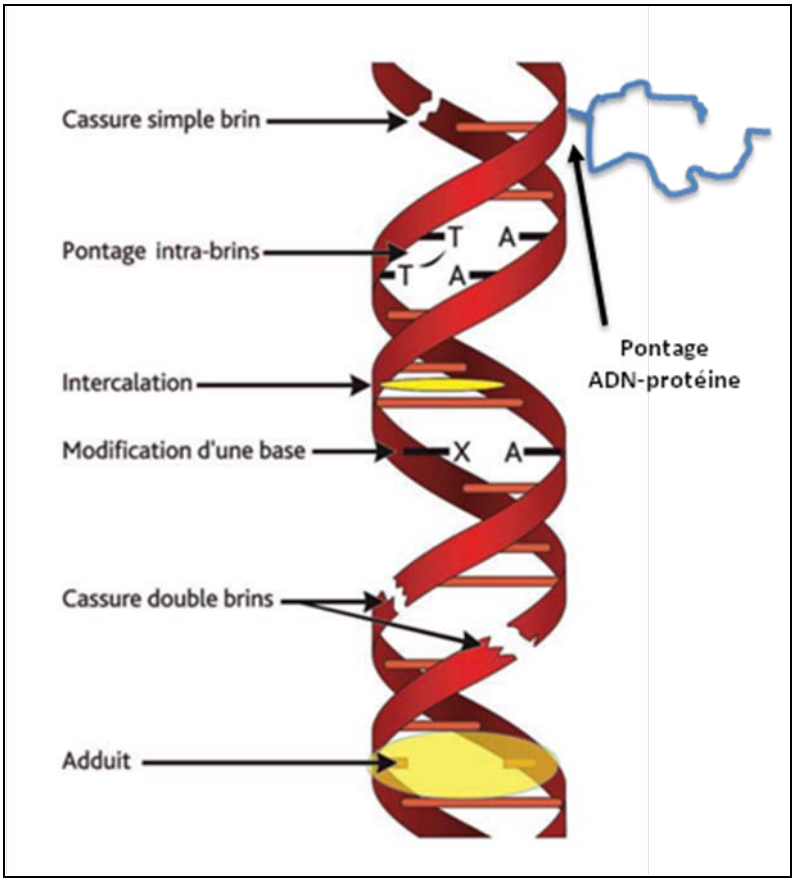


Figure 16 : Les principaux dommages à l'ADN (d'après Favier, 2003).

Certains composés chimiques présents dans le milieu aquatiques peuvent avoir des effets génotoxiques. Il y a deux classes d'agents chimiques génotoxiques, les génotoxiques directs qui sont capables de modifier directement la structure de l'ADN, et ceux que l'on appelle des progénotoxiques qui nécessitent une activation métabolique préalable avant de pouvoir exercer leurs effets génotoxiques. On parle dans ce cas de processus de bioactivation. Deux altérations sont fréquemment rencontrées dans les études des contaminations aux HAPs. La première, d'ordre chimique, correspond à la formation de produits d'addition entre le xénobiotique et les nucléotides, appelés adduits. Des études sur des limandes prélevées en Baie de Seine ont mis en évidence la présence d'adduits HAP dans l'ADN (Akcha et al., 2003 ; Akcha et al., 2004). La seconde, d'ordre physique, correspond à la cassure au niveau d'un seul brin, ou des deux brins, d'ADN conduisant, dans ce dernier cas, à la formation de petites entités qui peuvent s'individualiser sous la forme de micronoyaux. Flammarion et al. (2002) ont pu mettre en évidence une corrélation entre le niveau de cassures à l'ADN de chevaines (*Leuciscus cephalus*) capturés dans la Moselle et la concentration en BaP dans les sédiments des sites étudiés. Les bases azotées constitutives de l'ADN représentent des cibles privilégiées pour les métabolites électrophiles réactifs issus de la biotransformation des HAP. Ainsi des lésions primaires de l'ADN de type bases oxydées sont formées au cours de la réaction entre l'ADN et les métabolites. Une des lésions de l'ADN les plus représentées est la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodG) (Akcha et al., 2000a et b).

Les métaux induisent, de manière générale, des cassures de brin de l'ADN ainsi que des pontages protéine-ADN. Le Cd est aussi capable d'induire des oxydations de l'ADN par une induction de la production d'espèces radicalaires (Michel, 2011).

Les biomarqueurs de génotoxicité présentent un intérêt dans les études d'impact de la contamination du milieu aquatique sur des espèces sentinelles (Prein et al., 1978 ; Alink et al., 1980). L'étude des dommages à l'ADN a été proposée comme étant un outil adapté à l'évaluation des propriétés génotoxiques des polluants environnementaux et à la détection de leur présence dans le milieu naturel (Shugart, 2000).

Plusieurs techniques ont été utilisées afin d'évaluer les altérations de l'ADN induites par les polluants environnementaux chez les organismes aquatiques. Parmi ces techniques, on trouve le test de comètes, le test des micronoyaux, etc. Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé la technique de RAPD-qPCR pour étudier la génotoxicité chez les bivalves contaminés au benzo(a)pyrène.

- ***Technique de RAPD-PCR***

La technique d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe, plus connue sous le nom de RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), permet de détecter des modifications au niveau du génome de façon fiable et sensible. Elle a été largement utilisée pour la détection du polymorphisme intra-populationnel (Williams et al., 1990). Cette technique a été utilisée aussi dans le domaine de la carcinogénèse. Les tumeurs de certains organes (os, poumons et cerveau) ont été analysés par RAPD et des dommages à l'ADN furent décelés dans les profils d'amplification obtenus (Dil et al., 1998 ; Singh et al., 2001). Vu la sensibilité de cette technique pour détecter des modifications au niveau de l'ADN génomique des tumeurs comparés à des tissus seins, elle a été appliqué dans les études écotoxicologiques et elle a été prouvé comme étant un outil adéquat pour détecter les effets génotoxiques (adduits à l'ADN, cassures de l'ADN et mutations) des xénobiotiques chez les organismes vivants (Savva et al., 1996) (figure 17). Cette méthode a été utilisée pour la détection de différents changements qui ont eu lieu au niveau de l'ADN et qui ont était causés par différents agents chimiques et physiques tels que la mitomycine C, les métaux traces, les perturbateurs endocriniens, le benzo(a)pyrène, les UV et les rayons X (Atienzar et al., 2002a ; Atienzar et Jha, 2004, 2006 ; Enan et al, 2006). La RAPD s'avère donc efficace dans la détection d'effets génotoxiques de xénobiotiques sur tous types d'organismes. La RAPD a été critiqué pour ses inconvénients dont l'apparition de produits d'amplification parasites dans les réactions du témoin négative et le manque de reproductibilité (Atienzar et Jha, 2006).

Récemment, une nouvelle approche pour l'analyse de l'aspect quantitatif de la RAPD a été décrite par Cambier et al. (2010) afin de surmonter les limitations de la RAPD classique. Cette nouvelle méthode (RAPD-qPCR) utilise la PCR en temps réel pour évaluer l'efficacité de l'hybridation des amorces RAPD avec l'ADN génomique à la place de l'analyse électrophorétique. De plus, une comparaison des configurations des températures de fusion entre les réactions d'amplification donne un aspect qualitatif à la technique. Les avantages de cette méthode sont la faible quantité d'ADN génomique nécessaire pour l'analyse, le faible coût et le temps nécessaire pour l'analyse. Orieux et al. (2011) ont démontré que la RAPD-qPCR est plus sensibles que le test de comètes ou la quantification de la 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) dans la révélation de la génotoxicité chez le poisson zèbre *Danio rerio* exposé à une eau contaminée par le cadmium et le zinc. D'autres travaux ont pu déterminer l'effet toxique des nanoparticules d'or sur l'ADN du poisson zèbre en utilisant cette technique (Geffroy et al., 2012 ; Dedeh et al., 2014a).

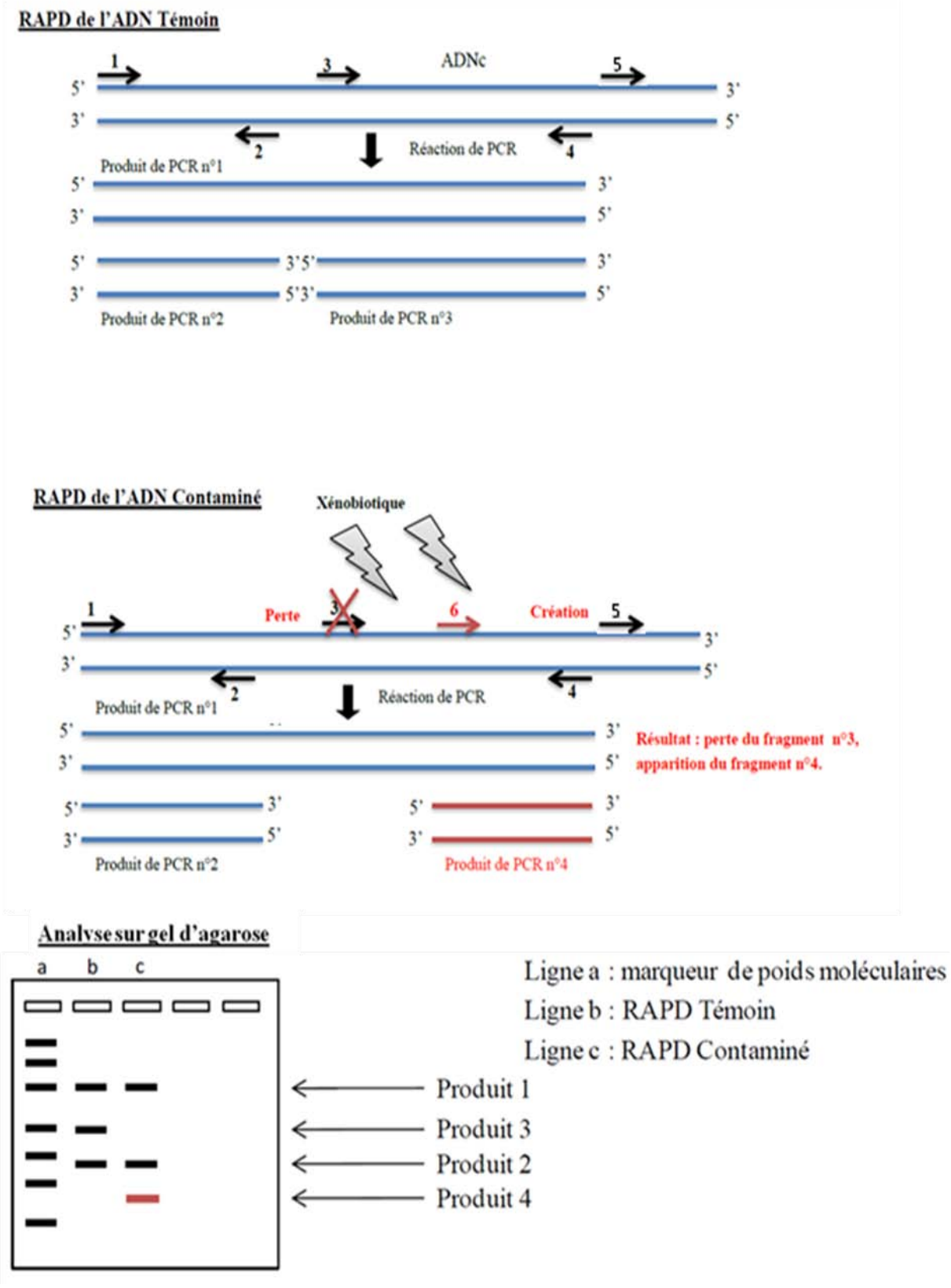


Figure 17: Schéma représentant le principe de la réaction de RAPD et son utilisation pour détecter les impacts génotoxiques avec le cas de la suppression du site d'hybridation n°3 simultanément à la création du site n°6 par un xénobiotique (Cambier, 2009).

2.2.3. La réponse transcriptomique à la contamination

L'utilisation des réponses biologiques précoces en écotoxicologie est basée sur l'hypothèse que le temps de réponse biologique augmente avec le niveau d'organisation biologique. Ainsi, des changements dans l'expression des gènes pourront conduire à des changements dans les processus cellulaires, puis se traduire au niveau de l'organisme et peut-être ensuite de la population (Snape et al., 2004). Les liens de causalité entre les signaux précoces et les effets sur les organismes ou sur les populations ont été peu documentés jusqu'à présent.

Les réponses moléculaires précoces représentent une composante clés dans la compréhension du mécanisme d'action d'un seul composé chimique ou d'un mélange de contaminants environnementaux (figure 18). Ces réponses moléculaires conduisent généralement à des changements biologiques affectant la santé générale de l'organisme ou de la population (diminution de la survie, de la croissance ou de la reproduction) (Williams et al., 2014). Par exemple, Ankley et al. (2009) ont montré que les réponses transcriptomiques aux perturbateurs endocriniens pouvaient prédire la capacité de reproduction et par conséquent la taille de la population des poissons.

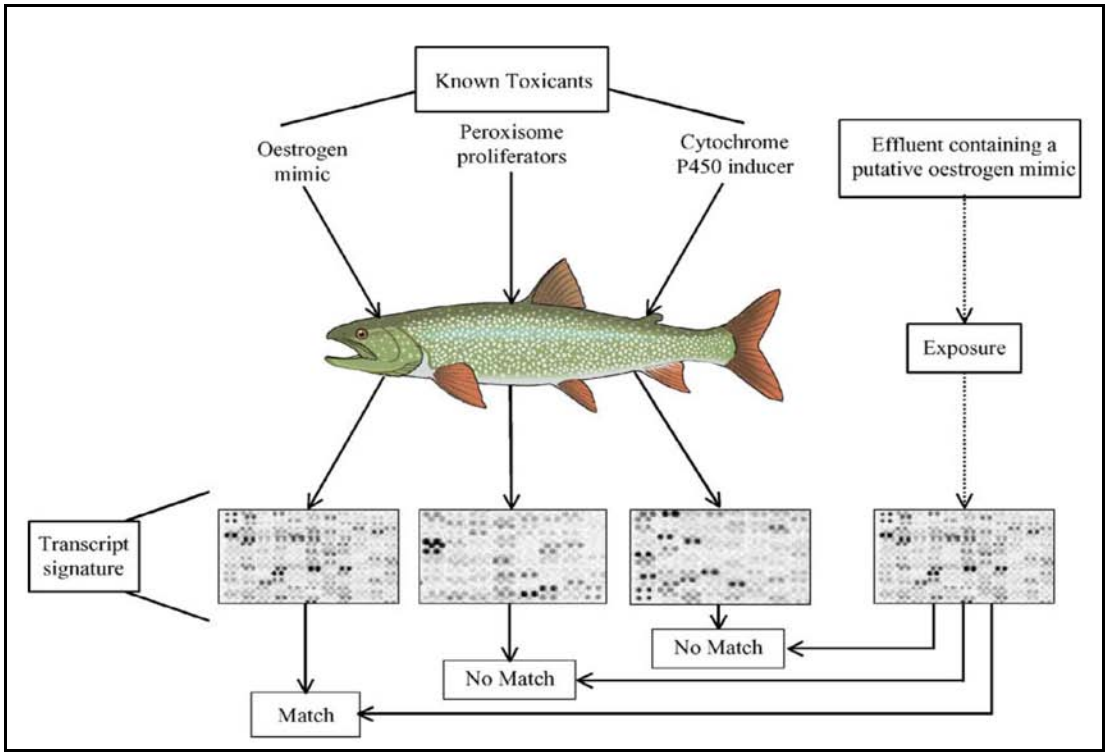


Figure 18 : Schéma simplifié montrant l'application de l'expression génétique pour identifier le mécanisme d'action potentiel d'un contaminant environnemental inconnu (adapté de Nuwaysir et al., 1999, *dans* Snape et al., 2004).

L'approche transcriptomique connaît un essor particulier depuis les années 90 (Campos et al., 2012), particulièrement chez les bivalves (Banni et al., 2010a ; Li et al., 2013). Les techniques classiques de biologie moléculaire restreignaient l'analyse à quelques gènes. Dû au développement important de la génomique récemment, il devient possible d'étudier l'expression de tous les gènes d'un organisme par des techniques de pointes tel que l'utilisation de puce à ADN. Les analyses de puces à ADN en écotoxicologie sont de plus en plus utilisées pour évaluer les impacts de polluants sur l'expression d'un grand nombre de gènes (Reynders et al., 2006). Par ailleurs, une des applications de la transcriptomie est la surveillance de l'environnement. Le but de son utilisation est de déterminer les altérations transcriptionelles induites chez des organismes exposés à des milieux contaminés dans le but d'identifier les effets nocifs sur la santé ainsi que la gestion et la remédiation de l'environnement (Williams et al., 2014).

Certains résultats ont montré une réponse rapide dans l'expression des gènes et à des concentrations beaucoup plus faibles que celles utilisées habituellement avec les marqueurs standards (survie et anomalie du développement) chez les embryons du poisson zèbre *Danio rerio* (Voelker et al., 2007) et surtout confirment l'hypothèse que ces changements précoces sont reliés à des effets sur les organismes. Par ailleurs, une modification de l'expression des gènes impliqués dans le stress oxydant, le métabolisme mitochondrial, le mécanisme de détoxication et la réparation de l'ADN a été enregistrée chez *Danio rerio* exposé aux nanoparticules d'or. Varotto et al. (2013) ont montré un changement dans l'expression des gènes chez des moules exposées à un mélange de métaux lourds (Cu, Cd et Hg) et ils ont pu démontrer la complexité de la réponse cellulaire induite vis-à-vis de cette contamination grâce à l'étude transcriptomique. Ces auteurs encouragent l'utilisation des biomarqueurs moléculaires (expression des gènes) dans les programmes de biosurveillance utilisant les bivalves comme bioindicateur.

La quantité d'ARNm d'un gène dépend de nombreux autres facteurs dont il faut tenir compte dans l'interprétation des résultats. Une régulation « post-transcriptionelle » peut avoir lieu dans la cellule (Nikinmaa et Rytkönen, 2012) à tous les niveaux d'expression d'un gène (transcription, traduction…), en lien avec les facteurs environnementaux (Nikinmaa et Rytkönen, 2011) tels que les contaminants chimiques. Il convient donc d'interpréter les données de transcriptomique avec précautions et de les compléter si possible par une approche

protéomique ou métabolomique permettant de faire le lien avec « la fonction » (Campos et al., 2012).

2.2.4. Les réponses histopathologiques

Généralement, les réponses à des niveaux d'organisation biologique inférieurs (par exemple, les réponses moléculaires et biochimiques) sont plus spécifiques, sensibles, reproductibles et plus faciles à déterminer, mais c'est plus difficile à les rattacher aux changements écologiques. En revanche, les réponses à des niveaux d'organisation biologique supérieurs (par exemple les réponses de population et de la communauté) sont directement indicatives de la santé de l'écosystème et, par conséquent, beaucoup plus pertinente pour la gestion de l'environnement. Cependant, ils sont plus difficiles à déterminer, moins précis et se manifestent tardivement lorsque les dommages environnementaux ont déjà eu lieu (Connell et al., 1999). Cependant, les réponses histopathologiques sont relativement faciles à déterminer et peuvent être liées directement à la santé des individus qui, à son tour, permet l'extrapolation aux effets au niveau des populations/communautés (Au et al., 2004). D'après certains auteurs, les réponses histopathologiques sont très sensibles à des niveaux de contaminations sublétales majoritairement présents en milieu naturel (Riba et al., 2004). Cependant, un des handicaps de l'utilisation des réponses histopathologiques dans la biosurveillance des milieux aquatiques est le manque de connaissances spécifiques sur la microanatomie et la micropathologie de nombreux groupes d'organismes, essentiellement les invertébrés (Costa et al., 2013).

Plusieurs altérations histopathologiques ont été développées chez les poissons et les bivalves et ont été recommandées comme biomarqueurs pour la surveillance des effets de la pollution. Récemment, les programmes de biosurveillance dans le bassin méditerranéen réalisés dans le cadre du « Programme des Nations Unies pour l'Environnement » (the United Nations Environment Program, UNEP), ont recommandé l'utilisation de certaines réponses cellulaires chez les mollusques et les poissons comme biomarqueurs histo-cytologiques pour évaluer l'impact de la pollution dans les milieux côtiers (Au, 2004).

Plusieurs études ont montré l'intérêt des altérations histopathologiques en tant qu'indicateur sensible et fiable de la santé des poissons sauvages capturés dans le milieu naturel (Myers et al., 1998 ; Bogovski et al., 1999). D'autres études au laboratoire ont également montré une relation cause-effet entre l'exposition aux xénobiotiques et le développement des lésions hépatiques toxicopathiques (Vethaak et Jol, 1996 ; Vethaak et al., 1996). En générale, les changements histopathologiques dans les branchies sont sensibles

mais pas spécifiques à l'exposition à un contaminant. L'hyperplasie épithéliale avec la fusion lamellaire, l'hypertrophie épithéliale, la télangiectasie, l'œdème avec soulèvement de l'épithélium lamellaire et la desquamation épithéliale sont des lésions histopathologiques typiques des branchies qui se manifestent en tant que réponse à une large gamme de contaminants dont les organochlorés, les composés pétroliers, les organophosphates, les carbamates, les herbicides et les métaux lourds (Hemalatha et Banerjee, 1997 ; GlobalTox, 1997). Les œdèmes et les l'hyperplasie des cellules muqueuses sont symptômes généraux associés à la toxicité du pétrole brut chez les poissons (Khan, 1995).

Chez les bivalves, des altérations histopathologiques peuvent être associées à l'exposition à des contaminants environnementaux. Ce type de réponse est rarement systématique et se traduit le plus souvent par des fréquences plus importantes chez les populations ou groupes exposés que chez les témoins. Il a été démontré que les altérations histopathologiques au niveau des branchies et des glandes digestives des bivalves sont sensibles à une large gamme de contaminants. Ainsi, l'huitre américaine (*Crassostrea virginica*) collecté dans des sites contaminés par des hydrocarbures pétroliers et des métaux lourds a montré des lésions au niveau des diverticules digestifs (ex. nécroses, augmentation des cellules hemocritique) et des branchies (ex. œdèmes, hyperplasie des cellules épithéliales), qui ont été bien corrélées aux concentrations de la fraction non résolue des hydrocarbures (UCM) et de cadmium dans l'eau (Gold-Bouchot et al., 1995).

Concernant les bivalves, les néoplasies et les pathogènes sont parmi les sujets clés dans les études histopathologiques effectuées sur des bivalves sauvages aux fins de la biosurveillance. La plupart de ces études se concentrant sur des espèces commerciales, localement importantes.

Les altérations histopathologiques des branchies et de la glande digestive chez les bivalves ont reçu une attention croissante dans la surveillance de la pollution marine. Cependant, ils ne sont pas utilisés aussi largement que chez les poissons dans les programmes internationaux de surveillance de la pollution, puisque leurs relations dose-réponse vis-à-vis d'un contaminant, ainsi que les facteurs biotiques et abiotiques qui contribuent à la pathologie des bivalves, restent mal connus (Au, 2004).

A la lumière de cette synthèse bibliographique on se proposait de réaliser :

- une étude *in situ* afin d'évaluer l'état de contamination d'un milieu lagunaire méditerranéen, la lagune de Tunis, par les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les métaux traces et d'étudier les effets de cette contamination aux niveaux biochimique, moléculaire et histologique chez la palourde *Ruditapes decussatus*.

- une étude *in vivo* dans le but de caractériser les effets biochimiques, moléculaires (expression des gènes) et génotoxiques d'un composé HAP, le benzo(a)pyrène, chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et l'huître creuse *Crassostrea gigas.*

CHAPITRE II :
BASES METHODOLOGIQUES

A. Modèles biologiques utilisés

1. CHOIX DES ESPECES

Le choix du modèle biologique adéquat constitue une première étape pour l'élaboration d'une stratégie de l'évaluation de la contamination de l'environnement, basée sur les biomarqueurs. Dans une optique de surveillance du niveau de pollution de l'environnement, les organismes sentinelles sont déterminants afin de détecter une pollution, au sens large du terme, le plus précocement possible. Les espèces bioaccumulatrices retenues comme bioindicateurs sont en général des espèces sessiles, abondantes, relativement résistantes aux toxiques et d'une durée de vie suffisante qui leur confère une capacité d'intégration des variations de la qualité du milieu (Amiard et al., 1989). En milieu aquatique, les mollusques bivalves comptent parmi les espèces sentinelles couramment utilisées en écotoxicologie et ont été utilisés intensivement dans les programmes de surveillance de l'environnement (Bebianno et al., 2004 ; Banni et al., 2009a). Les bivalves étant des filtreurs, des organismes sédentaires ou à mobilité réduite du fait de leur particularité biologique d'organismes sessiles, accumulent des polluants à des concentrations plus élevées que celle retrouvées dans les eaux environnantes (Oliver et al., 1999). Les mollusques bivalves sont en effet capables d'accumuler de très fortes concentrations en polluants et, par leur longévité, ils sont très utiles pour un suivi écotoxicologique. De plus, étant peu mobiles, ils sont représentatifs des contaminants présents dans un site. De ce fait, la mesure des contaminants dans les tissus de mollusques bivalves peut être utilisée pour estimer le type et la quantité relative de ces contaminants dans la colonne d'eau (Phillips, 1986). La palourde a été utilisée par le réseau national tunisien de surveillance des zones de production des mollusques bivalves qui a été mis en place depuis 1995.

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé trois espèces de bivalves marins, qui sont la palourde commune (ou européenne) *Ruditapes decussatus*, la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Concernant l'étude *in situ* qui vise à évaluer les effets biologiques induits par un mélange de polluants dans des conditions naturelles, le modèle biologique utilisé est la palourde commune *Ruditapes decussatus*. D'autre Part, un ensemble d'expériences au

laboratoire (expériences *in vivo*) ont été menées pour mieux caractériser les réponses biologiques (biochimiques et moléculaires) du bivalve exposé à un modèle d'hydrocarbures aromatique polycyclique. Dans ces expériences *in vivo,* la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* a été utilisée, dans un premier temps, vue sa grande similarité avec la palourde *R. decussatus* et son abondance dans le bassin d'Arcachon. Dans un deuxième temps, l'huître creuse ou japonaise *Crassostrea gigas* a été utilisée comme modèle biologique dans une étude comparative de sa réponse biologique avec celle de la palourde *R. philippinarum* vis-à-vis du contaminant utilisé. L'huître *Crassostrea gigas* a été choisie comme troisième modèle biologique pour son omniprésence dans le bassin d'Arcachon.

2. LES PALOURDES : *R. DECUSSATUS* ET *R. PHILIPPINARUM*

2.1. Morphologie et taxonomie des palourdes

La palourde possède une coquille équivalve, inéquilatérale. Elle est ornée d'un double jeu de stries rayonnantes, partant du sommet et de stries concentriques, bien marquées à l'arrière. La charnière comprend trois dents cardinales sur chaque valve. Il n'y a pas de dents latérales. La forme générale de la coquille peut varier énormément d'une population à l'autre. La coloration externe de la coquille est très variée. La ligne palléale et les cicatrices des muscles adducteurs sont distincts à la face interne des valves (Franc, 1960 ; Poppe et Goto, 1991).

La classification adoptée pour les deux espèces est la suivante :

- **Règne :** Animales
- **Embranchement :** Mollusques
- **Classe :** Bivalves
- **Sous-classe:** Heterodontae
- **Ordre :** Veneroida
- **Super-famille :** Veneroidea
- **Famille :** Veneridae
- **Sous-famille :** Tapetinae
- **Genre :** *Ruditapes*
- **Espèce :** *decussatus* (Linné, 1758)
- **Espèce :** *philippinarum* (Adams et Reeves, 1850)

2.2. Anatomie

L'anatomie de la palourde du genre *Ruditapes* a été décrite par Cesari et Pellizzato (1990) (figure 19). Les palourdes sont des animaux à corps mou enfermé dans une coquille à deux valves symétriques. Les valves sont articulées autour d'une charnière dorsale et maintenues par deux muscles adducteurs. Ces muscles adducteurs sont localisés à proximité des bords antérieurs et postérieurs des valves de la coquille et ils sont égaux. Les parties molles du corps sont enveloppées dans le manteau qui délimite la cavité palléale. Les siphons, entièrement rétractables, portent à leur extrémité distale un nombre variable de couronnes tentaculaires. Le pied est très musculeux; son volume et sa puissance sont en rapport avec le mode de vie fouisseur.

Il existe une paire de branchies symétriques de chaque côté du corps. Chaque branchie est formée de 2 lames, externe et interne. Chaque lame est constituée d'un feuillet descendant et d'un feuillet ascendant reliés à l'axe branchial. C'est dans cet axe que se trouvent les troncs vasculaires afférent et efférent et les principaux muscles assurant les mouvements branchiaux (Le Pennec et al., 2003). L'élément de base de la branchie est le filament. La ciliature des filaments consiste essentiellement en cils frontaux, latéro-frontaux et latéraux. L'eau circule dans le tissu branchial grâce au mouvement des cils latéraux. Les branchies assurent une fonction nutritionnelle et respiratoire en pompant l'eau dans le milieu.

Le système digestif des palourdes est simple. La bouche est une simple ouverture transversale entourée de deux paires de palpes labiaux. Après la bouche directement il y a un œsophage qui débouche dans l'estomac, qui est pourvu d'un sac du stylet cristallin et reçoit les diverticules de la glande digestive. La glande digestive est formée par un grand nombre de tubules digestifs à extrémité aveugle, communiquant avec l'estomac par une série de canaux ramifiés.

Le système circulatoire est semi-ouvert composé de veines, les artères, le cœur et le péricarde, permettant la libre circulation de l'hémolymphe au sein des tissus.

Le système nerveux est composé de trois paires de ganglions (cérébraux, pédieux et viscéraux) et de cordons nerveux innervant le pied, le manteau et la masse viscérale.

L'appareil reproducteur s'insinue à la surface et à la base du pied et il est très difficile de séparer le tissu gonadique de la masse viscérale et du pied. Les sexes sont sépares, bien

qu'il existe un hermaphrodisme juvénile assez fréquent mais temporaire (Delgado and Pérez-Camacho, 2002).

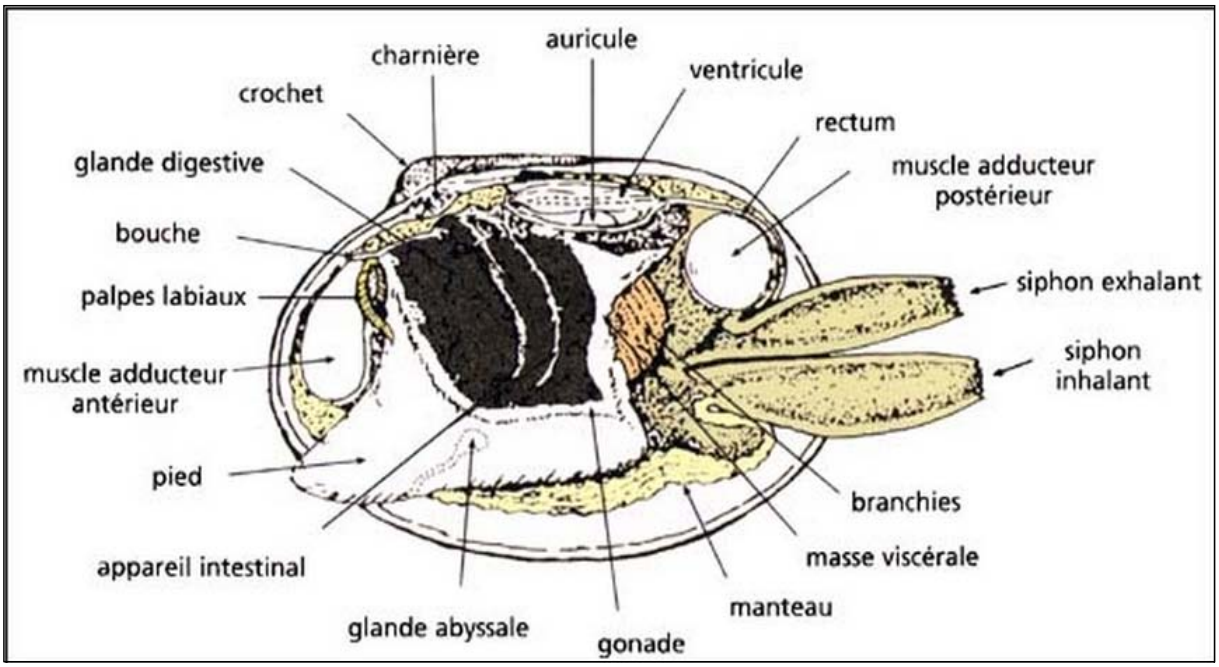


Figure 19 : Schéma montrant l'anatomie de la palourde du genre *Ruditapes* (Schéma modifié d'après Cesari et Pellizzato, 1990).

2.3. Alimentation

La palourde est suspensivore. Elle se nourrit principalement de phytoplancton et de matière organique particulaire. Ces éléments vitaux sont amenés par le courant d'eau créé par le siphon inhalant de la palourde à la surface du sédiment. L'eau ainsi filtrée passe à travers les branchies qui sont ciliés. Leurs battements créent des courants d'eau et le film de mucus secrété par les branchies englue les particules. Les matières non alimentaires sont éliminées avec le mucus, les matières alimentaires sont dirigées vers la bouche, puis elles arrivent à l'estomac où elles sont broyées par une tige cristalline. Le siphon exhalant assure la fonction d'excrétion (Sobral et Widdows, 2000).

2.4. Croissance

La croissance est fortement ralentie pendant la saison froide. Elle est maximale au printemps et à l'automne. De fortes variations entre les années sont observées, elles sont liées à la variabilité des conditions climatiques. La croissance est également très variable en fonction de la saison, du site, de la densité et de la nourriture disponible (Maître-Allain, 1983).

2.5. Reproduction

La palourde du genre *Ruditapes* est une espèce gonochorique à fécondation externe. En zone tempérée, la gonade se développe au printemps et la maturation dure de 2 à 5 mois sur des palourdes âgées d'au moins 2 ans et de taille minimale de 20 mm. L'apport trophique et la température sont deux conditions environnementales clés au développement gonadique. La gamétogenèse s'initie entre 8 et 12°C (Laruelle, 1999 ; Park et Choi, 2004). La ponte est initiée à partir de 12°C et est optimale lorsque la température de l'eau est comprise entre 20 et 22°C. Le cycle reproducteur est connu pour être variable et plusieurs pontes sont possibles dans une simple saison (Ponurovsky et Yakovlev, 1992). La phase pélagique larvaire dure deux à quatre semaines (Le Treut, 1986). Une série de métamorphoses intervient et la larve va ensuite se fixer sur le substrat.

En Tunisie, les deux périodes privilégiés de la ponte, pour l'espèce *R. decussatus*, se situent respectivement de fin mai à début juin et de la mi-octobre à début novembre (Trigui-El Menif, 1995). La maturation sexuelle et l'émission des gamètes se font sous l'effet d'une hausse progressive de température. L'essentiel de la reproduction s'effectue pendant le printemps et secondairement en automne, période coïncidant avec une augmentation de la production primaire (Trigui-El Menif, 1995).

2.6. Biotope et répartition géographique

La palourde affectionne des milieux abrités et plus particulièrement ceux à salinité variable comme les baies ou les lagunes littorales. Elle affectionne de nombreux types de substrats meubles : vases, sables et graviers, ainsi que ceux à granulométrie mixte. La palourde possède de fortes facultés d'enfouissement dans ces différents sédiments, grâce à son pied très développé. La profondeur d'enfouissement est en moyenne de 7 cm. Elle peut atteindre 10-12 cm lors de très faibles températures hivernales (Le Treut, 1986).

La palourde *R. decussatus* est une espèce à vaste répartition géographique, on la rencontre, en effet, dans l'océan Atlantique (au niveau des côtes de la manche). Elle est absente dans la mer du nord sauf en Norvège et au Denmark. Plus au sud, elle est présente jusqu'aux côtes sénégalaises, tout le long des côtes de la mer Méditerranée jusqu'au nord de la mer Rouge où l'espèce a immigré par le canal de Suez (Poutiers, 1987). Elle semble même atteindre les côtes du Congo (Trigui-El Menif, 1995). En Méditerranée, l'espèce est présente sur toutes les côtes.

En Tunisie, sa répartition est variable. Elle est très abondante dans le nord (lagune de Bizerte, Golfe de Tunis et lagune de Tunis), moyennement abondante dans le Golfe de Gabès, région de Sfax et région de Mednine, elle devient rare sur les côtes du Sahel et elle est absente au Cap-Bon (Medhioub, 1993).

La palourde *R. philippinarum* est originaire de la province indopacifique : des mers de Philippines, de Chine et du Japon (Ponurovsky et Yakovlev, 1992). Elle s'est développée dans de nombreux pays suite à une introduction volontaire pour la conchyliculture ou accidentelle liée à l'importation de naissain d'huître (Le Treut, 1986). Elle a été importée en France en 1972 à partir des populations nord américaines puis en Angleterre, Espagne, Irlande, Italie et Allemagne (Ponurovsky et Yakokvlev, 1992). En Europe, des populations sont observées des côtes britanniques et norvégiennes aux rias espagnoles, ainsi qu'en Méditerranée et en Adriatique.

3. L'HUITRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS*

L'huitre est la première espèce de mollusque cultivée au monde avec 4,3 millions de tonnes produites en 2009. *C. gigas* représentait 649 000 tonnes de cette production (www.fao.org).

3.1. Morphologie et taxonomie de l'huître

Le corps mou de l'huître est protégé par une coquille calcique à deux valves de formes irrégulières et asymétriques. Les valves sont généralement blanchâtres et présentent de nombreuses stries et tâches de couleur pourpre ou grise qui rayonnent à partir de l'umbo (Pauley et al., 1988). La valve inférieure creuse et la valve supérieure plus plane sont jointes par un ligament charnière et un muscle adducteur puissant (Kennedy et al., 1996). La forme générale de la coquille dépend fortement du type de sol et du mode d'élevage utilisé.

Selon World Register of Marine Species (www.marinespecies.org) la classification de l'huître creuse est la suivante :

- **Règne :** Animale
- **Embranchement :** Mollusque
- **Classe :** Bivalve
- **Sous-classe :** Pteriomorphia
- **Ordre :** Ostreoida
- **Super-famille :** Ostreoidea

- **Famille :** Ostreidae
- **Sous-famille :** Crassostreinae
- **Genre :** *Crassostrea*
- **Espèce :** *gigas* (Thunberg, 1793)

3.2. Anatomie

L'anatomie de l'huître creuse est celle d'un mollusque bivalve, donc elle est semblable à celle de la palourde (figure 20). Les parties molles du corps sont enveloppées dans un manteau dont les deux lobes sont soudés dorsalement près de la bouche. Le manteau délimite la cavité palléale. Les branchies lamellaires, s'étendant le long du manteau sur la partie dorsale, assurent la double fonction de respiration et de nutrition. Le système digestif est composé de la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin, la glande digestive, le rectum et l'anus. La gonade est un organe diffus et transitoire qui se développe autour de la glande digestive. Le système circulatoire des huîtres est partiellement clos. Le système nerveux est formé par des ganglions nerveux. L'appareil reproducteur comprend une gonade indifférenciée qui enveloppe la glande digestive (Grizel, 2003).

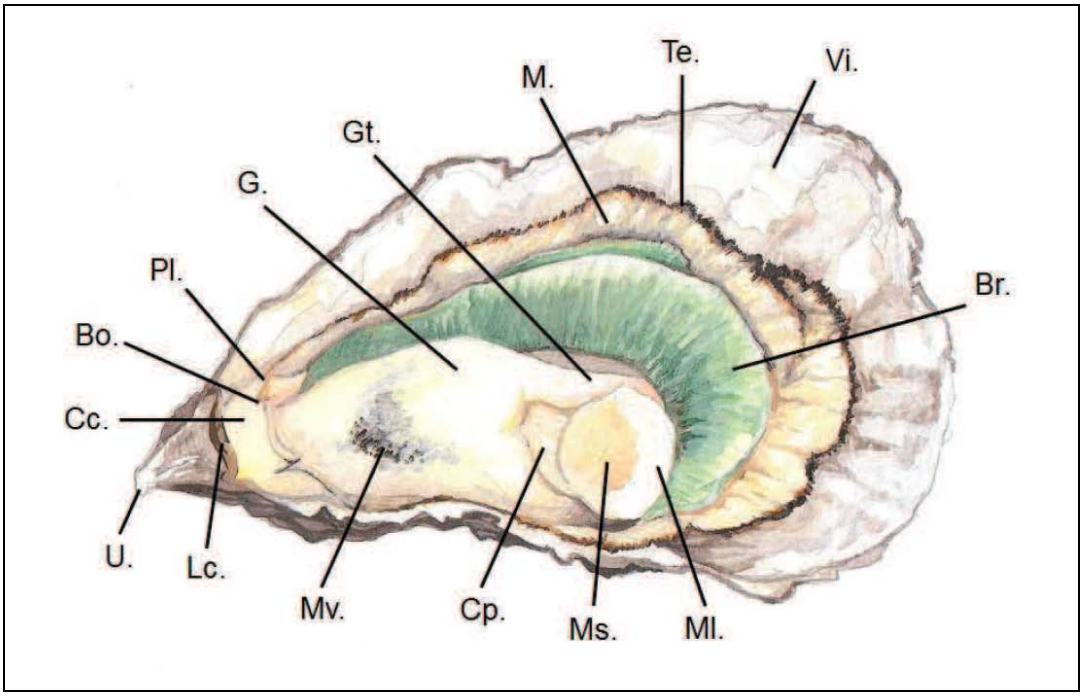


Figure 20 : Schéma montrant l'anatomie de *Crassostrea gigas* dans sa valve inférieure. Par ordre alphabétique : Bo. : bouche ; Br. : branchies ; Cc. : capuchon céphalique ; Cp. : cavité péricardique ; G. : gonade ; Gt. : gonoducte ; Lc. : ligament charnière ; M. : manteau ; Ml. : muscle lisse ; Ms. : Muscle strié ; Mv. : masse viscérale ; Pl. : palpes labiaux ; Te. : tentacules ; U. : umbo ; Vi. : valve inférieure (Schéma d'après illustration provenant de Normand, 2009).

3.3. Alimentation

Comme les palourdes, les huîtres sont des organismes filtreurs suspensivores, elles se nourrissent des éléments en suspension dans l'eau de mer aspirée (phytoplancton, bactéries, etc.). Les particules sont acheminées vers la bouche par des battements ciliaires alors que les particules non nutritives sont agglomérées puis excrétées sous forme de pseudo-fécès (tri réalisé au niveau des palpes labiaux).

3.4. Reproduction

L'huître creuse est un mollusque hermaphrodite protandre de type alternatif irrégulier (Katkansky and Sparks, 1966). *C. gigas* est généralement mâle lors de la première saison de reproduction et des changements de sexe ont été observés de façon alternative et irrégulière chez un même individu lors des autres saisons de reproduction (Pauley et al., 1988). La fécondation est externe et a lieu dans la colonne d'eau après l'émission estivale des gamètes. Les premiers stades de la gamétogenèse apparaissent au printemps en mars-avril (Goulletquer, 1995) et la ponte a lieu entre mi-juin et mi-septembre (Perrière-Rumèbe, 2012).

3.5. Biotope et répartition géographique

Les huîtres creuse occupent les zones intertidales, des milieux estuariens et littoraux préférant les substrats solides sur lesquels elles peuvent se fixer, mais il est possible de les trouver sur des fonds vaseux et sablo-vaseux et de les élever en pleine eau. L'huître creuse supporte une large gamme de salinité (10-42) (Shatkin et al., 1997), de températures (4-34°C), d'oxygène (Bougrier et al., 1998) et de milieux plus ou moins riches en nutriments (Grizel, 1996). La distribution de *C. gigas* est très large. Initialement originaire des côtes nord-est d'Asie, l'huître creuse a ensuite été introduite sur la côte ouest des Etats-Unis de l'Alaska à la Californie, en Europe et en Australie (Ruesink et al., 2005 ; Troost, 2010). En France, *C. gigas* a été introduite à titre expérimental à la fin de l'année 1960 (Coic, 2007).

B. Approche de terrain (*in situ*)

1. PRESENTATION DU SITE D'ETUDE

1.1. Situation géographique de la lagune de Tunis

La lagune de Tunis, communément appelée « Lac de Tunis », est un bassin de 4000 ha de superficie en forme d'ellipse, situé au nord-est de la Tunisie, à la limite nord-est de l'Afrique du nord. La Lagune est située à l'Est de la ville de Tunis entre la région de Carthage au Nord et celle de Radès au Sud. Elle est positionnée entre les deux latitudes 36°41'N et 36°46'N et les deux longitudes 10°11' E et 10°18' E. Elle se trouve au fond du golfe de Tunis situé au sud du canal sicilo-tunisien. Elle prolonge le golfe de Tunis dont elle se trouve séparée par un étroit cordon littoral continu de l'embouchure de l'oued Méliane aux collines de Sidi Bou Saïd. La lagune est composée d'un canal de navigation séparant les deux parties de la lagune (nord et sud) sur une longueur supérieure à 10 km (Belkhir et Hadj Ali, 1983).

La région de Tunis est considérée comme semi-aride, caractérisée par une pluviométrie irrégulière avec une moyenne annuelle de l'ordre de 458 mm, une évaporation annuelle moyenne de 1500 mm. Les vents dominants sont du secteur ouest, leur vitesse dépasse rarement les 10 $m.s^{-1}$ (Jouini et al., 2005). D'après les données climatologiques mensuelles de la période allant de 1992 à 2002 fournies par l'Institut National de la Météorologie (INM), la température maximale moyenne de l'air est enregistrée au mois d'août avec 41,7°C, alors que la température minimale moyenne est de 4,2°C au mois de février.

1.2. Environnement sédimentaire

La lagune de Tunis est une lagune d'origine sédimentaire. La vase s'y étend sur une épaisseur de plusieurs mètres dont la couche superficielle noire contient 2,1 tonnes/ha de phosphore et 8 tonnes/ha d'azote (Turki et Hadj Ali Salem, 1990). Les strates sédimentaires qui tapissent le fond de la lagune de Tunis sont l'œuvre de plusieurs agents qui contribuent à l'alimentation de la lagune en matériaux sédimentaires. Parmi ces agents on trouve : le ruissellement (les oueds de Madjerda et Méliane), les apports marins (courants de marées, dérive littoral et érosion côtière), les apports éoliens, les organismes vivants dans la lagune et

les apports humains (égouts, dépôts d'ordures, effluents industriels, engrais chimiques). Cette situation a été favorisée par l'isolement progressif de la lagune par rapport à la mer et également par les conditions paléochimiques et paléogéologiques qui ont régné sur le site depuis les deux derniers siècles.

1.3. Sources de pollution et aménagement de la lagune

La lagune a toujours constitué l'exutoire naturel des eaux usées urbaines et industrielles ainsi que les eaux pluviales de la ville de Tunis. Cette situation, combinée à un faible taux de renouvellement des eaux de la lagune, a conduit à la dégradation progressive et continue de la qualité des eaux de ce milieu.

La lagune de Tunis est caractérisée par la présence des ports les plus importants en Tunisie tels que le port de Radès (premier port de commerce du pays) et celui de La Goulette, qui contribuent à la contamination de l'écosystème lagunaire. La centrale électrique de Radès, la plus grande centrale en Tunisie, est situé également dans cette zone à coté canal de navigation et de la zone industrielle. Elle pompe ses eaux de refroidissement dans le canal de navigation et les rejette directement dans la baie de Tunis près de la passe de canal de Radès (lieu d'entrée de l'eau de mer du Golfe de Tunis vers le lac sud de Tunis). Les rejets de cette centrale sont estimés de l'ordre de 1,3 millions m^3/jour (Chouba, 2009). La lagune drainait un bassin versant d'environ 4000 ha dont 1500 ha occupés par les zones industrielles. Il recevait ainsi environ 5500 m^3/jour d'eaux usées industrielles très polluées, riches en métaux lourds (chrome, cuivre, etc.) et en hydrocarbures (Jouini et al., 2005)

Le besoin pressant d'une intervention rapide face à l'état critique atteint par la lagune au début des années 1980 a conduit au lancement d'un large programme d'aménagement dans le but d'améliorer, de contrôler et de gérer la qualité de l'eau dans le lac nord de Tunis. Le succès de ce projet, qui a conduit à une amélioration de la qualité de l'eau et la diversité biologique (Shili et al., 2002), a encouragé les autorités tunisiennes à lancer un projet d'aménagement similaire dans le lac sud de Tunis (avril 1998- juillet 2001). Le tableau IV présente les caractéristiques du lac sud de Tunis avant et après l'aménagement.

Tableau IV : Les caractéristique du lac sud de Tunis avant et après l'aménagement (Ben Souissi, 2002 ; Jouini et al., 2005)

Avant aménagement	Après aménagement
- Une superficie de 12 $km^{2.}$	- Une superficie de 7 km^2.
- Une hauteur d'eau variant de 0,1 m à 1 m avec une moyenne de 0,7 m.	- Une hauteur d'eau variant de 1,7 m à 4 m avec une moyenne 2,4 m.
- Le volume moyen d'eau dans le lac est de l'ordre de 7 700 000 m^3.	- Le volume moyen d'eau dans le lac est de l'ordre de 17 300 000 m^3.
- Un faible hydrodynamisme.	- Un bon hydrodynamisme.
- Le volume des échanges d'eau avec la mer est situé entre 127 000 et 417 000 m^3/jour.	- Le volume des échanges d'eau avec la mer est de l'ordre de 2 570 000 m^3/jour.
- La concentration moyenne annuelle en azote total est égale à 170 mg/m^3.	- La concentration moyenne annuelle en azote total est égale à 635 mg/m^3.
- La concentration moyenne annuelle en phosphore total est égale à 155 mg/m^3.	- La concentration moyenne annuelle en phosphore total est égale à 31 mg/m^3.
- La concentration moyenne annuelle en chlorophylle-a est égale à 33,6 mg/m^3.	- La concentration moyenne annuelle en chlorophylle-a est égale à 2,1 mg/m^3.
- La salinité maximale atteignait est égale à 51,9 psu.	- La salinité maximale atteignait est égale à 38,6 psu.
- Présence de zones de stagnation d'eau.	- Absence de zones de stagnation d'eau.
- La transparence de l'eau de mer est très réduite.	- L'eau de mer est transparente (une visibilité jusqu'à 2 m).
- Une forte prolifération des algues nitrophiles avec une concentration de 10 kg/m^3.	- Une disparition sensible des algues nitrophiles en faveur d'espèces marines.
- Le milieu lagunaire est hypereutrophe.	- Le milieu lagunaire est mésotrophe.

2. LOCALISATION DES STATIONS D'ECHANTILLONNAGE

Le choix des stations d'échantillonnage s'est basé principalement sur la présence des palourdes et la localisation des sources de contamination.

Les palourdes *Ruditapes decussatus* ont été récoltées mensuellement dans la lagune de Tunis durant la période allant de septembre 2008 jusqu'à août 2009 à partir de trois zones (figure 21) :

- Z1 : se localise au voisinage des industries pétrochimiques et de la centrale électrique de Radès.

- Z2 : se localise entre les stations Z1 et Z3, au voisinage du canal de navigation et des industries pétrochimiques.

- Z3 : se localise au voisinage du port de Radès.

Les sédiments ont été prélevés saisonnièrement dans le lac de Tunis durant la même période à partir de six stations, 3 stations (S1, S4 et S5) sont localisé au voisinage du canal de navigation, alors que les autres (S2, S3 et S6) sont plus éloignés du canal (figure 35):

- S1 et S2: situées au voisinage de la zone industrielle et de la centrale électrique de Radès.

- S3 et S4 : localisées en face des stations S1 et S2, respectivement et plus éloignées de la zone industrielle que ces dernières.

- S5 et S6 : localisées au voisinage du port de Radès.

Des échantillons de la palourde *R. decussatus* et des sédiments ont été prélevés d'un site de référence qui est la région de Louza. Ce choix a été basé sur la littérature, car ce site a été largement utilisé dans les études sur terrains concernant les côtes tunisiennes (Banni et al., 2005, 2007). L'état de « santé » du site Louza nous permet de le considérer comme site de référence dans les programmes de biosurveillances sur les côtes tunisiennes (Banni et al., 2009a). Ce site est situé dans le golfe de Gabès entre la Chebba et Sfax. Cette frange littorale correspond à un milieu calme (faible agitation) avec un fond vaseux-sableux. La ponte du fond est très douce, ce qui rend le phénomène de régression-transgression spectaculaire ; les profondeurs ne dépassent pas les 3 m. Ces paramètres écologiques (fond vaseux-sableux, faible hydrodynamisme) sont en faveur de la reproduction des palourdes.

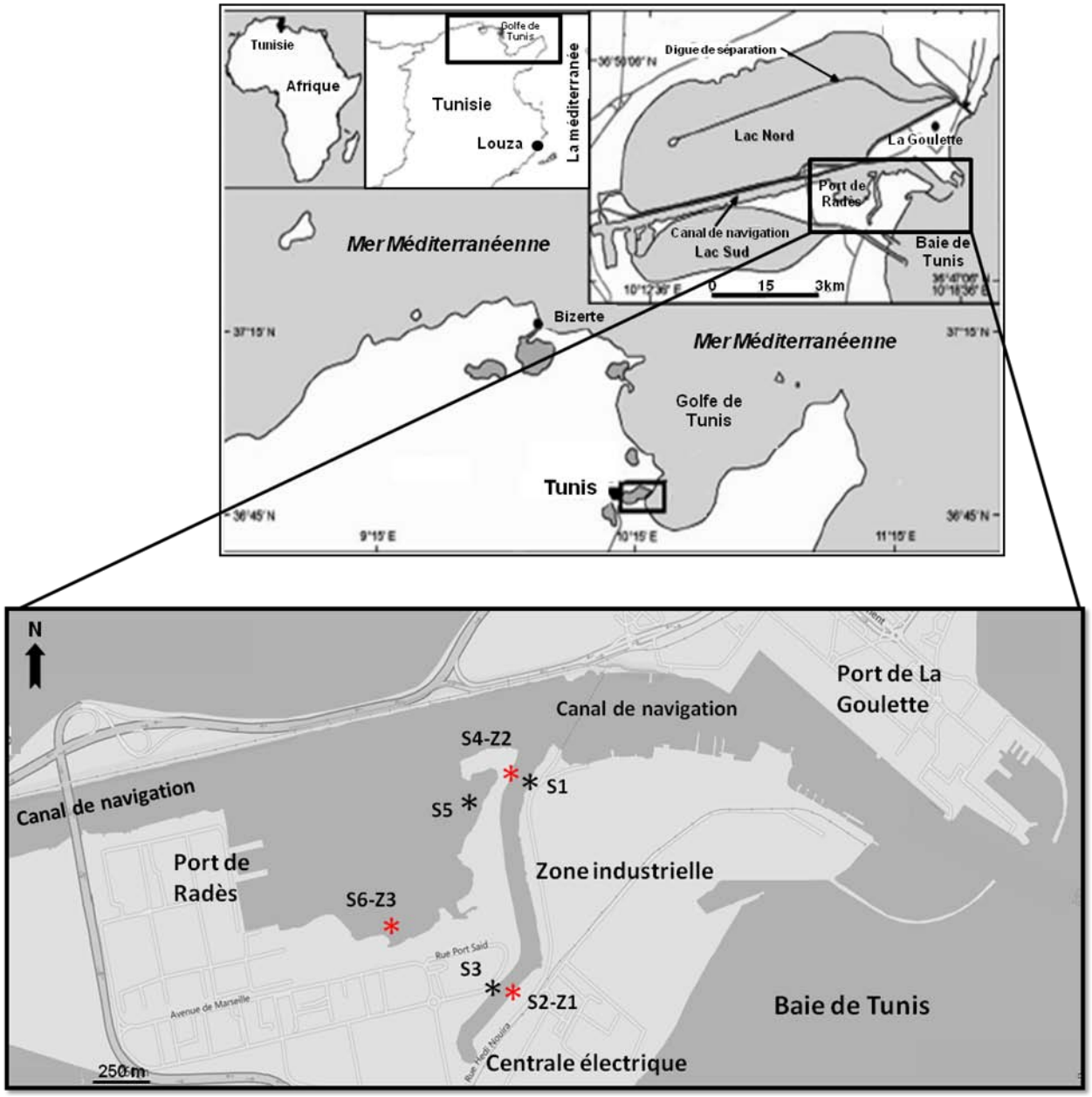


Figure 21 : Localisation des sites d'échantillonnage dans la lagune de Tunis et la région de Louza. * sites de prélèvement des palourdes et des sédiments, * sites de prélèvement des sédiments.

3. STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

L'échantillonnage a été réalisé dans le but d'étudier les variations spatio-temporelles des différents paramètres chimiques et biologiques choisis. Les compagnes d'échantillonnage ont été réalisées sur une année de façon mensuelle. Au total, douze compagnes ont été

effectuées. Compte tenu des différents objectifs de ce travail de terrain, plusieurs types d'échantillonnage ont été effectués à chaque compagne de prélèvement.

3.1. Collecte des palourdes *R. decussatus*

Les échantillons des palourdes *Ruditapes decussatus* (une centaine par station) ont été collectés mensuellement à partir des 3 sites d'étude (Z1, Z2 et Z3) dans la lagune de Tunis entre la période allant de septembre 2008 à août 2009. Les palourdes *R. decussatus* témoins ont été collectées saisonnièrement dans la région de Louza (site de référence) durant la même période (2008-2009).

Les palourdes prélevées sur terrain ont été ramenées directement au laboratoire et disséquées. Les tissus mous de 100 individus ont été prélevés, nettoyés avec de l'eau ultra-pure et gardés en pool à -80°C pour les analyses chimiques. Pour les analyses biochimiques, les branchies et les glandes digestives de 30 individus ont été prélevées, lavées brièvement dans un tampon d'homogénéisation glacé, groupées en dix pools et conservées à -80°C jusqu'à leur analyse. Pour l'étude histopathologique, 10 palourdes ont été disséquées et les branchies et les glandes digestives ont été mises immédiatement dans le fixateur « liquide de Bouin ». Concernant l'approche moléculaire, les branchies et les glandes digestives de 5 palourdes ont été conservées dans une solution de stabilisation de l'ARN (RNA*later*, Sigma) à -80°C.

3.2. Echantillonnage des sédiments

Les sédiments de surface (jusqu'à 20 cm de profondeur) ont été prélevés mensuellement des six stations (S1 à S6) dans la lagune de Tunis durant la même période de collecte des palourdes. Un échantillon de sédiments a été prélevé dans la région de Louza. Les échantillons ont été transportés au laboratoire et stockés à -20°C.

3.3. Détermination des paramètres physico-chimique de l'eau de mer

La qualité physico-chimique de l'eau de mer de la lagune de Tunis a été suivie mensuellement durant toute la période d'échantillonnage (septembre 2008 - août 2009) et pour les six stations d'étude. La température (°C) et la salinité (psu) ont été mesurées avec un Conductimètres WTW LF325 et le pH a été mesuré avec un pH-mètre 330i.

C. Approche expérimentale (*in vivo*)

Dans cette partie du travail, nous avons réalisé des expérimentations de contamination des bivalves (*Ruditapes philippinarum* et *Crassostrea gigas*) à un modèle de HAP, le benzo(a)pyrène (BaP), au laboratoire afin d'évaluer les effets biochimiques et génétiques de ce composé, ainsi que sa génotoxicité chez ces bivalves. Les palourdes japonaises ont été contaminées par le BaP en utilisant différents voies de contamination (voie directe et voie trophique), différents concentrations du contaminant (chroniques et aigues) et différents temps d'exposition. L'expérience de contamination de l'huitre creuse par le BaP a été réalisée dans un but comparatif avec la palourde japonaise.

1. COLLECTE ET CONDITIONNEMENT DES BIVALVES

Les palourdes (*R. philippinarum*) utilisées pour les différentes expériences ont été collectées dans le bassin d'Arcachon (site : Banc d'Arguin). Les huîtres (*C. gigas*) ont été obtenues auprès d'ostréiculteurs locaux et provenaient aussi du bassin d'Arcachon. Les expériences de contamination *in vivo* ont été réalisées à la Station Marine d'Arcachon.

Avant toute expérimentation, les bivalves ont été maintenus en stabulation pendant 4 semaines au laboratoire. Les animaux ont été placés dans des bacs alimentés en eau de mer en circuit ouvert. Ils ont été soumis à la photopériode naturelle. Pour chaque expérience, après stabulation, une acclimatation de 5 jours minimum a été effectuée avant de commencer la contamination. L'acclimatation était dans les mêmes conditions (Température, luminosité, salinité, pH) que celles des expériences de contamination.

Les différentes expériences ont été réalisées en conditions contrôlées de température (15°C). La salle de travail a été rendue hermétique à la lumière extérieure et la photopériode (L:D 12:12) réalisée via des néons (MASTER TL-D Xtra 36W/865 1SL, Philips, France). Tous les bacs expérimentaux ont été aérés via des bulleurs d'aquarium munis de capacitance pour éliminer les vibrations. En outre, afin d'éviter toute perturbation du comportement spontané des animaux, les expériences ont été effectuées sur des dispositifs anti-vibratoires. Dans les expériences concernant les palourdes on a utilisé, dans les bacs, du sable propre commercialisé comme substrat (5 cm de profondeur) pour ces animaux vue leur mode de vie.

2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

2.1. Expérimentation n°1 : Contamination des palourdes par le BaP via la voie trophique

2.1.1. Culture et contamination d'algues *Isochrysis galbana*

L'algue *Isochrysis galbana* est une microalgue dinoflagellé, de petite taille (2 à 5 µm) et de couleur brune. Elle est caractérisée par sa forme ovoïde, ses deux flagelles lisses et un haptonème très court dit « vestigial ». Les cellules sont habituellement recouvertes de minuscules écailles organiques (0,2 à 0,4 µm). Elle représente un aliment de grande importance pour les larves des bivalves et elle est maintenant largement cultivée pour une utilisation dans l'industrie de l'aquaculture de bivalves (FAO, 2004).

L'algue *I. galbana*, a été fournie par le Lycée de la mer de Gujan-Mestras (France). Pour des contenants allant jusqu'à 3 litres, *I. galbana* a été cultivée dans de l'eau de mer filtrée (0.22 µm). Les cultures ont été maintenues à 19 ± 1°C sous une photopériode L:D 14:10.

Pour la contamination d'algue *I. galbana*, un volume de 120 mL d'une culture d'algue avec une concentration de 3,5 10^6 cellules/mL a été placé dans chacun des trois Erlenmeyer de 250 mL. La concentration des cellules a été mesurée à l'aide du compteur Coulter Z2 (Beckman Coulter Inc., USA). En raison de la faible solubilité du BaP dans l'eau de mer les solutions ont été préparées dans du DMSO. Deux cultures d'algue ont été exposées à deux concentrations de BaP: C_A = 400 µg/L et C_B = 1000 µg/L, la troisième culture a été exposée au DMSO (Témoin). Le solvant est ajouté dans les cultures d'algue à un pourcentage de 0,1%. Les cultures d'algue ont été exposées au BaP pendant 24 heures en présence d'une faible ébullition pour l'homogénéisation du milieu (figure 38).

2.1.2. Exposition des palourdes aux microalgues prétraitées

Il y a 3 conditions (T, C_A et C_B), pour chaque condition 40 palourdes ont été placées dans un bac (circuit ouvert de l'eau). Les palourdes on été alimenté, chaque jours et durant une semaine (7 jours), par une concentration d'algue de 10^6 cellules/mL pendant 4 heures à raison de 60 mL/heure (240 x 10^6 cellules/bac/jours) (figure 22). Pendant l'étape d'alimentation le circuit d'eau était fermé durant 5 heures. L'alimentation commençait à 11 heures soit 3 heures après le début de la photopériode coïncidant à peu près à une distribution

optimale de l'ouverture des valves chez les animaux. L'apport d'algues vers les bacs expérimentaux était régulé par une pompe péristaltique (Gilson, USA) depuis chaque Erlenmeyer contenant 240 mL de culture d'algue prétraitée.

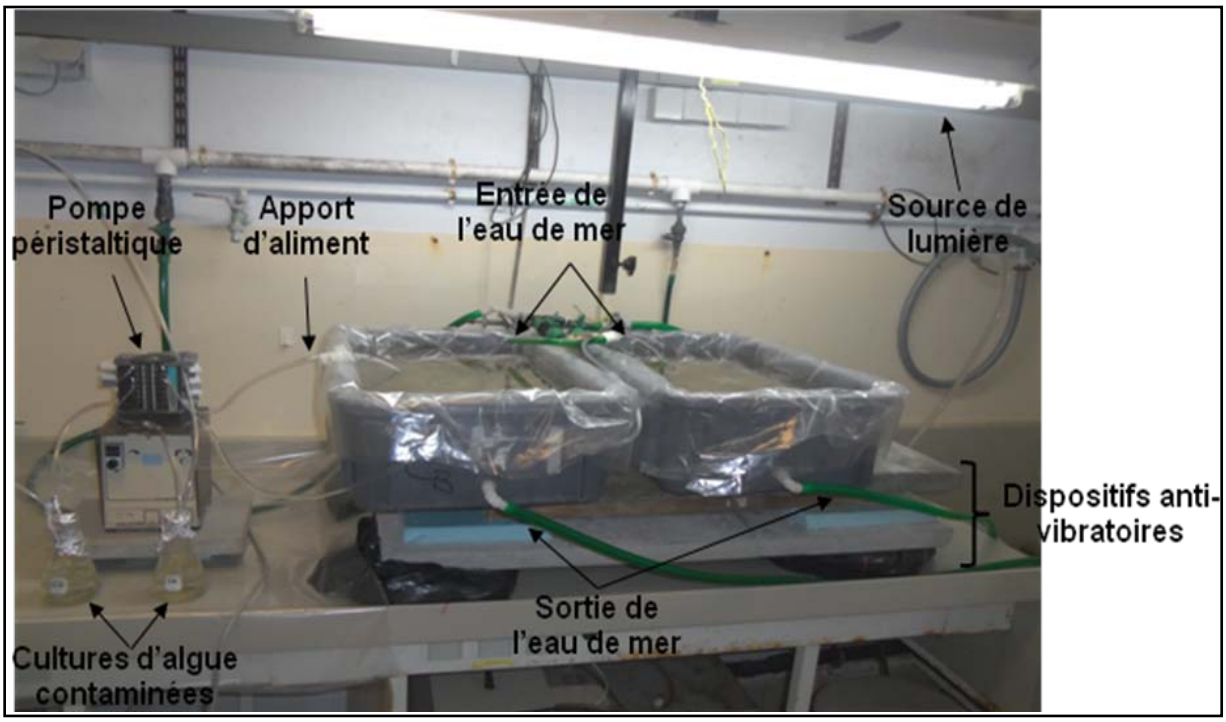


Figure 22 : Photo montrant le système expérimental de contamination des palourdes *R. philippinarum* par le benzo(a)pyrène via la voie trophique.

2.2. Expérimentation n°2 : Exposition des palourdes à des concentrations chroniques de BaP via l'eau de mer

Dans cette expérience les palourdes *R. philippinarum* ont été exposées à de l'eau de mer contaminée par deux concentrations de BaP : 2 µg/L et 5 µg/L). Le lot contrôle des palourdes a été exposé à l'eau de mer contenant du DMSO (solvant de solubilisation du BaP. Dans chaque aquarium, 40 palourdes ont été placées dans un volume de 40 L d'eau de mer (figure 40). Le volume du solvant (DMSO) ajouté dans les aquariums est à 0,0005% du volume total de l'eau. Dans cette expérience, il y a 3 conditions : Témoin (DMSO) = eau de mer +DMSO, C_A = 2 µg BaP/L et C_B = 5 µg BaP/L. L'expérience de contamination a durée 7 jours sans apport artificiel de nourriture, durant lesquelles l'eau de mer dans les aquariums a été renouvelée et contaminée chaque jour.

2.3. Expérimentation n°3 : Exposition des palourdes à des concentrations aiguës de BaP via l'eau de mer

Dans cette expérience les palourdes ont été exposées à l'eau de mer contaminée par des concentrations aiguës de BaP (solubilisé dans le DMSO). Il y a 6 conditions : Témoin = eau de mer, Témoin (DMSO) = eau de mer + DMSO, C_1 = 400 µg BaP/L, C_2 = 700 µg BaP/L, C_3 = 1000 µg BaP/L et C_4 = 1300 µg BaP/L. Pour chaque condition, 20 palourdes ont été placées dans un aquarium contenant 20 L d'eau de mer. Le volume du solvant (DMSO) ajouté dans les aquariums est à 0,01% du volume total de l'eau. L'expérience d'exposition a été réalisée pendant 7 jours durant lesquelles l'eau de mer dans les aquariums a été renouvelée et contaminée chaque jour.

2.4. Expérimentation n°4 : Etude cinétique de l'exposition des palourdes au BaP

Dans cette expérience, les palourdes ont été exposées à une seule concentration de BaP (10 µg/L). Les palourdes témoins ont été exposés à l'eau de mer avec du DMSO. Les bivalves ont été exposés au BaP durant différentes périodes : 1 jour, 3 jours, 7 jours et 14 jours. Pour chacune des deux conditions (Témoin (DMSO) et 10 µg BaP/L), 40 palourdes ont été placées dans un aquarium contenant 40 L d'eau de mer (figure 41). Le volume du solvant (DMSO) ajouté dans les aquariums est à 0,001% du volume total de l'eau. A t = 0, 10 palourdes ont été disséquées. A la fin de chaque période d'exposition citée ci-dessus, 10 individus ont été retirés des aquariums et disséquées.

2.5. Expérimentation n°5 : Exposition des huîtres à l'eau de mer contaminée par le BaP

Dans cette expérience, 20 huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) ont été placées dans des aquariums contenant 20 L d'eau de mer et dans les mêmes conditions (photopériode, température, salinité) que celles pour les expériences concernant les palourdes (figure 42). Les huitres ont été exposées au BaP solubilisé dans le DMSO. Le facteur de contamination est l'eau de mer. Le volume du solvant (DMSO) ajouté dans les aquariums est à 0,01% du volume total de l'eau. Dans l'expérience, il y a sept conditions : Témoin = eau de mer, Témoin (DMSO) = eau de mer + DMSO, C_1 = 5 µg BaP/L, C_2 = 20 µg BaP/L, C_3 = 100 µg BaP/L, C_4 = 400 µg BaP/L et C_5 = 1000 µg BaP/L. La durée de l'expérience de contamination est de 7 jours.

2.6. Dissection des bivalves

A la fin de chaque expérience, les bivalves (palourde ou huître) sont retirées des aquariums et disséquées rapidement, les branchies et les glandes digestives sont conservées à -80°C pour les analyses biochimiques et de génotoxicité. Concernant les analyses de l'expression génétique, les organes sont placés dans un tampon contenant des inhibiteurs de ribonucléases (RNA later, Qiagen), conservés une nuit à 4°C puis stockés à -80°C jusqu'à la réalisation des analyses. Les tissus mous des palourdes qui ont servi pour le dosage chimique sont conservés à -80°C. Pour l'expérimentation n°1, des cultures de microalgues traitées sont filtrées à travers des papiers filtre Whatman en fibre de verre de 47 mm de diamètre et conservées à -80°C.

D. Analyses chimiques

1. PRETRAITEMENT DES ECHANTILLONS DES SEDIMENTS ET DES TISSUS MOUS

Les échantillons des sédiments superficiels et des tissus mous (totalité du tissu mou) des bivalves conservés préalablement à -20°C, ont été lyophilisés pendant 72 heures en utilisant un lyophilisateur-Thermo scientific-Heto-PowerDry LL3000. Cette lyophilisation permet la déshydratation des matrices utilisées par évaporation sous vide et permet ainsi leur stabilité chimique. Les lyophilisats ont été, ensuite, broyés et homogénéisés avec un mortier. Après homogénéisation, les sédiments ont subit un tamisage avec un tamis à porosité de 100 µm afin de récupérer la fraction fine.

2. DETERMINATION DES TENEURS EN HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAPs)

L'analyse quantitative et qualitative des HAPs consiste en une extraction des composés hydrocarbonés, une séparation des différentes factions d'hydrocarbures et une analyse en Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).

Le protocole analytique appliqué aux échantillons de tissus et de sédiments est illustré par la figure 23. Les échantillons ont été dopés, avant extraction, d'un standard interne (le Para-D_{10}-terphényle).

2.1. Extraction des hydrocarbures à partir de l'eau de mer

Nous avons réalisé l'extraction des hydrocarbures selon la méthode gravimétrique décrite dans Zrafi-Nouira et al. (2009), qui consiste à mélanger 50 mL de l'échantillon d'eau avec 150 mL de chloroforme et secouer énergiquement pendant 10 min pour disperser le mélange. Après décantation pendant 2 h l'extrait chloroformique est récupéré dans un ballon rodé sec de 500 mL préalablement lavé avec du chloroforme pur. Cette opération est répétée trois fois pour chaque échantillon. La totalité de l'extrait chloroformique récupérée est par la suite évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidolph), jusqu'à la réduction du volume à 1 mL. L'extrait chloroformique ainsi obtenu est transvasé par la suite dans des tubes à hémolyse.

2.2. Extraction des hydrocarbures à partie des matrices solides

La méthode utilisée est une extraction au soxhlet. En effet, elle permet l'extraction des composés organiques dans des échantillons à faible teneur en hydrocarbures. Le principe de soxhlet est basé sur l'extraction liquide/solide, par circulation continue sur l'échantillon (solide), d'un solvant organique, porté à ébullition et recondensé.

La matrice solide à analyser est placée dans une cartouche en cellulose qui est ensuite introduite dans le tube en verre appelé extracteur. Ce dernier est placé au dessus d'un ballon rodé de 500 mL contenant 250 mL de solvant organique et il est relié au réfrigérant. Sous l'effet du chauffage à une température de 50°C, le solvant s'évapore et à la rencontre du réfrigérant il se condense dans la cartouche contenant l'échantillon. La solution est soutirée périodiquement par l'amorçage d'un siphon, la solution du ballon s'enrichit petit à petit en soluté et l'échantillon est toujours mis en contact avec du solvant fraîchement distillé assurant une extraction continue et efficace. Lorsque le solvant arrive à l'ouverture du tube siphonné, il s'écoule dans le ballon, permettant au cycle de recommencer.

2.2.1. Extraction à partir des sédiments

L'extraction des hydrocarbures totaux contenus dans les sédiments lyophilisés et homogénéisé a été réalisée selon la méthode décrite dans Zrafi-Nouira et al. (2008), dont les principales étapes sont les suivantes : un échantillon de 50 g est extrait au soxhlet par le chloroforme comme solvant organique. L'extraction dure de 8 à 16 heures, selon le type de l'échantillon, à une température de 50°C. La totalité de l'extrait chloroformique est récupérée et par la suite évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidolph), jusqu'à la réduction du volume à 1 mL. L'extrait chloroformique ainsi obtenu est transvasé par la suite dans des tubes à hémolyse.

L'extraction des hydrocarbures totaux est suivie d'une étape appelée « *désulfuration* ». Pour cela, on fait passer l'extrait chloroformique récupéré dans le tube à hémolyse sur une colonne contenant un amalgame de cuivre et de zinc, préparé préalablement, afin d'éliminer le soufre libre dans l'échantillon.

2.2.2. Extraction à partir des tissues biologiques

L'extraction des hydrocarbures totaux à partir des tissues des palourdes est réalisée selon le protocole défini par IAEA et décrit par Er-Raioui et al. (2009). Il s'agit d'abord d'une

extraction solide/liquide des lipides, au soxhlet par le méthanol pendant minimum 8 heures à partir de 5 g d'échantillon biologique lyophilisé et broyé. Une étape de saponification est réalisée par l'ajout de 20 mL de KOH (0,7 M) et 30 mL d'eau distillée. Le mélange obtenu poursuit l'extraction au soxhlet pendant 2 heures. L'objectif de la saponification est de libérer les hydrocarbures et d'éliminer les composés saponifiables de l'extrait lipidique. Il s'agit essentiellement d'acides gras, généralement très abondants dans les matrices biologiques. Par la suite, le mélange est récupéré dans une ampoule à décanter et subit une extraction liquide/liquide par l'hexane, répétée 3 fois. Ainsi l'extrait est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à la réduction du volume à 1 mL.

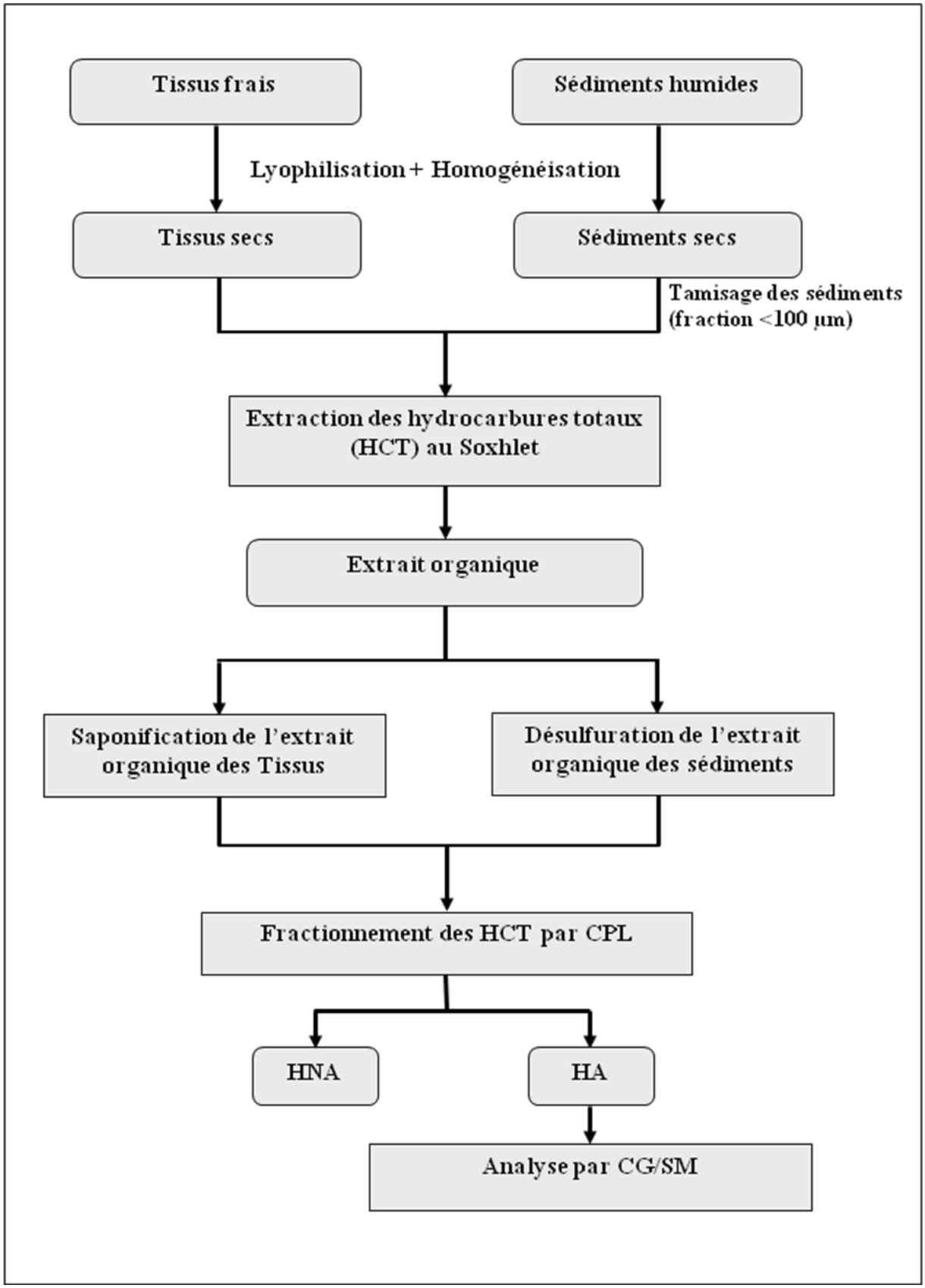


Figure 23 : Schéma représentant les protocoles opératoires suivis pour l'analyse des hydrocarbures tissulaires et sédimentaire.

2.3. Fractionnement des hydrocarbures

Les hydrocarbures obtenus dans les extraits organiques sont fractionnés par chromatographie en phase liquide (figure 24). Cette technique permet de séparer les hydrocarbures non aromatiques (HNA), les hydrocarbures aromatiques (HA) et les composés lourds (NSO). Elle se base sur la différence de solubilité des différentes fractions dans des solvants plus ou moins polaires, aboutissant à la séparation de chacun des HNA, HA et NSO. Les molécules organiques sont mises en contact avec une phase solide. Leur degré d'affinité avec cette phase solide dépend de leur taille, de leur structure, de leur polarité et de leur cortège électronique. Le solvant est alors élué au travers de la phase solide. Les molécules qui présentent plus d'affinité pour la phase mobile (le solvant) que pour la phase stationnaire sont éluées.

La chromatographie a été réalisée sur une colonne remplie de gel de silice (silicagel 60 ; 0,063-0,200 mm) pour la matrice biologique et de gel de silice et de florosil (Florosil R : 60-100 mesh) pour les sédiments. La silice et le florosil sont préalablement nettoyés. Ils sont ainsi rincés avec du cyclohexane puis du chloroforme pure afin d'enlever toute trace éventuelle de matière organique. Ils sont, ensuite, conditionnés sous vide à une température de 150°C pendant une heure. La colonne est préparée à l'intérieure d'une pipette pasteur de 0,5 cm de diamètre et de 15 cm de long. La pipette est bouchée par un morceau de laine de verre avant de placer la phase solide (silice ou silice-florosil). Cette dernière sera mouillée avec un volume (v) d'hexane avant l'élution des hydrocarbures.

L'extrait est déposé à l'extrémité supérieure de la colonne. Les élutions se font par des solvants ou mélanges de solvants de polarité croissante. L'étape de fractionnement est commencée par l'élution des HNA en utilisant l'hexane pure (5 mL) comme solvant. Une fois la fraction non aromatique éluée, la polarité du solvant est augmentée en utilisant un mélange hexane/chloroforme (2:1 ; volume de 5 mL) pour éluer les molécules aromatiques dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Les fractions séparées sont recueillies dans des tubes à hémolyse.

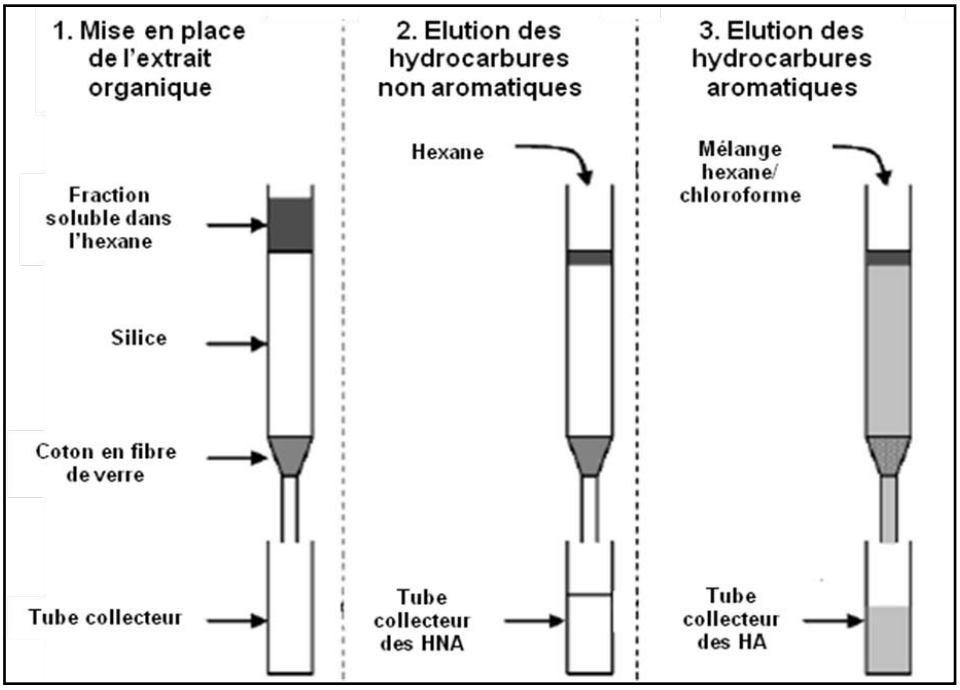


Figure 24 : Représentation schématique du fractionnement par chromatographie en Phase liquide (CPL).

2.4. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

Dans les études géochimiques, l'utilisation de la CG/SM conventionnelle permet l'identification précise des composés séparés. Elle a également l'avantage de détecter les marqueurs moléculaires géochimiques qui sont présents en concentrations relativement faibles et qui sont généralement masqués par la ligne de base du chromatogramme.

L'analyse par spectrométrie de masse peut se faire selon deux types d'acquisition. La première en mode « Full scan » permet d'enregistrer les ions dont le rapport masse/charge est compris entre m/z = 50 et 450. Ce mode de détection permet d'analyser et d'enregistrer l'ensemble des ions produits par l'ionisation et la fragmentation des composés. Les signaux obtenus sur le chromatogramme correspondent à la somme de tous les fragments composant le fragmentogramme de la molécule donnée. Le fragmentogramme est constitué de l'ion moléculaire, de l'ion caractéristique et des fragments générés après la collision avec les électrons. L'ion caractéristique est spécifique à chaque composé ou famille de composés et peut être identique à l'ion moléculaire. Ces spectres de masse et les temps de rétention des composés permettent d'identifier les molécules présentes sur les chromatogrammes. Le deuxième mode d'acquisition de donnée est le mode « SIM » (Single Ion Monitoring). Cette technique permet de régler le détecteur sur certains rapports masse/charge (m/z) lors de

l'analyse. Ce mode de détection permet d'augmenter la sensibilité du détecteur et ainsi d'analyser avec plus de précision les distributions de certaines familles de composés.

Le CG/SM utilisé dans notre travail est HP6890-HP5973MSD (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) équipé d'une colonne de silice fondue (30m, 0,25mm) et couverte par 5% phenyl methyl siloxane. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit de 1,4 mL/min. Le programme de température utilisé est de 60°C à 100°C (25°C/min) et de 100°C à 310°C (2°C/min) avec un palier de 70 min à 310°C.

3. DETERMINATION DES TENEURS EN METAUX TRACES

Dix éléments métalliques (Ag, As, Cd, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, V et Zn) ont été dosés durant l'approche *in situ* dans les sédiments superficiels et les tissus mous des palourdes *Ruditapes decussatus*.

3.1. Minéralisation des échantillons

Les échantillons ont subi une minéralisation afin de solubiliser et stabiliser les métaux traces et obtenir une matrice liquide adéquate pour les appareillages analytiques.

Un poids équivalent à 50 mg de sédiments ou de tissu secs a été récupéré dans des tubes de polypropylène. Un volume de 3 mL d'acide nitrique a été ajouté aux échantillons pesés. Les tubes ont été placés dans une rampe de minéralisation et chauffés à 100°C pendant trois heures (bloc chauffant CAL 3300, Environmental Express, USA) afin d'optimiser l'attaque acide. Après refroidissement des échantillons à température ambiante, 15 mL d'eau ultra-pure (MilliQ, Millipore®) étaient ajoutés afin de diluer le digestat et d'obtenir une concentration en acide entre 2% et 20%.

3.2. Dosage des métaux

Les concentrations des métaux (Ag, As, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb, V et Zn) au niveau des matrices biologiques et sédimentaires ont été analysées par plasma à couplage inductif/spectrométrie d'émission optique (ICP/OES 720, Agilent Technologies).

Le dosage de mercure (Hg) dans les deux matrices, a été réalisé par spectrophotométrie d'absorption atomique à vapeur froide sous flux d'oxygène (AMA 254, Altec, Prague, République Tchèque). Un poids équivalent à 50 mg de sédiments ou de tissu secs est déposé dans des nacelles en nickel disposées sur le carrousel de la machine et il est

introduit dans l'appareil à l'aide d'un passeur automatique (ASS 254). La limite de détection de l'appareil est de 0,01 ng de Hg/échantillon, avec une variabilité analytique moyenne de 5%.

La validité de la méthode a été vérifiée pour chaque série de dosage par le dosage des échantillons biologiques et de sédiments marins de référence certifiés (DOLT-4 : foie de roussette ; TORT-2 : hépatopancréas de homard ; PACS-1, MESS-2 et MESS-3 : sédiments marins, fournis par NRCC-CNRC, Canada), ainsi que celui de trois blancs (acide seul) ayant subi les mêmes étapes de minéralisation et de dilution.

E. Analyse des biomarqueurs

Pour l'étude *in situ*, cinq biomarqueurs biochimiques ont été analysés chez la palourde *R. decussatus*. Au niveau de la glande digestive, on a dosé les activités enzymatiques de la catalase (CAT), la glutathion-S-transférase (GST) et la benzo(a)pyrène hydroxylase (BPH) et le taux de malondialdéhyde (MDA). Au niveau des branchies, on a dosé les activités enzymatiques de la CAT, la GST, l'acétylcholinestérase (AChE) et le taux de MDA. De plus, l'expression des gènes d'intérêt et les altérations histologiques ont été étudiées au niveau des deux organes (figure 25).

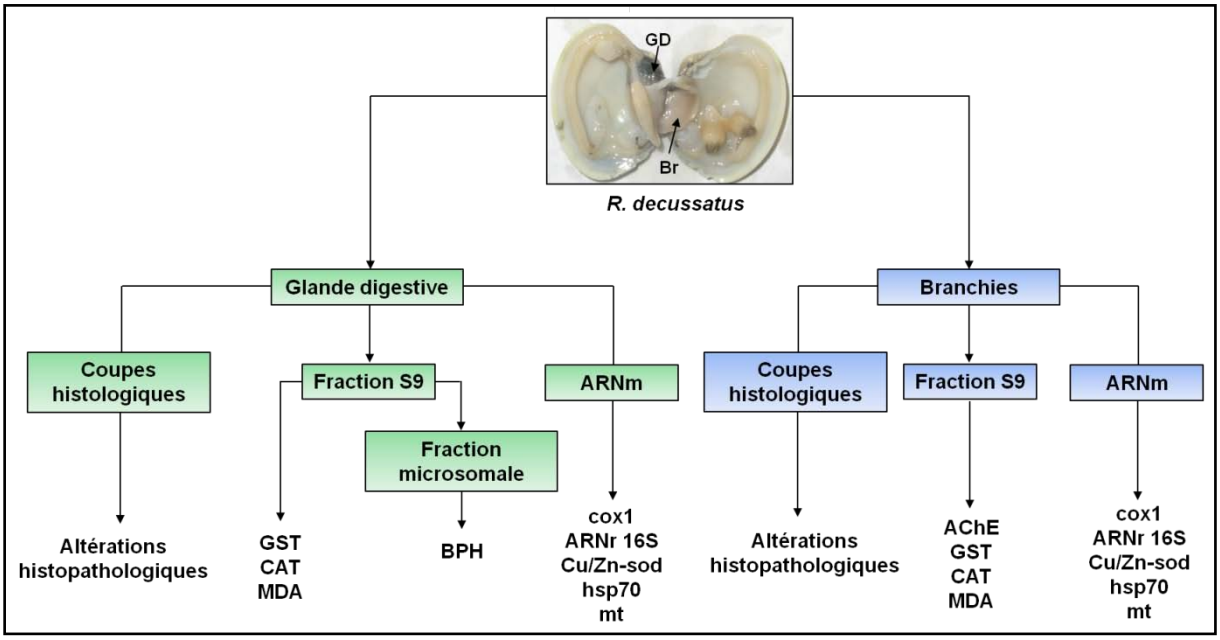


Figure 25 : Schéma montrant les différents organes utilisés chez la palourde *R. decussatus* pour l'analyse des biomarqueurs.

Pour l'étude expérimentale, quatre biomarqueurs biochimique ont été dosé au niveau des branchies et de la glande digestive de la palourde *R. philippinarum* et de l'huitre *C. gigas*: les activités enzymatiques de la CAT, GST, AChE et le taux de MDA. L'étude de l'expression des gènes d'intérêt et l'étude de l'altération de l'ADN ont été, aussi, réalisées au niveau des deux organes (figure 26).

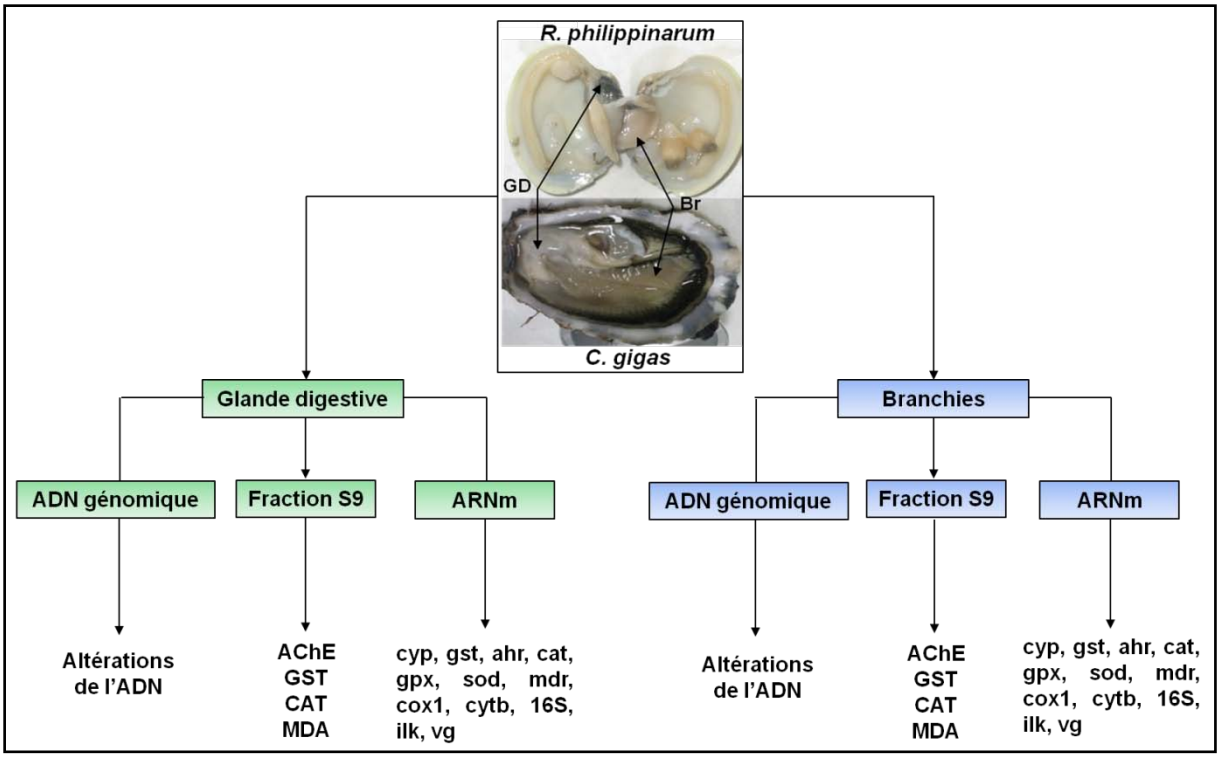


Figure 26 : Schéma montrant les différents organes utilisés chez les bivalves *R. philippinrum* et *C. gigas* pour l'analyse des biomarqueurs.

1. DOSAGE DES MARQUEURS BIOCHIMIQUES

1.1. Préparation de l'extrait brut

Les tissus prélevés (branchies et glande digestive) sont homogénéisés à froid dans une solution tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,5) à raison de $^1/_3$ (masse/ volume). L'homogénat obtenu est centrifugé à 9000 g pendant 25 min à 4°C. Le surnageant obtenu, appelé fraction S9, est réparti sur plusieurs aliquotes servant pour le dosage des protéines totales et des différentes activités enzymatiques.

1.2. Dosage des protéines totales

La concentration en protéines totales est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant comme réactif le bleu brillant de Coomassie (Bio-Rad) qui se fixe sur les protéines en donnant des complexes de couleur bleu. Ces derniers absorbent à une longueur d'onde de 595 nm. L'intensité de coloration est fonction de la teneur de chaque échantillon en protéines. Une gamme étalon est réalisée avec de l'albumine bovine sérique (BSA) à une concentration de 1 mg/mL.

1.3. Dosage de l'activité enzymatique spécifique de l'acétylcholinestérase

1.3.1. Principe

Le dosage de l'activité acétylcholinestérase a été réalisé selon la méthode colorimétrique décrite par Ellman et al. (1961). Le dosage est basé sur l'hydrolyse d'un ester de choline ; acétylthiocholine (ACh) par l'enzyme acétylcholinestérase (AChE). La thiocholine (TH) libérée réagit avec le 5-5'-dithio-bis (2-nitrobenzoate) (DTNB) pour former le 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB), produit de couleur jaune qui absorbe à 412 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente dans le milieu réactionnel (figure 27).

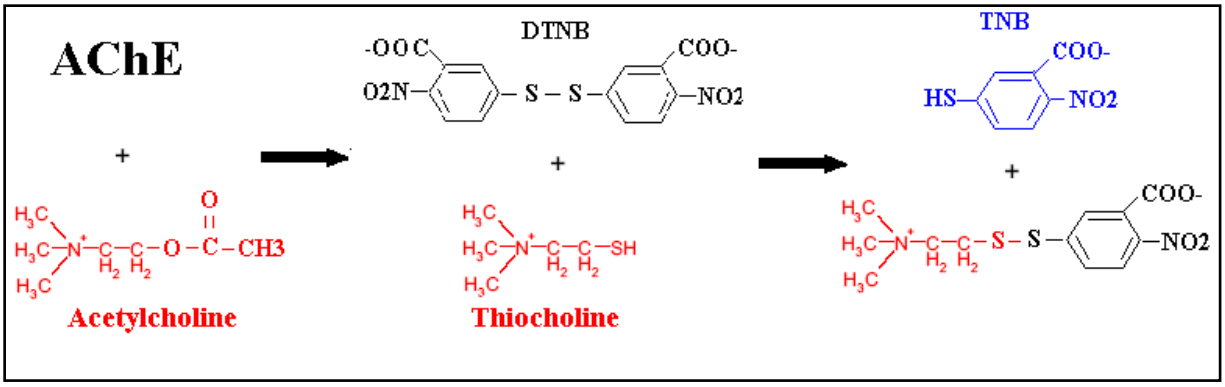


Figure 27 : Principe de mesure de l'activité acétylcholinestérase.

Dans l'approche expérimentale de ce travail (expériences au laboratoire), le dosage de l'activité AChE a été réalisé selon la méthode d'Ellman et al. (1961) modifiée et adaptée au dosage par le lecteur de microplaque (Galgani et al., 1992).

1.3.2. Mesure de l'activité enzymatique

Pour l'étude *in situ*, l'analyse de l'activité AChE a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre. Dans les cuves à essai, on introduit dans l'ordre : 1050 µL de tampon phosphate (0,1 M ; pH 8), 50 µL du réactif DTNB (8 mM), 50 µL de la fraction S9 et finalement 50 µL de la solution substrat (acétythiocholine, 45 mM). La lecture des absorbances est effectuée toutes les 30 secondes pendant 10 mn à une longueur d'onde de 412 nm et à une température de 25°C en utilisant un spectrophotomètre (UVD-2960). L'hydrolyse spontanée a été mesurée en absence de l'échantillon à doser (blanc), dont le volume est remplacé par du tampon phosphate. Chaque échantillon a été déterminé en duplicata.

Pour l'étude expérimentale (*in vivo*), l'analyse de l'activité AChE a été réalisée à l'aide d'un lecteur de microplaque. Dans les puits de la microplaque, on introduit dans l'ordre : 300 µL de tampon phosphate (0,1 M ; pH 8), 20 µL du réactif DTNB (10 mM), 10 µL de la fraction S9 et finalement 10 µL de l'acétylthiocholine (0,1 M). L'absorbance a été mesurée pendant 15 min à un intervalle de temps de 30 secondes en utilisant un lecteur de microplaque (Epoch) à une longueur d'onde de 405 nm après l'ajout du substrat à une température de 25°C. L'hydrolyse spontanée a été mesurée en absence de l'échantillon à doser (blanc), dont le volume est remplacé par du tampon phosphate. Chaque échantillon a été déterminé en triplicata.

Les résultats sont exprimés en nmol de substrat hydrolysé par minute par milligramme protéine (nmole/min/mg prot.).

L'activité est donnée par la formule suivante :

$$\text{Activité (nmole/min/mg prot.)} = \frac{\Delta\,\text{DO/min} \times \text{Vt}}{\varepsilon \times l \times \text{Vs} \times \text{P}}$$

Δ DO/min : variation de la densité optique par minute ;

Vt : volume total dans la cuve ;

Vs : volume de l'échantillon (fraction S9) en mL ;

l : Longueur du trajet optique ;

P : mg de protéines par mL de la fraction à doser ;

ε : Cœfficient d'extinction molaire du DTNB, égale à 13,6 $mM^{-1}.cm^{-1}$.

1.4. Dosage de l'activité enzymatique spécifique des catalases

1.4.1. Principe

Les catalases sont des enzymes qui interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydatif. Elles éliminent les espèces oxygénées réactives (ERO) et accélèrent la réaction spontanée de dismutation du péroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique pour la cellule en eau et en oxygène. La technique utilisée est celle décrite par Clairborne (1985) et qui se base sur la disparition de l'eau oxygénée par action de la catalase selon la réaction suivante :

1.4.2 Mesure de l'activité enzymatique

Dans une cuve en quartz, on introduit dans l'ordre : 1,56 mL de tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,5), 200 µL de H_2O_2 (0,5 M) et 20 µL de l'extrait enzymatique S9. Pour les essais à blanc, on introduit les mêmes composés sauf l'extrait enzymatique.

L'absorbance a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 240 nm et à une température de 25°C. La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant 30 secondes à un intervalle de 5 secondes. Chaque échantillon a été déterminé en duplicata. L'activité est exprimée en micromole de H_2O_2 consommé par minute et par mg de protéines (µmole/min/mg prot.) selon la formule suivante :

$$\text{Activité (µmole/min/mg prot.)} = \frac{\Delta \text{ DO/min}}{\varepsilon \times Vs \times P}$$

Δ DO/min : variation de la densité optique par minute ;

Vt : volume total dans la cuve ;

Vs : volume de l'échantillon (fraction S9) en mL ;

P : mg de protéines par mL de la fraction à doser ;

ε : Coefficient d'extinction molaire de H_2O_2, égale à 0,04 $mM^{-1}.cm^{-1}$.

1.5. Dosage de l'activité enzymatique spécifique des glutathion S-transférases

1.5.1. Principe

La mesure de l'activité glutathion S-transférase (GST) est déterminée selon la méthode colorimétrique de Habig et al. (1974) dans la fraction cytosolique des organes. Elle est basée sur la mesure de la cinétique d'apparition du thioéther formé lors de la conjugaison du substrat, le 1-chloro 2,4-dinitrobenzène (CDNB) avec un cofacteur, le glutathion réduit (GSH).

Pour l'analyse de l'activité GST dans les échantillons issus des bivalves traités au laboratoire, la méthode de Habig et al. (1974) a été modifiée et adaptée pour le dosage au lecteur de microplaque.

1.5.2. Mesure de l'activité enzymatique

Pour l'étude *in situ*, l'activité GST a été mesurée à en utilisant un spectrophotomètre. Dans les cuves à essai, on introduit dans l'ordre : 1 mL de tampon phosphate (0,1M ; pH 7,5), 50 µL de CDNB (1 mM), 50 µL de GSH (1 mM) et 50 µL de la fraction enzymatique S9. Pour les essais à blanc, on introduit tous les composés précités sauf l'extrait brut. Le volume est remplacé par 50 µL de tampon phosphate. L'absorbance a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre (UVD-2960) à une longueur d'onde de 340 nm. La variation de la densité optique est suivie pendant 2 min à un intervalle de temps de 30 secondes contre une solution ne contenant pas l'échantillon à doser (blanc).

Pour l'étude expérimentale (*in vivo*), l'activité GST a été mesurée à en utilisant un lecteur de microplaque. Tout d'abord, on a préparé un mélange de réaction composé de : 9,8 mL tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,5), 100 µL GSH (0,2 M) et 100 µL CDNB (0,1 M). Dans les puits de la microplaque, on introduit dans l'ordre : 180 µL du mélange préparé et 20 µL de la fraction S9. Pour les essais à blanc, on introduit 200 µL du mélange de réaction seulement. L'absorbance a été mesurée en utilisant un lecteur de microplaque (Epoch) à une longueur d'onde de 340 nm. La variation de la densité optique est suivie pendant 5 min à un intervalle de temps de 30 secondes contre une solution ne contenant pas l'échantillon à doser (blanc).

Les résultats sont exprimés en nmole de produit formé par minute par milligramme protéine (nmole/min/mg prot.).

L'activité est donnée par la formule suivante :

$$\text{Activité (nmole/min/mg prot.)} = \frac{\Delta \text{ DO/min} \times \text{Vt}}{\varepsilon \times l \times \text{Vs} \times \text{P}}$$

Δ DO/min : variation de la densité optique par minute ;

Vt : volume total dans la cuve ;

Vs : volume de l'échantillon (fraction S9) en mL ;

l : Longueur du trajet optique ;

P : mg de protéines par mL de la fraction à doser ;

ε : Cœfficient d'extinction molaire du complexe GSH-CDNB, égale à 9,6 $mM^{-1}.cm^{-1}$.

1.6. Dosage de l'activité enzymatique spécifique de la benzo(a)pyrène hydroxylase

1.6.1. Principe

L'activité benzo(a)pyrène hydroxylase (BPH) est mesurée dans les microsomes de la glande digestive selon la méthode fluorométrique décrite par Michel et al. (1993) adaptée au lecteur de microplaque. Le principe de mesure est basé sur le dosage d'un métabolite fluorescent du benzo(a)pyrène (BaP): le 3-OH benzo(a)pyrène (3-OH BaP). Les lectures (T0 et T10 min) s'effectuent à 2 longueurs d'ondes d'émission 510 et 492 nm après excitation à 430 nm et à 25°C. Le 3-OH BaP émet à 510 nm et le BaP émet à 492 nm. La différence entre les valeurs à T0 et T10 min permet de connaître le niveau de métabolisation du BaP en 3-OH BaP.

1.6.2. Préparation de la fraction microsomale

Les glandes digestives des palourdes sont homogénéisées à froid dans une solution tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,5) à raison de $^1/_4$ (masse/ volume). L'homogénat obtenu est centrifugé à 9000 g pendant 25 min. Le surnageant obtenu est centrifugé une deuxième fois à 100 000 g pendant une heure à 4°C. Le culot de microsomes est repris dans 1 mL de tampon (Tris-HCl 8 mM pH7,6 ; EDTA disodique 1 mM ; glycérol 20% ; KCl 0,12 M ; Dithiotréitol 0,8 mM. La concentration en protéines totales de la fraction microsomale est déterminée selon la méthode de Bradford (1976).

1.6.3. Mesure de l'activité enzymatique

Dans les puits de microplaque, on introduit : 96 µL de triethanolamine-HCl (10 mM ; pH 7,25), 2 µL de NADPH (0,2 µM), 2 µL de benzo(a)pyrène (60 µM) et 100 µL de la fraction microsomale. Après incubation des échantillons à 25°C pendant 10 min, on ajoute 20 µL de Triton X-100 qui va arrêter la réaction. L'absorbance est mesurée par un spectrofluorimètre. La fluorescence est obtenue par le calcul de la différence entre les deux longueurs d'onde d'émission/excitation respectives 492/430 nm et 510/430 nm. Le calcul de l'activité spécifique de la BPH s'effectue grâce à une courbe étalon obtenue à partir d'une gamme définie de 3-OH BaP.

Les résultats sont exprimés en pmole de 3-OH BaP généré/min/mg protéines microsomales (pmole/min/mg prot.).

1.7. Dosage du taux d'accumulation du malondialdéhyde

1.7.1. Principe

Le malondialdéhyde (MDA) est dosé selon la méthode de Buege et Aust (1978) basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et certains composés résultant de la peroxydation lipidique, comme le malondialdéhyde (MDA), donnant un produit coloré (rose) dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 532 nm.

1.7.2. Mesure du taux de malondialdéhyde

Dans un tube à essai, on introduit dans l'ordre : 2 mL d'une solution (H_3PO_4 1%, TBA 30 mM, KCl 154 mM) et 200 µL de l'échantillon à analyser (fraction S9). Le mélange a été agité et incubé pendant 45 min à 90°C. La réaction entre l'acide thiobarbiturique et le malondialdéhyde donne un dérivé (TBA-MDA) de couleur rose qui absorbe à 532 nm.

Le taux de MDA est évalué en utilisant le 1,1,3,3- tétraméthoxypropane (TMP), comme standard de référence. Pour cela une gamme étalon a été réalisée avec une solution de TMP de concentration de 0,06 nmole/mL dans une solution de H_3PO_4 1%, TBA 30 mM et KCl 154 mM.

Pour quantifier le contenu en MDA, on extrapole les valeurs de DO obtenues à partir des échantillons analysés sur la courbe d'étalonnage du TMP. Le taux de MDA est exprimé en nmole/mg de protéines. Il est donné par la formule suivante :

$$\text{nmole MDA/mg prot.} = \frac{DO_{532} \times \text{dilution}}{\text{Pente} \times P}$$

DO_{532} : Densité optique à 532 nm ;

P : mg de protéines par mL de la fraction à doser ;

Pente : pente de la courbe d'étalonnage (TMP).

2. ANALYSE DE L'EXPRESSION GENETIQUE

La technique employée dans le cadre de nos travaux pour étudier l'impact des xénobiotiques (*in situ* et *in vivo*) sur le niveau d'expression des gènes est la PCR quantitative en temps réel (qPCR en temps réel). L'emploi de cette technique implique au préalable de connaître les séquences nucléotidiques des gènes codant pour les protéines d'intérêt.

Dans ce travail plusieurs gènes impliqués dans la métabolisation cellulaire, le stress oxydant, la métabolisation mitochondriales, la reproduction et l'immunité ont été étudié. Les fonctions métaboliques associées à l'expression de ces gènes sont résumés dans le tableau V.

Tableau V: Les gènes étudiés dans ce travail et la fonction des protéines associées.

Gène	Fonction de la protéine codée
Cytochrome P450 (*cyp*)	Métabolisation (phase I) des xénobiotiques hydrophobes par des réactions d'oxydoréduction. Leur action permet de rendre leur substrat plus hydrophile facilitant de ce fait leur complexation et leur excrétion.
Glutathion *S*-transférase (*gst*)	Métabolisation (phase II) des xénobiotiques (détaillé dans le paragraphe II.2.1.2 page 56)
Récepteur d'aryl-hydrocarbone (ou Aryl hydrocarbon receptor-*ahr*)	Il est impliqué dans la régulation des réponses biologiques aux hydrocarbures aromatiques. Il s'attache aux hydrocarbures formant ainsi un complexe pénétrant le noyau de la cellule où il va pouvoir activer des gènes cibles, ses principaux gènes cibles sont des enzymes de détoxification telles que les cytochromes P450 oxydases.
Système de résistance multidrogue (ou multidrug resistance - *mdr*)	Impliquées dans les processus de métabolisation de phase III, transmembranaires permettant de transporter activement vers l'extérieur de la cellule divers types de xénobiotiques ou des complexes xénobiotique-glutathion.
Catalase (*cat*)	Défense antioxydante (détaillé dans le paragraphe II.2.1.3.2 page 60)
Glutathion peroxydase (*gpx*)	Impliquée dans la défense antioxydante, elle permet de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, en oxydant deux molécules de glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG).
Cu/Zn-superoxyde dismutase (*sod*)	Impliquée dans la défense antioxydante, elle permet de transformer l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène.
Métallothionéines (*mt*)	Elles interviennent dans la détoxification des métaux essentiels revêtant un caractère toxique lorsqu'ils sont présents en et permettent également la séquestration de métaux toxiques à caractère non-essentiel.
Protéines de choc thermique 70 (ou heat shock protein 70 - *hsp70*)	Elles ont la fonction de chaperon moléculaire. Elles sont impliquées dans la protection et la réparation des protéines.
cytochrome c oxydase sous-unité 1 (*cox1*)	Fait partie de la chaine respiratoire de la mitochondrie. Il permet de réduire l'oxygène moléculaire en eau grâce à l'oxydation préalable du cytochrome c.
Cytochrome b (*cytb*)	Impliqué dans la chaine respiratoire de la mitochondrie. Il transfert les électrons de l'ubiquinol au cytochrome c soluble et utilise l'énergie libérée par cette réaction pour pomper des protons.
ARN ribosomique 16S (*ARNr 16S*)	C'est l'ARN ribosomique constituant la petite sous-unité des ribosomes des mitochondries chez les eucaryotes.
Vitellogénine (*vtg*)	Elle représente le précurseur du vitellus, qui constitue les réserves énergétiques utilisées par les embryons durant le développement embryonnaire.
Interleukine 17 (*ilk*)	Impliqué dans la réponse immunitaire, elle induit la production de cytokines pro-inflammatoires.

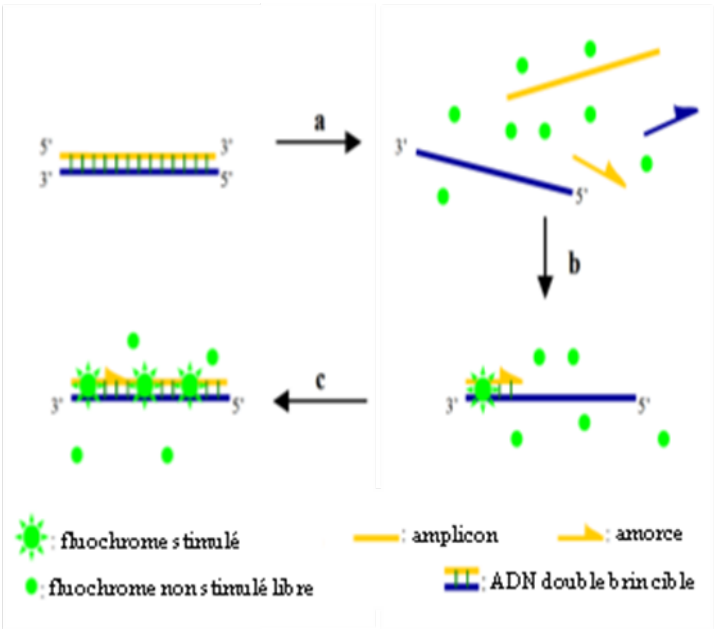
2.1. Principe de la qPCR en temps réel

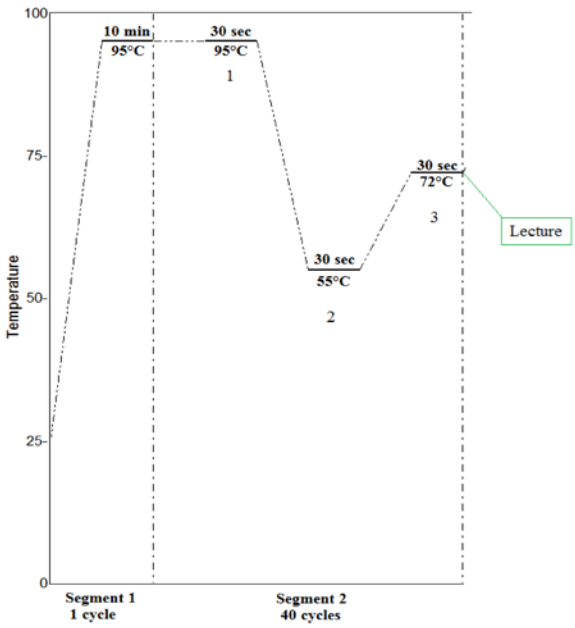
Après extraction des ARN totaux cellulaires, ces derniers sont transformés en ADN complémentaires (ADNc) par transcription inverse (reverse transcription, RT) lesquels sont ensuite amplifiés par qPCR en temps réel. La PCR, est par définition, une réaction en chaîne au cours de laquelle des brins d'ADN néosynthétisés au cours d'un cycle d'amplification servent de matrice pour le cycle suivant. Un cycle de PCR est composé de 3 étapes (dénaturation, hybridation et élongation) et est répété de nombreuses fois au cours de la réaction. Ainsi la réaction en chaîne aboutit à une accumulation exponentielle théorique de 2n fois par molécule d'ADN. Autrement dit la quantité de produits de PCR double à chaque cycle d'amplification suivant la formule suivante : $N = N_0 \times 2^n$ (où N est le nombre de molécules d'ADNc amplifiées au final, N_0 est le nombre initial de molécules d'ADNc et n le nombre de cycles d'amplification).

La quantité d'amplicons néosynthétisés présents dans le milieu réactionnel augmente ainsi à un taux exponentiel au cours des premiers cycles de la réaction de PCR. Après la phase d'amplification exponentielle, la réaction de PCR entre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable à cause d'une compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces. Fait suite à la phase linéaire, une phase « plateau » où le taux d'amplification décroît générant très peu d'amplicons.

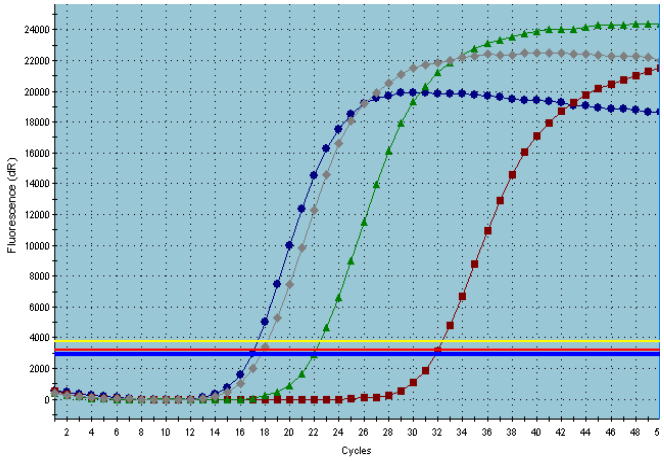
La qPCR en temps réel s'avère une technique attrayante pour des analyses quantitatives dont le principe est fondé sur la détection et la quantification d'un signal fluorescent émis par un fluorochrome dont l'intensité d'émission est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés pendant la PCR (figure 28). Dans notre étude le système de détection repose sur l'inclusion d'un agent intercalant, le SYBR Green I, dans l'ADN double brin. Au cours de l'hybridation des amorces puis de l'élongation réalisée par l'ADN polymérase, cet agent s'intercale entre les deux brins d'ADN nouvellement synthétisés et émet une fluorescence à 530 nm. L'intensité du signal de fluorescence est donc directement proportionnelle à la quantité d'ADN double brin synthétisé. A chaque fin de cycle, le thermocycleur mesure donc la fluorescence de l'échantillon et la reporte sur un graphique. Puisque chaque cycle multiplie par 2 la quantité initiale d'ADN, on peut informatiquement déterminer le cycle seuil (threshold cycle, Ct). Ce Ct correspond au nombre de cycles nécessaires pour que la réaction de PCR entre en phase exponentielle. Le Ct dépend de la quantité d'ADNc introduit dans le mélange réactionnel et donc de la quantité d'ARNm

extraits préalablement. Typiquement, plus la quantité d'ARNm extraite du gène ciblé est importante, plus la quantité d'ADNc correspondant sera grande et donc plus le Ct sera faible.

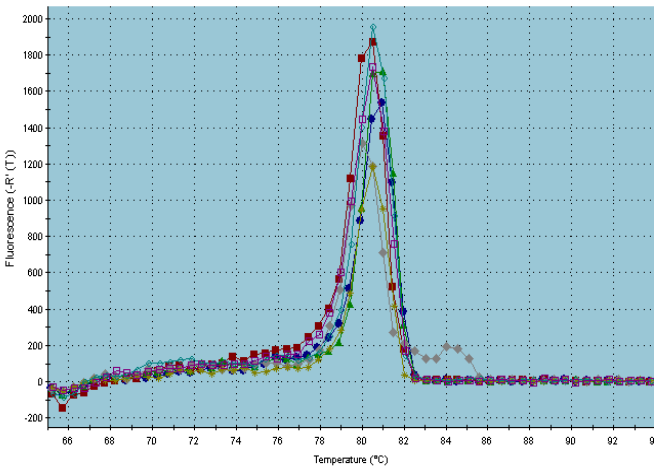




Le programme thermique pour un cycle d'amplification.



Résultat de la qPCR : une courbe présentant l'évolution de la fluorescence en fonction du nombre de cycles de PCR.



Courbes de fusion

Figure 28 : Principe général de la PCR en temps réel avec utilisation du SYBR Green. (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green libre exhibe peu de fluorescence. (b) A la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel.

2.2. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux des tissus sont extraits avec le kit Absolutely RNA Miniprep Kit (Agilent Technologies) selon les instructions du fabricant. Pour cela, 30 à 50 mg des tissus des bivalves (branchies et glande digestive) sont broyés dans un tube eppendorf contenant un tampon de lyse et des billes de broyage à l'aide de l'agitateur FastPrep-24 (MP Biomedicals, USA) à 6.0 $m.s^{-1}$ durant 40 secondes. Le tampon de lyse est un mélange de thiocyanate de guanidine et de b-mercaptoéthanol, qui permettent la dénaturation des protéines telles que les RNAse ou les DNAse et favorise la lyse des membranes. Afin d'éliminer les débris cellulaires, le broyat est filtré sur des micro-colonnes par centrifugation durant 5 min à 13500g. Ensuite, 600 µL de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1, v:v:v) sont ajoutés au lysat puis mélangés au vortex et centrifugés durant 10 min à 13500 g pour éliminer les protéines hydrophobes et amphiphiles. La phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube eppendorf et un volume d'éthanol glacé à 75% est ajouté afin de favoriser les liaisons ioniques. Le tout est homogénéisé au vortex avant d'être déposé sur une colonne d'affinité qui va retenir les acides nucléiques après centrifugation 1 min à 13500 g. Après une étape de lavage avec une solution par un tampon faiblement concentré en sel, les acides nucléiques sont incubés en présence de DNAse I à 37°C pendant 15 min afin de dégrader les ADN. Ensuite, les colonnes subissent deux lavages, le premier avec 600 µL de tampon fortement salé permettant d'éliminer la DNase et les fragment d'ADN, et le second avec 300 µL de tampon faiblement salé pour éliminer les sels du lavage précédent. Enfin, les ARN totaux sont élués avec 30 µL de tampon d'élution chauffé à 60°C puis stockés à -80°C jusqu'à leur rétro-transcription. L'évaluation quantitative et qualitative des ARN est déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 nm. La concentration en ARN est déterminée à l'aide du lecteur de microplaque en utilisant la plaque « Take 3 » et le logiciel Gen5™ software. Une préparation est considérée comme pure si le rapport DO_{260}/DO_{280} est compris entre 1,8 et 2.

2.3. La rétro-transcription en ADNc

Cette étape permet d'obtenir des ADNc à partir des ARN. Elle est réalisée à l'aide du kit « AffinityScript cDNA synthesis Kit » (Agilent Technologies) selon les instructions du fabricant. Pour effectuer la transcription inverse, 14 µL d'ARN sont mélangés à 1 µL d'oligo-dT (0,5 µg/µL), 1 µL d'hexanucléotides (0,1 µg/µL), 0,8 µL de dNTP (25 mM chacun) et à 2 µL de tampon d'activité (10x). Le mélange est incubé à 65°C durant 5 min afin de linéariser les ARN. En refroidissant, les amorces se fixent à la matrice. Ensuite, 0,5 µL de RNase-Block

et 1 µL d'enzyme transcriptase inverse (Reverse-Transcriptase, RT) sont ajoutés. Le mélange est mis dans le thermocycleur pour une durée de 1 h à 42°C pour permettre la retro-transcription. Les ADNc obtenus sont directement conservés à -20°C.

2.4. La PCR quantitative en temps réel

L'expression génétique chez les trois espèces étudiés dans ce travail, a été analysée par la qPCR en temps réel. Les amorces ont été définies à l'aide du logiciel LightCycler Probe design (version 1.0, Roche). Les gènes et les séquences des amorces utilisées sont présentés dans les tableaux VI, VII et VIII.

La qPCR a été réalisée à l'aide d'un kit « Brillant III Ultra Fast SYBR Green QPCR Master Mix » (Agilent Technologies) dans le thermocycleur Stratagen Mx3000P (Agilent Technologies). Un mélange d'amorces est préparé, contenant les amorces sens et anti-sens à une concentration finale de 2 µM. Le mélange réactionnel est composé de 10 µL de Tp 2x Brillant III (constitué de tampon d'activité, dNTPs, enzyme Taq polymérase, Sybr Green, $MgCl_2$) et 7 µL d'eau ultra-pure stérile, 2µL du mélange du couple d'amorces et 1 µL d'ADNc. Un contrôle négatif est réalisé pour chaque plaque afin de s'assurer de l'absence d'ADN dans l'eau utilisée pour la réalisation des mélanges réactionnels. Ce contrôle est constitué des mêmes réactifs que les autres puits, avec l'amorce de l'actine et 1 µL d'eau ultra-pure à la place de l'échantillon. Le programme thermique est le suivant : 1 cycle de 10 min à 95°C (activation de l'enzyme) puis 40 cycles d'amplification composés chacun de 30 secondes à 95°C (dénaturation), 30 secondes à 55°C (hybridation) et 30 secondes à 72°C (élongation). En fin de réaction, la spécificité de la PCR est fut vérifiée par analyse de la courbe de fusion. En effet, chaque produit d'amplification est caractérisé par une température de fusion (T*m*) qui dépend de sa composition en bases G et C et qui lui est donc propre. Le thermocycleur lance un cycle de température allant progressivement de 65 à 95°C par pas de 0,5°C par seconde et un suivi continu de la fluorescence. Les T*m* sont déterminés par analyse de la perte de la fluorescence lorsque les deux brins se séparent.

Pour chaque échantillon, le nombre de copies d'ADNc des gènes d'intérêt est quantifié relativement au nombre de copies d'un gène de référence (le *18S* pour l'étude sur terrain et la *β-actine* pour l'étude au laboratoire) via la méthode $2^{-\Delta Ct}$ décrite par Livak et Schmittgen (2001) :

L'expression relative d'un gène étudié = $2^{-\Delta Ct}$ avec $\Delta Ct = Ct_{\text{gène étudié}} - Ct_{\text{gène de référence}}$

De plus, pour pouvoir comparer entre les individus contaminés et les individus considérés comme contrôle, un facteur d'expression relative (FER) peut être calculé selon la formule suivante :

$$\text{Facteur d'expression relative (FER)} = \frac{2^{-\Delta Ct}\ \text{contaminé}}{2^{-\Delta Ct}\ \text{contrôle}}$$

Tableau VI : Gènes étudiés chez la palourde *R. decussatus* et séquences des amorces correspondantes.

Fonction	Gène	Numéro d'accession	Séquence (5'– 3')
Métabolisme mitochondrial	*cox1*	DQ184830	ATATGGCATTCCCTCGT[a] CGTTACAGCGATGCAC[b]
	ARNr 16S	AJ417846	TGCAACGAGAGTTGTACTAAG[a] ACATCGAGGTCGCAAA[b]
Neutralisation du stress oxydant	*sod*	AY377969	GTGGTTTGAAGCCAGG[a] CAGCGTGAACGACAAG[b]
Protection et réparation des protéines	*hsp70*	EU380904	CTTCGGTGGTGGTACT[a] CTTCGGCACTGCTTGA[b]
Détoxification	*mt*	AJ249687	CGTGTAATTGTATTGAGACTGG[a] ACTTTGCAGCCTGAAC[b]
Référence	*ARNr 18S*	EF105249	GAGCAATAACAGGTCTGTG[a] GGCAGGGACGTAATCAA[b]

[a] Amorce sens, [b] amorce anti-sens

Tableau VII : Gènes étudiés chez la palourde *R. philippinarum* et séquences des amorces correspondantes.

Fonction	Gène	Numéro d'accession	Séquence (5'– 3')
Métabolisation	*cyp4*	FJ516740	TGTGTCATCCAGATACCGTCAAA[a] TTCCCCTAACCATGGCAAAC[b]
	gst	FJ516741	GGGTATATCGAGAACCTGTTCA[a] TCCATTGACGGGCATTTT[b]
	ahr	FJ516743	ATGCATGGTCAGCCAAACAG[a] TCCCTTGAAGGAAGGTCCATT[b]
Neutralisation du stress oxydant	*cat*	EF520699	CTGATGGCTACAGACAGATG[a] GTTGCCCTGGGCGATG[b]
	sod (Cu/Zn)	EF520697	GATAATGTTGATCATGCTGGACC[a] GTCTACATCAGCGTGAACGCAA[b]
	gpx	GQ384395	GACCCAGTGGAGAAGG[a] TCTTTCCCCGAGGGTAA[b]
Métabolisme mitochondrial	*Cox1*	AY874527	GTACCCTCCGTTGTCGTCA[a] CCTGTTACTCCTAAACACCAAGC[b]
	cyt b	GQ443286	TTGATAGAGACGGGGATGT[a] ATACCACTCAGGCTGGA[b]
	ARNr 16S	AJ417847	AGAAGACCCTGTCGAG[a] TTACGGCTGTTATCCCT[b]
Détoxification	*mdr*	FJ12109	TGATCCCGAGGAAGGT[a] AGCCCTCAGGTAACGAA[b]
Référence	*β-actine*	EF520696	CGCACTTCCTCACGCCATCAT[a] CATTTCTTGTTCAAAGTCCAAG[b]

[a] Amorce sens, [b] amorce anti-sens

Tableau VIII : Gènes étudiés chez l'huître *C. gigas* et séquences des amorces correspondantes.

Fonction	Gène	Numéro d'accession	Séquence (5'– 3')
Métabolisation	*cyp1a1*	EF645271	AGGCATAGGGCTCCCAC[a] CTGGTTTCGCGGGTTTCAT[b]
	gst	AJ557140	AGGCTACCGAAATGGCTG[a] CTCTGACTTGTAATAGGCCGC[b]
Neutralisation du stress oxydant	*cat*	EF687775	GTCGTGCCCCTTTACAACC[a] CGCCCGTCCGAAGTTT[b]
	sod (Cu/Zn)	AJ496219	CCAGAGGATCACGAGAGGC[a] GCGTTTCCGGTCGTCTT[b]
	gpx	EF692639	ATCGAACGCTGCACCA[a] AGCTCCGTCGCATTGT[b]
Métabolisme mitochondrial	*Cox1*	AB033687	GTGCCAACTGGTATTAAGGTGT[a] ACACCGCACCCATTGAT[b]
	cyt b	NC_001276	GCGGACTAACTTTGTATTTATTGTCTATGG[a] AGTGTAAAACGAAGACTCGCT[b]
	ARNr 16S	EU152955	ATCATAGGAGAAGTTTCGCCG[a] CAGATAGAAACCAACCTGGCT[b]
Détoxification	*mdr*	AJ422120	AGGAAGGGCAGTTGAGTG[a] CGTTGGCCTCCTTAGCG[b]
Reproduction	*vtg*	AB084783	TGACCAATCTAGGTCTATTAAACGACAC[a] AGCTCTCTTTGATAAGCGTCTG[b]
Réponse immunitaire	*ilk*	EF190193	AGCATCAAAGCCATCAC[a] ACTCTCACTGGCCTGTA[b]
Référence	*β-actine*	AB071191	AGTACCCCATTGAACACGG[a] TGGCGGGAGCGTTGAA[b]

[a] Amorce sens, [b] amorce anti-sens

3. EVALUATION DES ALTERATIONS DE L'ADN PAR LA TECHNIQUE RAPD-QPCR

La génotoxicité du benzo(a)pyrène vis-à-vis de la palourde japonaise *R. philippinarum* et l'huître creuse *C. gigas* a été étudié en utilisant la technique d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe par la PCR quantitative en temps réel (RAPD-qPCR).

3.1. Extraction de l'ADN génomique

Les tissus (branchies et glande digestive) des bivalves préalablement conservés à -80°C, afin d'éviter toute dégradation par l'action des DNases, ont été décongelés. L'ADN génomique a été extrait selon la méthode de Miller et al., (1988) (figure 29). Elle consiste à digérer les tissus durant une nuit à une température de 37°C dans des tubes contenant 1 mL du tampon de lyse dont la composition est la suivante : 10 mM Tris, pH 8 ; 2 mM EDTA ; 0,4M NaCl ; 0,625% de SDS et 100 µg/mL de protéinase K (Promega). Après digestion, les échantillons sont précipités par l'ajout de 358 µL NaCl (6 M) suivi d'une centrifugation à 2000 g à 4°C. Le surnageant récupéré dans de nouveaux tubes est ensuite précipité par deux volumes d'éthanol absolu après ajout de la RNAse A (20µg/mL) pour dégrader les ARN qui sont présents avec l'ADN. L'ADN génomique contenu dans la phase aqueuse se présente alors sous forme d'une pelote. Cette dernière est rincée 2 fois dans de l'éthanol 70% afin d'éliminer toute trace de sels, elle est ensuite séchée et dissoute dans du tampon TE (Tris 10 mM, pH 7,5 ; EDTA 0,1 mM). La quantification de l'ADN est réalisée par lecture de l'absorbance à 260 nm, longueur d'onde d'absorption maximale des acides nucléiques (1 unité à la longueur d'onde de 260 correspond à 50 µg d'ADN/mL). Des dilutions avec le tampon TE sont effectuées pour obtenir une concentration de 8 ng/µL pour chaque échantillon d'ADN génomique.

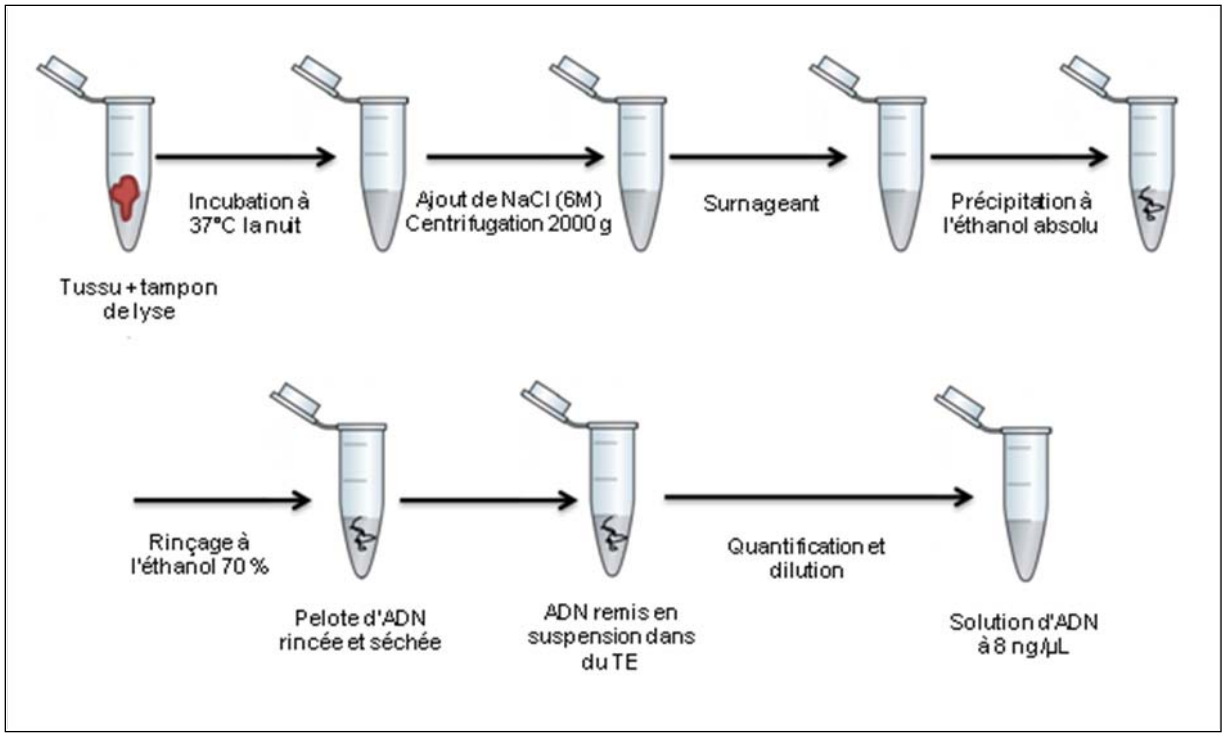


Figure 29 : Démarche d'extraction d'ADN génomique à partir d'un tissu biologique (d'après Miller et al., 1988).

3.2. RAPD-PCR en temps réel

Tout d'abord, plusieurs amorces non spécifiques ont été testés dont deux ont été choisis pour les analyses de RAPD-qPCR : OPB7 et OPB11. Une amorce spécifique (*28S*) a été utilisée pour amplifier les gènes de références (tableau IX).

Tableau IX : Amorces spécifiques et non spécifiques utilisées pour la RAPD-qPCR

Amorce	Numéro d'accession	Séquence (5'- 3')
OPB7		GGTGACGCAG
OPB11		GTAGACCCGT
28S (*R. philippinarum*)	DQ343857	TGAACTATGTCTGAGTAGGG[a] GCTGCTCCATAAGTCG[b]
28S (*C. gigas*)	Z29546	AAACACGGACCAAGGAGTCT[a] AGGCTGCCTTCACTTTCATT[b]

[a] Amorce sens, [b] amorce anti-sens

Les RAPD-PCR en temps réel ont été faites à l'aide du Lightcycleur (Roche). Chaque réaction a été accomplie dans un volume réactionnel de 20 µl dans un capillaire comprenant 2 µL de la solution d'ADN (16 ng d'ADN génomique), 2 µl de l'amorce à 6 µM, et 16 µl du mélange de PCR constitué de 1 µl du tampon 1b activé (tampon d'activité, SYBR Green, Taq polymérase et dNTP), 3,2 µL $MgCl_2$ à 25 mM et de 11,8 µl d'eau milliQ autoclavée. Le programme thermique utilisé pour cette RAPD-PCR en temps réel est composé d'une étape de chauffage de 10 min à 95°C suivi de 50 cycles d'amplification : 95°C pendant 5 sec, 50°C pendant 5 sec, et 30 sec à 72°C. A la suite de ces 50 cycles d'amplification, les courbes de dissociation ont été obtenues en suivant la diminution du niveau de fluorescence du SYBR Green pendant un chauffage progressif des produits de PCR de 60 à 95°C. L'analyse des courbes de fusion a été faite en utilisant le logiciel LightCycler 3.5 (Roche). Pour un capillaire donné issu de la RAPD-qPCR, la température de fusion (T*m*) de chaque produit de PCR est obtenue et énumérée dans une table logique couvrant 11 intervalles de températures différentes s'étendant de 74 à 89°C. La comparaison des tables logiques entre la condition contaminée au BaP et la condition témoin permet de mettre en évidence des intervalles de température pour lesquels la fréquence des produits de PCR pour un T*m* connu diffère. L'analyse des courbes de température de fusion a été exécutée plutôt qu'une analyse de bande par électrophorèse sur gel d'agarose car à de basses doses de toxique, les différences potentielles entre les bandes d'ADN des conditions contrôles et contaminées sont faibles et de basse intensité ce qui en rend l'interprétation difficile.

Par conséquent, malgré le fait que la résolution entre les bandes dans un gel d'agarose est en grande partie supérieure à la résolution des courbes de fusion - une méthode à l'origine conçue pour démontrer la présence ou l'absence de seulement un produit de PCR, c'est-à-dire non prévu pour résoudre les produits multiples - l'analyse des courbes de fusion fournit plus d'information à de basses doses car un pic de température de fusion est le résultat de plusieurs produits de PCR partageant des températures de fusion très proche les unes des autres. Ainsi, des différences potentiellement minuscules sont amplifiées au lieu d'être dispersées et diluées tout au long d'un gel d'agarose.

Pour chaque ADN génomique, l'analyse quantitative est fondée sur la différence du nombre de cycle d'amplification nécessaire pour entrer dans la phase exponentielle de PCR, en utilisant les amorces non spécifiques OPB7 ou OPB11, et le couple d'amorces spécifiques ciblant le gène *ARNr 28S* pour la palourde japonaise et l'huître creuse.

La différence ΔCt = (Ct amorce spécifique - Ct amorce non spécifique), reflète la différence de l'hybridation entre la sonde et les amorces RAPD, elle conduit au calcul de l'efficacité relative d'hybridation entre les deux amorces, qui peut être calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Nombre des sites d'hybridation par génome} = 2^{\Delta Ct+1} = 2^{(28S - OPB + 1)}$$

La valeur de cette efficacité relative d'hybridation a été calculée à partir de la moyenne de 10 échantillons pour chaque condition expérimentale.

4. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Une étude histopathologique des branchies et de la glande digestive de la palourde *Ruditapes decussatus* collectée dans la lagune de Tunis (en printemps 2009) afin d'évaluer les effets des xénobiotiques présents dans le milieu sur la structure tissulaire (lésions histopathologiques) de l'organisme. Cette étude histologique est réalisée sur plusieurs étapes :

- ***La fixation***

Suite à la dissection, les organes (branchies et glande digestive) ont été immergés directement dans un fixateur, liquide de Bouin. Le but de la fixation est de conserver les structures tissulaires et cellulaires dans un état le plus proche possible de l'état *in vivo*, assurant une polymérisation des protéines et un durcissement des organes. Ainsi, elle va empêcher l'hydrolyse et la digestion enzymatique des protéines et éviter la putréfaction des tissus par les micro-organismes.

- ***L'inclusion***

Elle a pour but de conférer au bloc de tissu une consistance pour pouvoir réaliser des coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, l'organe subit d'abord une déshydratation par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant (70%, 80%, 95% et 100%), puis dans trois bains successifs de toluène (élimine l'alcool, dissout les graisses et rend les pièces translucides).

L'organe est ensuite imprégné dans de la paraffine et placé dans une étuve à 57°C pendant 24 h pour que le paraffine infiltre toute la pièce. Enfin, il est coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage. Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

- ***Les coupes***

Les coupes du bloc de paraffine sont faites avec un microtome permettant de réaliser des tranches de section de 5 µm d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.

- ***La coloration***

Elle est réalisée sur lames. Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Tout d'abord, les coupes ont été déparaffinées par immersion des lames dans deux bains de toluène. Par la suite, les coupes ont été réhydratées par immersion des lames dans des bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'eau distillée.

Le principe de coloration repose sur l'affinité particulière de certains tissus ou constituants cellulaires pour une substance colorante déterminée. Dans ce travail nous avons utilisé deux colorations. Une première coloration standard à l'Hématoxyline-Eosine (H.E) (bichromique) qui associe l'hématoxyline qui colore les noyaux en violet et l'éosine colore les cytoplasmes en rose. La deuxième coloration utilisée est celle au Trichrome de Masson (TM) (trichromiques) qui associe un colorant nucléaire (hématoxyline), un colorant cytoplasmique et un colorant bleu colorant les fibres de collagène.

- ***Le montage***

Après avoir subi une déshydratation (par bains d'alcool de degré croissant puis bains de toluène), les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique (Baume de Canada) dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre.

Les préparations sont ensuite séchées à 37°C puis observées au microscope optique et photographié à l'aide d'un appareil photo.

Les altérations histopathologiques ont été évaluées semi-quantitativement par le classement de la sévérité des lésions (grades 0 (-), 0.5 (+/-), 1 (+), 2 (++) et 3 (+++)). Un indice de dommages a été calculé pour permettre une comparaison des réponses histopathologiques entre les sites d'échantillonnage. L'indice de dommages est une valeur moyenne arithmétique obtenue à partir de l'évaluation semi-quantitative des lésions (Riba et al., 2004).

5. ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats des biomarqueurs biochimiques ont été exprimés en moyenne ± déviation standard (SD). Les résultats des expressions génétiques et de la génotoxicité sont exprimés en moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM). Les données ont été initialement testées pour la normalité et l'homogénéité de la variance, afin de répondre aux exigences statistiques. Dans le cas d'une distribution normale des données, l'analyse statistique a été réalisée en utilisant ANOVA à sens unique et le test de Duncan pour la comparaison de plage multiple. Dans le cas d'une distribution non-normale des données, des tests non paramétriques (test de Mann-Whitney ou test de Kruskal-Wallis) ont été utilisés. Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$ pour l'ensemble des analyses. Le coefficient de corrélation de Pearson a été calculé également afin d'étudier les relations entre les données chimiques dans les sédiments et les tissus des palourdes. Tous ces tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel SigmaStat 3.5. L'analyse en composantes principales des variables issus des échantillons collectées *in situ* au printemps, a été effectuée dans le but de discriminer entre les différents sites d'échantillonnage en utilisant le logiciel XLSTAT 7.5.2.

CHAPITRE III :
RESULTATS ET DISCUSSION

A. Approche *in situ* :

Combinaison des approches chimique et biologique pour la biosurveillance de la lagune de Tunis

1. INTRODUCTION

Les lagunes côtières sont des écosystèmes transitionnels et dynamiques complexes, caractérisés par des fluctuations permanentes des conditions environnementales (Porter et al., 2001; Kamel et al., 2014). En raison de l'urbanisation, l'industrialisation et le tourisme, les lagunes sont considérés comme des écosystèmes assez modifiés et menacés par l'augmentation des apports de divers contaminants à travers les rejets urbains, agricoles et industriels (Matozzo et al., 2010 ; Cravo et al., 2012). Etant persistants dans le biotope et la biocénose, la présence des contaminants dans l'environnement peut provoquer la dégradation des écosystèmes, causer des effets délétères sur les faunes sauvages, et même avoir un impact nocif sur la santé humaine (Fang et al., 2004 ; Bhandari et al., 2014). Il est important de quantifier les contaminants dans l'eau, les sédiments et les organismes afin d'évaluer le niveau de contamination d'un milieu aquatique et pouvoir déterminer les éventuels sources des xénobiotiques détectés dans ce milieu. Toutefois, ces analyses chimiques ne fournissent pas de données sur les effets biologiques des contaminants environnementaux chez les organismes vivants, d'où l'intérêt de l'intégration d'une batterie de biomarqueurs chez les espèces sentinelles avec les analyses chimiques des polluants afin d'évaluer les risques environnementaux et d'obtenir ainsi des indications globales sur la santé d'un écosystème (Viarengo et al., 2007 ; Morales-Caselles et al., 2008). De plus, il est important de comprendre les interactions existant entre les contaminants environnementaux, les biomarqueurs et leur évolution spatio-temporelle dans les conditions de terrain.

La lagune de Tunis, localisée dans le nord de la Tunisie, est d'un intérêt économique important. Malgré son intérêt, cette lagune est soumise à une forte pression anthropique. En effet, la ville de Tunis située aux alentours de la lagune présente une population très dense et caractérisée par la présence d'une variété d'activités économiques telles que les ports destinés au transport des marchandises et des passagers, le tourisme, l'agriculture et plusieurs industries. A notre connaissance aucune étude antérieure ne s'est intéressée à l'évaluation des

risques environnementaux de la pollution de la lagune à travers une approche chimique et biologique combinée.

L'objectif de notre étude est d'évaluer la pollution de la lagune de Tunis à travers l'application d'une approche multibiomarqueur chez une espèce sentinelle, la palourde *Ruditapes decussatus*, qui est bien représentée dans la lagune de Tunis. Cette approche combine la réponse biologique de la palourde à différents niveaux d'organisation cellulaire, le niveau moléculaire (expression des gènes), le niveau biochimique (activités enzymatiques de métabolisation, antioxydante et neurologique) et le niveau tissulaire (altérations structurelles des tissus), afin d'obtenir une connaissance plus ou moins complète concernant l'impact biologique de la pollution. De plus, l'évolution temporelle des biomarqueurs biochimiques sous l'effet de la contamination a été étudiée. Les biomarqueurs ont été analysés au niveau de deux importants organes chez la palourde et qui représentent les tissus les plus sensibles aux contaminants environnementaux : les branchies qui sont toujours en contact direct avec les contaminants présents dans le milieu extérieur et la glande digestive qui représente le site d'accumulation et de métabolisation des contaminants chez la palourde.

Dans cette étude, la contamination de la lagune de Tunis par les hydrocarbures et les métaux traces a été évaluée par l'analyse de la distribution de ces contaminants dans les sédiments superficiels de la lagune et leur accumulation dans le tissu mou de la palourde *Ruditapes decussatus.*

2. LES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EAU DE MER

Dans le but de déterminer la qualité physico-chimique de la lagune de Tunis pendant la campagne d'échantillonnage, les paramètres physico-chimiques (température, salinité et pH) de l'eau de mer dans les sites de prélèvement ont été suivis mensuellement sur la période septembre 2008 – août 2009 (tableau X).

Les données obtenues montrent que les eaux de la lagune de Tunis présentent une variation mensuelle de la température qui suit le cycle saisonnier avec une moyenne annuelle de 20,9 ± 6,3°C. Les températures minimales ont été enregistrées en Février avec des valeurs variant entre 10,2 et 11,3°C respectivement dans les sites de prélèvement S5 et S3-S4.

La moyenne annuelle de la salinité des eaux de la lagune est égale à 37,2 ± 2,3 psu. Les valeurs minimales ont été enregistrées en février (33,6 psu), alors que les salinités maximales ont été mesurées en août (40,1 psu).

La moyenne annuelle de pH des eaux est égale à 8,3 ± 0,3. Les valeurs minimales de pH ont été mesurées en septembre (7,8) alors que les valeurs maximales ont été enregistrées en février (8,9).

Une comparaison spatiale des moyennes annuelles de température, de salinité et de pH ne montre pas de différences significatives entre les six sites d'échantillonnage.

Tableau X: Variation mensuelle des paramètres physico-chimiques de l'eau de mer de la lagune de Tunis (septembre 2008 – août 2009).

Mois	Température (°C)						Salinité (psu)						pH					
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S1	S2	S3	S4	S5	S6
sept-08	29,7	28,4	28,2	30,1	25,7	25,9	40,9	40,8	40,9	40,9	39,7	39,7	7,9	7,8	7,8	7,9	7,9	7,9
oct-08	22,5	23,3	21,7	21,6	20,9	21,2	38,4	38,9	38,7	38,6	38	38	8	8	8	8	8,1	8,1
nov-08	21,1	20,4	20,6	20,8	16,9	16,8	37,5	37,8	37,4	37,8	36,9	36,8	8,2	8,1	8,1	8,2	8,2	8,2
déc-08	16,4	14,8	14,6	14,9	12,7	13,3	35,7	35,4	35,4	35,5	35	35,2	8,4	8,2	8,3	8,3	8,5	8,5
janv-09	12	13,5	13,6	13,1	12,5	13,2	34,3	34,7	34,8	34,3	34,1	34,1	8,6	8,4	8,4	8,5	8,6	8,6
févr-09	11,2	11,1	11,3	11,3	10,2	10,5	33,8	34	34	33,8	33,6	33,7	8,8	8,7	8,7	8,6	8,8	8,9
mars-09	17,1	16,5	17,2	17,7	17	18	35,2	35,5	35,6	35,2	34,7	34,7	8,3	8,2	8,2	8,3	8,3	8,3
avr-09	21,2	17,9	18,1	17,2	21	20,3	35,8	36	36	35,9	35,2	35,5	8,5	8,4	8,5	8,4	8,5	8,5
mai-09	25,1	23,3	22,8	25	25,2	24,3	37,2	37,6	37,6	37,1	36,7	36,6	8,5	8,5	8,4	8,6	8,6	8,6
juin-09	26,3	25,4	25,3	26,5	25,8	25,6	38	38,1	38,1	37,9	37,2	37,1	8,6	8,6	8,5	8,6	8,6	8,7
juil-09	28,6	27,8	27,4	27,9	26,5	26,6	39,6	39,8	39,9	39,5	39	39,1	8,3	8,2	8,2	8,3	8,4	8,4
août-09	30,4	29,9	29,9	30,7	27,6	27,8	41,2	41,3	41,3	41,1	40,1	40,2	8	8	8	8,1	8,1	8,1

3. CONTAMINATION DE LA LAGUNE DE TUNIS PAR LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAPs)

3.1. Distribution des HAPs dans l'eau de mer

Afin d'avoir une idée sur les concentrations des HAPs dans l'eau de mer de la lagune de Tunis, une analyse de l'eau de mer, prélevée dans les six sites d'étude (S1, S2, S3, S4, S5 et S6) en automne, a été réalisée. Les résultats ont montré que les concentrations des HAPs totaux sont plus élevées dans les sites de la lagune de Tunis par rapport au site de référence (tableau XI). Les concentrations les plus élevées ont été enregistrées au niveau du site S3 alors que les concentrations les plus faibles ont été enregistrées au niveau du site S6. L'indéno[1,2,3-cd]pyrène représente le composé HAP le plus abondant dans l'eau de mer. Le benzo[a]pyrène a été détecté dans les échantillons d'eau de mer provenant des sites S4, S5 et S6 avec des concentrations respectives de 2,3 ; 6,1 et 9,8 µg/L.

Tableau XI : Concentrations des HAPs (µg/L) dans l'eau de mer prélevée dans la lagune de Tunis en automne 2008.

Composés	Témoin	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Naphtalène	3,4	8,1	9,3	5,2	6,2	7,6	6,3
1-Méthylnaphtalène	< l.d.	0,5	< l.d.	< l.d.	0,4	< l.d.	< l.d.
1-Ethylnaphtalène	< l.d.	0,2	< l.d.	< l.d.	0,3	< l.d.	< l.d.
Acenaphtylène	< l.d.	0,7	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.
Acenaphthène	< l.d.	2,3	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.
Fluorène	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.
Phénanthrène	< l.d.	2,6	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	0,7
Anthracène	< l.d.	0,4	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.
1-Méthylphénanthrène	< l.d.	0,7	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.
2-Méthylphénanthrène	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.
3,6-Diméthylphénanthrène	< l.d.	1,0	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.
Fluoranthène	< l.d.	1,1	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.
Pyrène	< l.d.	1,6	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.
1-Méthylpyrène	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	0,2	< l.d.	< l.d.
Benzo[a]anthracène	< l.d.	1,1	< l.d.	< l.d.	< l.d.	0,5	< l.d.
Chrysène	0,3	0,4	< l.d.	< l.d.	0,8	< l.d.	< l.d.
Benzo[b]fluoranthène	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.
Benzo[k]fluoranthène	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.
Benzo[e]pyrène	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.
Benzo[a]pyrène	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	2,3	6,1	9,8
Pérylène	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	1,1	< l.d.
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	< l.d.	59,7	11,5	166,9	49,7	58,3	< l.d.
Dibenzo[a,h]anthracène	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.
Benzo[g,h,i]pérylène	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.	< l.d.
ΣHAPs	3,7	80,3	20,8	172,1	59,9	73,6	16,8

3.2. Distribution des HAPs dans les sédiments

Les concentrations de 24 HAPs déterminées dans les sédiments superficiels prélevés saisonnièrement (automne, hiver et printemps) dans les sites de la lagune de Tunis et dans le site de référence sont présentées dans le tableau XII. Les sédiments des six sites d'échantillonnage localisés dans la lagune de Tunis présentent des concentrations en HAPs totaux plus élevés que celle enregistrée dans les sédiments du site de référence. Les concentrations en HAPs totaux les plus élevées ont été enregistrées dans les sédiments du site S4 avec des valeurs comprises entre 1271,4 et 4980,7 ng/g de poids sec. Les sites S1, S3 et S6 présentent les concentrations les plus faibles en HAPs totaux avec des valeurs allant de 142,4 à 277,2 ng/g de poids sec. Des variations temporelles des concentrations en HAPs totaux ont été observées avec des profils d'évolution différents entre les sites. Nos résultats montrent la prédominance des HAPs à haut poids moléculaires de 4-6 cycles (allant du pyrène au benzo[g,h,i]pérylène) par rapport aux HAPs de bas poids moléculaires de 2-3 cycles (allant du naphtalène au fluoranthène) pour tous les échantillons analysés.

Des rapports de diagnostiques ont été employés dans cette étude pour distinguer entre HAPs pétrogéniques et pyrolytiques (tableau XIII). Les rapports de diagnostiques employés dans cette étude pour distinguer entre les HAPs pétrogéniques et pyrolytiques dans les sédiments étaient Phé/An, Flt/Py, An/(An + Phé), Flt/(Flt + Py) et IP/(IP + B[ghi]Pér). Un rapport (Phé/An) < 10 et un rapport (Flt/Py) > 1 sont généralement caractéristique des sources pyrolytiques. Un rapport (An/An + Phé) < 0,1 et un rapport (Flt/Flt + Py) < 0,5 indiquent une source pétrogénique. Un rapport (IP/IP + B[ghi]Pér) < 0,2 implique une source pétrogénique, des valeurs entre 0,2 et 0,5 indiquent une combustion du carburant, alors que des valeurs > 0,5 sont associées à une combustion du bois et du charbon.

Dans notre étude, tous les échantillons de sédiments présentent un rapport (Phé/An) inférieur à 10. Le rapport (Flt/Py) est supérieur à 1 pour la majorité des échantillons, sauf pour les sédiments du site S1 prélevés en automne et en printemps et les sédiments du site S6 prélevés en automne, pour lesquels le rapport est inférieur à 1. Le rapport (An/An + Phé) est supérieur à 0,1 pour tous échantillons de sédiments. Le rapport (Flt/Flt + Py) est inférieur à 0,5 pour les échantillons S1 (automne et printemps) et S6 (automne), alors qu'il est supérieur à 0,5 pour le reste des échantillons. Le calcul du rapport (IP/IP + B[ghi]Pér) montre des valeurs supérieurs à 0,5 pour les échantillons S4 (hiver) et S1 et S3 (printemps), une valeur égale à 0,03 pour l'échantillon S6 (automne) et des valeurs entre 0,4 et 0,5 pour le reste des échantillons.

Tableau XII : Distribution des HAPs (ng/g poids sec) dans les sédiments de surface collectés saisonnièrement dans la lagune de Tunis en 2008-2009.

		Automne						Hiver						Printemps					
Composés	**Témoin**	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**	**S6**	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**	**S6**	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**	**S6**
Naphtalène	17,0	1,8	2,5	2,8	3,6	2,4	9,5	-	9,6	-	0,4	-	-	4,6	2,7	9,5	6,1	6,0	9,1
1-Méthylnaphtalène	-	0,1	0,2	-	1,0	0,3	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6
1-Ethylnaphtalène	-	0,04	-	-	-	-	-	-	9,3	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-
Acenaphtylène	-	0,3	0,8	0,8	4,4	2,1	0,4	-	-	-	11,1	0,8	-	-	1,6	3,2	12,5	1,6	0,5
Acenaphthène	-	-	-	-	1,2	0,3	0,1	0,8	5,5	0,8	1,5	0,5	1,4	-	-	-	-	-	0,4
Fluorène	0,7	-	-	-	5,5	0,4	-	0,8	13,2	0,3	2,0	0,9	1,6	-	1,7	-	0,1	-	-
Phénanthrène	1,4	0,2	0,9	0,9	5,5	2,8	0,8	-	-	0,0	0,1	0,1	0,2	1,6	1,8	0,8	43,3	1,4	0,4
Anthracène	0,2	0,3	1,3	0,4	8,6	1,8	0,3	0,5	1,2	0,0	0,5	0,1	0,3	0,2	2,6	1,0	7,5	0,7	0,6
1-Méthylphénanthrène	1,6	0,4	1,3	1,5	3,5	10,3	1,6	6,6	7,3	2,2	48,4	2,6	3,7	4,3	-	-	68,3	2,0	1,4
2-Méthylphénanthrène	1,4	0,6	1,1	1,5	2,0	6,2	1,4	10,7	27,7	2,7	68,1	3,4	4,9	3,3	-	-	55,8	2,2	1,3
3,6-Diméthylphénanthrène	1,7	0,6	1,6	1,5	2,0	6,3	4,0	5,6	12,3	2,8	74,9	4,1	3,0	-	-	-	54,3	2,3	1,1
Fluoranthène	18,3	15,7	46,6	25,7	32,7	119,9	27,2	39,3	95,3	36,6	589,4	42,1	32,4	28,3	26,5	17,4	707,3	42,8	22,2
Pyrène	20,8	19,8	6,6	10,2	21,7	47,8	35,1	3,9	1,1	2,5	11,4	5,0	5,3	32,1	4,4	14,9	391,0	24,7	21,2
1-Méthylpyrène	1,8	-	-	-	-	4,1	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,1	-	-
Benzo[a]anthracène	8,0	9,9	23,3	14,4	51,8	48,8	13,6	15,6	46,3	10,6	114,3	17,4	13,2	8,0	26,6	9,2	222,4	17,9	9,4
Chrysène	21,8	28,5	78,6	34,6	105,2	114,3	34,5	29,3	62,2	21,8	448,2	44,2	19,3	33,3	62,2	25,3	601,1	50,6	24,8
Benzo[b]fluoranthène	-	50,9	-	31,1	222,1	122,4	71,2	25,0	42,5	15,3	477,0	53,2	14,7	12,7	135,9	57,6	1062,3	92,3	38,1
Benzo[k]fluoranthène	-	-	-	30,6	156,6	82,0	-	15,5	46,2	13,1	341,6	27,3	13,9	1,8	-	-	-	-	-
Benzo[e]pyrène	12,0	25,0	77,4	32,8	157,8	100,7	29,7	22,7	45,6	14,0	401,3	43,9	16,0	35,4	66,5	26,2	560,1	47,7	24,1
Benzo[a]pyrène	4,5	12,3	20,8	23,6	86,0	41,9	11,2	8,8	31,7	4,7	94,7	9,6	8,2	1,6	46,1	9,3	267,5	25,1	4,1
Pérylène	7,4	12,5	53,1	18,2	118,0	86,2	12,9	4,4	10,8	4,7	69,5	5,2	4,5	-	214,5	9,0	344,2	24,9	5,7
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	-	10,2	39,4	10,5	125,1	54,6	0,5	6,0	12,0	3,6	406,7	21,1	4,3	8,6	25,1	5,8	251,5	-	6,2
Dibenzo[a,h]anthracène	-	-	7,7	2,6	34,7	10,8	1,6	4,7	12,1	2,1	25,7	6,3	3,9	-	-	-	-	-	-
Benzo[g,h,i]pérylène	-	15,6	43,8	15,0	122,8	63,1	17,6	6,3	17,3	4,6	353,5	25,3	6,1	4,7	27,0	5,6	314,5	15,3	7,4
ΣHAPs	118,5	204,8	406,8	258,6	1271,4	929,5	277,2	206,5	509,2	142,4	3540,2	312,9	156,7	180,5	646,6	194,8	4980,7	357,5	178,6

Tableau XIII : Rapports de diagnostique visant à identifier la source des apports en HAPs dans les sédiments collectés dans la lagune de Tunis en 2008-2009.

Rapports de diagnostiques	Témoin	Automne						Hiver						Printemps					
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Phé/An	8,18	0,74	0,67	1,98	0,64	1,57	2,75	-	-	0,93	0,25	0,75	0,90	8,20	0,67	0,88	5,81	1,96	0,78
Flt/Py	0,88	0,79	7,10	2,52	1,51	2,51	0,77	10,21	85,06	14,51	51,93	8,47	6,15	0,88	6,08	1,17	1,81	1,73	1,05
An/(An+Phé)	0,11	0,57	0,60	0,34	0,61	0,39	0,27	-	-	0,52	0,80	0,57	0,53	0,11	0,60	0,53	0,15	0,34	0,56
Flt/(Flt+Py)	0,47	0,44	0,88	0,72	0,60	0,72	0,44	0,91	0,99	0,94	0,98	0,89	0,86	0,47	0,86	0,54	0,64	0,63	0,51
IP/(IP + B[ghi]Pér)	-	0,40	0,47	0,41	0,50	0,46	0,03	0,49	0,41	0,44	0,53	0,45	0,41	0,65	0,48	0,51	0,44	-	0,46

Phé: phénanthrène, An: anthracène, Flt: fluoranthène, Py: pyrène, IP: indéno[1,2,3-cd]pyrène, B[ghi]Pér: benzo[g,h,i]périlène.

3.3. Accumulation des HAPs dans les tissus de *Ruditapes decussatus*

Les concentrations des 24 HAPs mesurés dans les tissus des palourdes collectées saisonnièrement dans la lagune de Tunis et dans le site de référence sont représentées dans le tableau XIV. Les résultats montrent des concentrations en HAPs totaux plus élevées dans les palourdes collectées dans la lagune de Tunis (entre 783,7 et 7777,3 ng/g poids sec) par rapport au témoin (entre 568,2 et 1569,7 ng/g poids sec) pendant les quatre saisons. Une variation spatiale des concentrations tissulaires en HAPs totaux a été observée. Les palourdes du site Z1 présentent les teneurs les plus élevées en HAPs totaux pendant toutes les saisons alors que les palourdes du site Z3 présentent les teneurs les plus faibles pendant les saisons d'hiver, de printemps et d'été. En automne la teneur la plus faible en HAPs (783,7 ng/g poids sec) a été enregistrée dans les palourdes collectées dans le site Z2. Une comparaison saisonnière des concentrations tissulaires en HAPs totaux dans les palourdes collectées de la lagune de Tunis montre une augmentation des teneurs pendant l'hiver pour les trois sites d'échantillonnage et pendant l'été pour le site Z1. Les teneurs les plus faibles ont été enregistrées en automne pour les sites Z1 et Z2 et en été pour le site Z3. Sur un total de 24 HAPs mesurés, deux HAPs (1-méthylnaphtalène et pyrène) n'ont pas été détectable dans les palourdes collectées de la lagune de Tunis et du site de référence pendant toutes les saisons. Les résultats montrent la prédominance des HAPs à haut poids moléculaires de 4-6 cycles (de 501,9 à 6080 ng/g poids sec) par rapport aux HAPs de bas poids moléculaires de 2-3 cycles (de 44,4 à 1708,6 ng/g poids sec) pour tous les échantillons tissulaires analysés.

Les rapports de diagnostique utilisés pour distinguer entre les HAPs pétrogéniques et pyrolytiques dans les tissus des palourdes étaient Phé/An, An/(An + Phé), B[a]A/(B[a]A + Chry) et IP/(IP + B[ghi]Pér) (tableau XV). Un rapport (B[a]A/B[a]A + Chry) < 0,2 indique une source pétrogénique, > 0,35 implique une source pyrolytique et entre 0,2 et 0,35 indique une source mixte (pétrogénique et pyrolytique). Pour tous les échantillons de palourdes, le rapport (Phé/An) est inférieur à 10 et le rapport (An/An + Phé) est supérieur à 0,1. Le rapport (B[a]A/B[a]A + Chry) présente des valeurs allant de 0,24 à 0,26 pour les palourdes des sites Z1 et Z2 collectées en hiver et en été, alors que les valeurs sont supérieures à 0,35 pour le reste des échantillons. Le rapport (IP/IP + B[ghi]Pér) présente une valeur égale à 0,02 pour l'échantillon Z2 (printemps), une valeur supérieure à 0,5 pour l'échantillon Z1 (printemps) et des valeurs entre à 0,33 et 0,5 pour le reste des échantillons de palourdes collectés dans la lagune de Tunis.

L'application du test de corrélation de Pearson a montré l'absence de corrélations entre les concentrations des HAPs totaux dans les sédiments et leur accumulation dans les tissus de *Ruditapes decussatus*.

Tableau XIV : Accumulation des HAPs (ng/g poids sec) dans les tissus de *Ruditapes decussatus* collectée saisonnièrement dans la lagune de Tunis et le témoin en 2008-2009.

	Automne				Hiver				Printemps				Eté			
Composés	**Témoin**	**Z1**	**Z2**	**Z3**	**Témoin**	**Z1**	**Z2**	**Z3**	**Témoin**	**Z1**	**Z2**	**Z3**	**Témoin**	**Z1**	**Z2**	**Z3**
Naphtalène	1,1	-	-	-	3,5	-	-	-	4,5	-	-	-	8,0	12,3	7,2	3,9
1-Méthylnaphtalène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Ethylnaphtalène	-	-	-	6,9	-	-	-	-	-	-	9,9	-	-	-	-	-
Acenaphtylène	1,6	-	-	1,9	9,3	7,6	-	-	5,3	-	-	-	2,5	25,2	24,8	9,7
Acenaphthène	3,4	27,9	9,1	21,8	5,0	12,7	15,6	69,1	3,5	121,6	93,2	53,7	2,8	25,5	14,5	10,2
Fluorène	5,1	41,3	13,8	2,5	11,8	17,4	37,2	218,0	7,6	19,5	70,2	24,0	10,4	209,7	97,6	42,9
Phénanthrène	-	5,1	-	-	2,6	3,1	4,7	16,9	3,7	-	-	-	2,6	23,0	14,2	4,7
Anthracène	-	9,6	2,3	1,7	5,8	8,1	21,0	46,2	7,4	-	-	-	7,4	53,5	33,8	8,9
1-Méthylphénanthrène	12,6	54,4	9,7	98,1	98,7	371,2	357,3	232,8	34,0	102,9	64,4	51,1	62,4	517,9	301,1	50,1
2-Méthylphénanthrène	8,0	78,1	22,8	115,2	129,7	582,5	372,2	308,9	93,7	461,4	121,0	85,1	117,6	494,4	211,0	45,8
3,6-Diméthylphénanthrène	12,5	37,4	17,6	53,8	51,2	466,9	900,7	106,8	48,3	223,8	123,1	117,9	34,6	335,8	143,1	36,8
Fluoranthène	122,1	191,7	137,0	345,6	517,9	1814,2	1159,2	316,3	269,2	739,1	334,0	381,2	133,8	2237,3	1138,8	180,1
Pyrène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Méthylpyrène	-	-	-	-	-	-	961,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzo[a]anthracène	80,8	243,4	134,8	127,1	110,5	564,3	259,1	164,8	101,3	400,6	668,4	239,6	94,4	409,5	172,7	120,3
Chrysène	140,9	142,8	114,7	130,7	196,5	1659,5	736,3	174,7	137,4	367,1	387,5	183,6	84,6	1288,6	552,9	115,7
Benzo[b]fluoranthène	26,1	88,9	36,5	39,8	59,8	103,5	279,3	86,3	53,0	82,6	161,5	67,7	36,6	284,5	134,2	43,0
Benzo[k]fluoranthène	40,1	138,4	65,7	78,7	75,1	118,7	235,2	134,5	79,3	150,8	263,0	129,2	27,6	188,2	104,8	73,1
Benzo[e]pyrène	25,1	96,2	50,7	52,0	73,6	169,2	318,3	92,7	26,5	109,5	207,5	93,5	32,1	488,4	236,9	73,9
Benzo[a]pyrène	34,8	114,8	57,8	63,3	86,6	125,1	142,0	137,0	15,9	199,5	206,4	174,0	29,5	264,8	162,2	98,8
Pérylène	7,2	29,7	29,9	27,8	20,1	35,4	97,9	33,6	35,7	103,3	101,4	68,6	20,3	428,8	166,4	55,6
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	8,9	26,4	16,0	13,8	24,8	53,8	40,0	26,9	22,2	28,7	1,6	19,9	9,6	130,1	60,2	23,1
Dibenzo[a,h]anthracène	30,1	34,0	42,4	42,5	47,6	102,6	47,5	60,9	52,7	55,0	84,4	39,5	23,9	157,4	68,6	36,4
Benzo[g,h,i]pérylène	7,8	26,8	22,9	22,0	39,6	70,7	63,2	53,8	62,5	28,0	101,2	21,1	9,3	202,3	108,7	29,7
ΣHAPs	568,2	1387,1	783,7	1245,3	1569,7	6286,5	6048,2	2280,4	1063,4	3193,5	2998,6	1749,7	750,2	7777,3	3753,6	1062,7

Tableau XV: Rapports de diagnostique visant à identifier la source des apports en HAPs dans les palourdes collectées dans la lagune de Tunis en 2008-2009.

Rapports de diagnostiques	Automne				Hiver				Printemps				Eté			
	Témoin	**Z1**	**Z2**	**Z3**	**Témoin**	**Z1**	**Z2**	**Z3**	**Témoin**	**Z1**	**Z2**	**Z3**	**Témoin**	**Z1**	**Z2**	**Z3**
Phé/An	-	0,53	-	-	0,45	0,38	0,23	0,37	0,50	-	-	-	0,35	0,43	0,42	0,53
An/An+Phé	-	0,65	-	-	0,69	0,72	0,82	0,73	0,67	-	-	-	0,74	0,70	0,70	0,65
B[a]A/(B[a]A +Chry)	0,36	0,63	0,54	0,49	0,36	0,25	0,26	0,49	0,42	0,52	0,63	0,57	0,53	0,24	0,24	0,51
IP/(IP + B[ghi]Pér)	0,53	0,49	0,41	0,39	0,39	0,43	0,39	0,33	0,26	0,51	0,02	0,49	0,51	0,39	0,36	0,44

Phé: phénanthrène, An: anthracène, B[a]A: benzo[a]anthracène, Chry: chrysène, IP: indéno[1,2,3-cd]pyrène, B[ghi]Pér: benzo[g,h,i]pérylène.

4. CONTAMINATION METALLIQUE DANS LA LAGUNE DE TUNIS

4.1. Distribution des métaux traces dans les sédiments

La variation spatio-temporelle de la distribution des concentrations des métaux traces dans les sédiments superficiels prélevés dans les sites de la lagune de Tunis et dans le site de référence est illustrée dans le tableau XVI.

Les sédiments des six sites d'échantillonnage localisés dans la lagune de Tunis présentent des concentrations en métaux traces significativement plus élevés que celles enregistrées dans les sédiments de référence durant les quatre saisons. Le seul métal qui n'a pas pu être détecté dans tous les échantillons de sédiments était l'Ag dont les teneurs étaient inférieurs à la limite de détection de l'appareil. L'analyse des autres métaux indique que le site S4 et le plus contaminé avec des teneurs les plus élevées en Cd, Pb, Zn, Cu pendant toutes les saisons et de même pour le V durant l'hiver et l'été. Le site S1 présente de fortes teneurs en durant les quatre saisons et de fortes teneurs en Mn pendant l'automne et l'hiver. Alors que le site 2 présente les teneurs les plus élevées en As pendant l'automne et en Hg pendant l'automne, l'hiver et le printemps. L'analyse de Hg montre que les sites (S2, S3 et S4) les plus proches de la centrale électrique de Radés, exceptionnellement le site S2, sont significativement plus contaminés par ce métal alors que les autres sites plus distant de cette centrale tels que S1, S5 et S6 présentent les plus faibles teneurs en Hg. Des fluctuations saisonnières des teneurs en métaux traces dans les sédiments superficiels ont été observées mais sans pouvoir déceler une évolution temporelle précise.

Tableau XVI: Distribution des métaux traces dans les sédiments de surface (µg/g poids sec) collectés saisonnièrement dans la lagune de Tunis (septembre 2008- août 2009).

Saison	Site	Ag	As	Cd	Hg	Mn	Ni	Pb	V	Zn	Cu
	Témoin	< l.d.	1,9 ± 0,3a	< l.d. a	(2,8 ± 0,2) .10^{-2} a	31 ± 6 a	2,0 ± 0,2 a	3,6 ± 0,8 a	8 ± 1 a	45 ± 7 a	2,2 ± 0,5 a
Automne	S1	< l.d.	12,5 ± 0,3 b	0,40 ± 0,18 b	(4,7 ± 0,2) .10^{-2} b	194 ± 5 b	16 ± 4 b	25 ± 2 b	60 ± 1 b	104 ± 9 be	7,9 ± 0,2 b
	S2	< l.d.	16,0 ± 0,4 c	0,24 ± 0,03 b	(45,8 ± 0,9) .10^{-2} c	202 ± 6 b	20 ± 3 b	44 ± 7,65 c	60 ± 1 b	100 ± 20 be	16,0 ± 0,3 c
	S3	< l.d.	9,5 ± 0,5 d	0,35 ± 0,18 b	(12,5 ± 0,2) .10^{-2} d	175 ± 5 c	15 ± 5 b	53 ± 17 c	44 ± 2 c	143 ± 17 b	10,6 ± 0,5 d
	S4	< l.d.	11,3 ± 0,7 e	0,78 ± 0,17 c	(18,5 ± 0,8) .10^{-2} e	163 ± 4 d	14 ± 4 b	239 ± 22 d	45 ± 2 c	431 ± 60 c	11 ± 1 d
	S5	< l.d.	8,1 ± 0,7 f	0,22 ± 0,03 b	(6,6 ± 0,3) .10^{-2} f	176 ± 5 c	14 ± 5 b	23 ± 3 b	46 ± 1 c	95 ± 24 be	6,5 ± 0,4 ef
	S6	< l.d.	9,0 ± 0,7 df	0,19 ± 0,08 b	(7,4 ± 0,2) .10^{-2} g	175 ± 5 c	14 ± 4 b	25 ± 4 b	49,1 ± 0,2 d	78 ± 17 e	7 ± 1 fb
Hiver	S1	< l.d.	12,6 ± 1 b	0,20 ± 0,08 b	(5,6 ± 0,1) .10^{-2} b	200 ± 6 b	16 ± 3 b	25 ± 3 b	60 ± 1 b	107 ± 17 bf	7,6 ± 0,4 b
	S2	< l.d.	11,2 ± 0,8 b	0,16 ± 0,01 b	(26,6 ± 1,1) .10^{-2} c	169 ± 6 c	14 ± 4 b	42 ± 8 c	39 ± 1 c	86 ± 20 bcef	12 ± 2 c
	S3	< l.d.	11,59 ± 0,05 b	0,48 ± 0,08 c	(14,1 ± 0,9) .10^{-2} d	182 ± 4 de	16 ± 4 b	34 ± 5 c	50 ± 2 d	128 ± 4 c	10,8 ± 0,6 c
	S4	< l.d.	11,8 ± 0,5 b	0,80 ± 0,14 d	(20,6 ± 0,5) .10^{-2} e	189 ± 2 d	18 ± 4 b	175 ± 28 d	59,5 ± 0,3 b	341 ± 5 d	19 ± 1 d
	S5	< l.d.	8,6 ± 0,3 c	0,26 ± 0,10 b	(6,2 ± 0,2) .10^{-2} f	186 ± 4 de	15 ± 4 b	19 ± 2 b	48,5 ± 0,8 d	81 ± 13 e	6,5 ± 0,1 e
	S6	< l.d.	8,7 ± 0,4 c	0,19 ± 0,03 b	(7,8 ± 0,2) .10^{-2} g	178 ± 5 e	14 ± 3 b	19 ± 1 b	49 ± 1 d	85 ± 13 fe	5,8 ± 0,4 e
Printemps	S1	< l.d.	12,4 ± 0,7 b	0,19 ± 0,05 b	(4,6 ± 0,2) .10^{-2} b	192 ± 4 b	16 ± 3 b	27 ± 3 b	59 ± 1 b	123 ± 16 b	8,4 ± 0,5 b
	S2	< l.d.	14,4 ± 0,2 c	0,19 ± 0,05 b	(33,6 ± 0,7) .10^{-2} c	197 ± 9 b	19 ± 4 b	44 ± 2 c	53 ± 1 c	108 ± 15 b	13 ± 1 c
	S3	< l.d.	14,5 ± 0,9 c	0,16 ± 0,06 b	(29,7 ± 0,6) .10^{-2} d	187 ± 6 b	18 ± 3 b	45 ± 2 c	53 ± 2 c	114 ± 12 b	13 ± 1 c
	S4	< l.d.	11 ± 1 b	0,90 ± 0,06 c	(16,3 ± 0,8) .10^{-2} e	194 ± 12 b	17 ± 4 b	170 ± 14 d	55 ± 2 ce	368 ± 19 c	16 ± 1
	S5	< l.d.	12,3 ± 0,6 b	0,23 ± 0,08 b	(9,1 ± 0,4) .10^{-2} f	187 ± 6 b	18 ± 2 b	23 ± 2 b	58 ± 1 be	102 ± 14 b	8,4 ± 0,5 b
	S6	< l.d.	13,9 ± 0,5 c	0,33 ± 0,03 b	(10,6 ± 0,6) .10^{-2} g	219 ± 4 c	20 ± 4 b	99 ± 13 e	59 ± 1 b	106 ± 2 b	9,67 ± 0,04 d
Eté	S1	< l.d.	11,6 ± 0,9 b	0,08 ± 0,01 b	(0,7 ± 0,6) .10^{-2} b	188 ± 7 be	16 ± 3 b	27 ± 3 a	59,9 ± 0,3 b	118 ± 12 b	7,9 ± 0,4 b
	S2	< l.d.	13 ± 1 bcd	0,24 ± 0,03 c	(22,4 ± 0,1) .10^{-2} c	191 ± 8 be	18 ± 3 b	44 ± 8 be	56 ± 1 c	107 ± 12 be	12 ± 1 c
	S3	< l.d.	10,6 ± 0,6 c	0,39 ± 0,02 d	(26,0 ± 2,9) .10^{-2} d	180 ± 8 be	18 ± 2 b	55 ± 11 b	51 ± 2 d	170 ± 25 c	12,6 ± 0,8 ce
	S4	< l.d.	12,4 ± 0,4 bd	0,96 ± 0,16 e	(20,0 ± 0,7) .10^{-2} e	193 ± 7 b	19 ± 4 b	173 ± 17 c	60 ± 1 b	432 ± 35 d	18,0 ± 1,5 d
	S5	< l.d.	13,7 ± 0,9 d	0,40 ± 0,07 d	(19,2 ± 0,2) .10^{-2} e	210 ± 3 c	20 ± 3 b	33 ± 4 e	58 ± 1 bc	131 ± 14 b	13,7 ± 0,3 e
	S6	< l.d.	8,2 ± 0,8 e	0,18 ± 0,08 c	(11,0 ± 0,3) .10^{-2} f	179 ± 7 e	14 ± 4 b	19 ± 2 a	49 ± 2 d	71 ± 17 ae	6,1 ± 0,2 f

Les résultants sont exprimés en moyenne ± SD (n = 10). Les concentrations sont exprimées en µg/g de poids sec.
< l.d.: inférieur à la limite de détection. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les sites, selon ANOVA et le test de Duncan, $p < 0,05$).

4.2. Accumulation des métaux traces dans les tissus de *Ruditapes decussatus*

Les concentrations des métaux lourds dans le tissu mou de *Ruditapes decussatus* collectée dans les trois sites de la lagune de Tunis (Z1, Z2 et Z3) et les témoins sont présentées dans le tableau XVII.

Les palourdes collectées dans les trois sites de la lagune de Tunis pendant toutes les périodes d'échantillonnage présentent des concentrations significativement plus élevées en métaux traces comparées au témoin. La concentration d'Ag n'est pas détectable dans les palourdes témoin durant les quatre saisons et dans les palourdes de la lagune de Tunis collectées en hiver. L'affinité de l'accumulation des métaux, basée sur la comparaison des moyennes des concentrations des métaux dans les trois sites de lagune et pendant les quatre saisons, semble suivre l'ordre suivant : Zn > As > Mn > Ni > Cu > Pb > V > Ag > Cd > Hg. Les différences des concentrations des métaux entre les sites d'échantillonnage ne permettent pas de déterminer un profil spatial clair des variations métalliques. Une comparaison saisonnière des concentrations métalliques tissulaires montre que la majorité des métaux (As, Cd, Hg, Ni, Pb, V, Cu et Zn) présentent une augmentation significative des concentrations en hiver, alors que les concentrations les plus élevées en Ag et Mn ont été enregistrées en été.

Le test de corrélation de Pearson a été utilisé dans le but de déterminer des corrélations significatives entre les concentrations de métaux dans les sédiments et leur accumulation dans les tissus de *Ruditapes decussatus*. Une corrélation significative a été enregistrée pour les concentrations de Cu (r = 0,40 ; p < 0,05), alors que des corrélations significatives négatives ont été notées pour les concentrations de Mn (r = -0,53 ; p < 0,01) et de V (r = -0,35 ; p < 0,05).

Tableau XVII : Accumulation des métaux traces (µg/g poids sec) dans les tissues de *Ruditapes decussatus* collectée saisonnièrement dans la lagune de Tunis et les témoins.

Saison	Site	Ag	As	Cd	Hg	Mn	Ni	Pb	V	Zn	Cu
Automne	Témoin	< l.d. a	12,9 ± 0,3 a	0,16 ± 0,01 a	(2,9 ± 0,1) .10^{-2} a	2,87 ± 0,01 a	4,6 ± 0,1 a	< l.d. a	0,38 ± 0,04 a	83 ± 2 a	5,92 ± 0,03 a
	Z1	0,45 ± 0,08 b	22,0 ± 0,5 b	0,23 ± 0,05 a	(7,4 ± 0,3) .10^{-2} b	10,9 ± 1,6 b	7 ± 2 b	2,1 ± 0,5 b	1,2 ± 0,3 b	93 ± 4 b	7,9 ± 0,4 b
	Z2	0,34 ± 0,02 c	18,7 ± 0,3 c	0,25 ± 0,05 b	(5,8 ± 0,1) .10^{-2} c	12,1 ± 0,6 bc	7 ± 1 b	1,4 ± 0,2 b	1,3 ± 0,1 b	94 ± 7 b	6,6 ± 0,1 c
	Z3	0,35 ± 0,02 c	15,1 ± 0,6 d	0,21 ± 0,03 b	(4,1 ± 0,1) .10^{-2} d	13,0 ± 0,7 c	7 ± 1 b	1,2 ± 0,1 b	1,4 ± 0,1 b	90 ± 3 b	5,8 ± 0,1 a
Hiver	Témoin	< l.d.	18,2 ± 0,7 a	0,21 ± 0,02 a	(2,5 ± 0,1) .10^{-2} a	3,29 ± 0,02 a	7,4 ± 0,3 a	< l.d. a	0,45 ± 0,05 a	95 ± 1 a	7,2 ± 0,1 a
	Z1	< l.d.	21 ± 1 b	0,31 ± 0,03 b	(14,1 ± 0,4) .10^{-2} b	11,7 ± 1,3 b	15 ± 3 b	8,2 ± 1,5 b	1,7 ± 0,2 b	127 ± 8 b	8,7 ± 0,4 b
	Z2	< l.d.	26 ± 1 c	0,31 ± 0,08 b	(12,1 ± 0,3) .10^{-2} c	12,2 ± 1,6 b	19 ± 2 b	6,0 ± 1,7 bc	2,0 ± 0,2 b	137 ± 7 b	14 ± 3 c
	Z3	< l.d.	38,3 ± 0,6 d	0,36 ± 0,01 b	(12,5 ± 0,2) .10^{-2} c	11,9 ± 1,3 b	11 ± 3 a	4,0 ± 0,5 c	1,8 ± 0,2 b	114 ± 1 c	9,8 ± 0,5 b
Printemps	Témoin	< l.d. a	8,5 ± 0,5 a	< l.d. a	(4,1 ± 0,1) .10^{-2} a	7,9 ± 0,5 a	2,0 ± 0,2 a	1,0 ± 0,1 a	0,41 ± 0,09 a	84 ± 2 a	5,4 ± 0,1 a
	Z1	0,34 ± 0,12 b	21,2 ± 0,7 b	0,24 ± 0,07 b	(14,6 ± 0,2) .10^{-2} b	8,5 ± 0,6 a	6,7 ± 0,3 b	3,7 ± 0,7 b	1,20 ± 0,04 b	102 ± 7 b	6,8 ± 0,9 b
	Z2	0,41 ± 0,09 b	21,5 ± 0,6 b	0,19 ± 0,07 b	(15,0 ± 0, 1) .10^{-2} c	8,6 ± 0,7 a	7 ± 1 b	2,9 ± 0,4 b	1,1 ± 0,1 b	107 ± 7 b	7,4 ± 0,6 b
	Z3	< l.d. a	17 ± 2 c	0,19 ± 0,06 b	(13,9 ± 0,3) .10^{-2} d	7,7 ± 1,4 a	6 ± 1 b	4 ± 1 b	0,9 ± 0,3 b	104 ± 6 b	6 ± 1 a
Eté	Témoin	< l.d. a	10,4 ± 0,6 a	0,11 ± 0,01 a	(5,69 ± 0,02) .10^{-2} a	5,6 ± 0,1 a	3,0 ± 0,2 a	0,7 ± 0,1 a	0,40 ± 0,02 a	88 ± 7 a	6,1 ± 0,2 a
	Z1	0,44 ± 0,12 b	15,3 ± 0,7 bc	0,16 ± 0,06 a	(4,44 ± 0,03) .10^{-2} b	15 ± 3 b	7 ± 2 b	2,2 ± 0,4 b	1,3 ± 0,4 b	109 ± 5 b	10 ± 1 bc
	Z2	0,59 ± 0,08 c	15,9 ± 0,1 b	0,16 ± 0,07 a	(3,8 ± 0,2) .10^{-2} c	12,6 ± 1,3 b	10 ± 3 b	2,9 ± 0,8 b	1,2 ± 0,1 b	108 ± 9 b	10,9 ± 0,7 b
	Z3	0,6 ± 0,08 c	14,6 ± 0,1 c	0,16 ± 0,03 a	(4,8 ± 0,3) .10^{-2} b	14,9 ± 0,7 b	8 ± 1 b	2,2 ± 0,2 b	1,4 ± 0,2 b	110 ± 9 b	9,3 ± 0,1 c

Les résultants sont exprimés en moyenne ± SD (n = 10). Les concentrations sont exprimées en µg/g de poids sec.
< l.d.: inférieur à la limite de détection. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les sites, selon ANOVA et le test de Duncan, $p < 0,05$).

5. ETUDE DA LA VARIABILITE SPATIO-TEMPORELLE DES BIOMARQUEURS BIOCHIMIQUES CHEZ *RUDITAPES DECUSSATUS*

5.1. Evaluation des marqueurs biochimiques au niveau des branchies de *R. decussatus*

5.1.1. L'activité glutathion S-transférase (GST) : biomarqueur de métabolisation

La variation spatio-temporelle de l'activité glutathion S-transférase (GST) au niveau des branchies de la palourde *Ruditapes decussatus* est illustrée dans la figure 30.

L'activité GST mesurée au niveau des branchies des palourdes collectées dans les trois sites de la lagune est significativement plus élevée comparée au témoin durant les quatre saisons. Les valeurs les plus élevées de l'activité GST ont été enregistrées dans le site Z3 pendant l'automne et l'hiver avec une augmentation par rapport aux témoins respectivement de 3,5 fois et 11,3 fois. D'un autre côté, le site Z2 présente les valeurs les plus élevées de l'activité GST en printemps et en été avec une augmentation de 6,3 par rapport aux témoins. Les palourdes du site Z1 présentent les activités GST les plus faibles comparées aux palourdes collectées dans les sites Z2 et Z3. En ce qui concerne la variation temporelle, une augmentation significative de l'activité GST a été notée dans les branchies de *R. decussatus* provenant des sites Z2 et Z3 pendant l'hiver comparée aux autres saisons, alors que l'activité la plus élevée dans le site Z1 a été enregistrée en automne. De plus, les activités GST mesurées en hiver présentent une forte variabilité entre les trois sites contaminées comparée aux autres périodes d'échantillonnage.

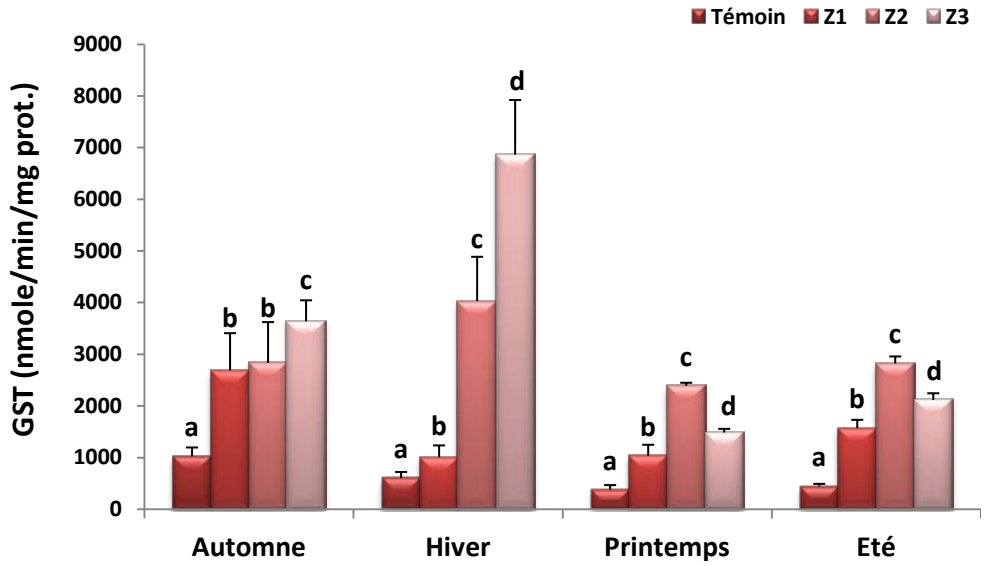


Figure 30: Variation spatio-temporelle de l'activité glutathion S-transférase au niveau des branchies de la palourde *Ruditapes decussatus* collectée, saisonnièrement, dans les trois sites de la lagune de Tunis et le témoin entre septembre 2008 et août 2009. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Les différentes lettres a, b, c et d indiquent une différence significative entre les sites durant la même saison, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

5.1.2. Les biomarqueurs de stress oxydant

Les biomarqueurs de stress oxydant sont représentés dans ce travail par la mesure de l'activité catalase (CAT) en tant qu'enzyme impliqué dans le système de défense antioxydant et le dosage du taux d'accumulation du malondialdéhyde (MDA) en tant que biomarqueur de la peroxidation lipidique des membranes cellulaires. Les résultats du suivi de l'activité catalase et du taux d'accumulation du malondialdéhyde au niveau des branchies de *Ruditapes decussatus* dans la lagune de Tunis sont illustrés par la figure 31.

Les biomarqueurs de stress oxydant (CAT et MDA) présentent une augmentation significative chez les palourdes de la lagune de Tunis par rapport à leurs témoins respectifs. Les palourdes provenant du site Z2 présentent l'activité CAT la plus élevée pendant l'automne, l'hiver et le printemps comparées aux autres sites d'échantillonnage. Une variation saisonnière de l'activité CAT a été observée chez *R. decussatus* collectée dans la lagune de Tunis et témoin. L'activité CAT la plus faible a été enregistrée en hiver pour les trois sites d'échantillonnage. Alors que l'activité la plus forte a été notée en printemps pour le site Z2 et en été pour les deux sites Z1 et Z3.

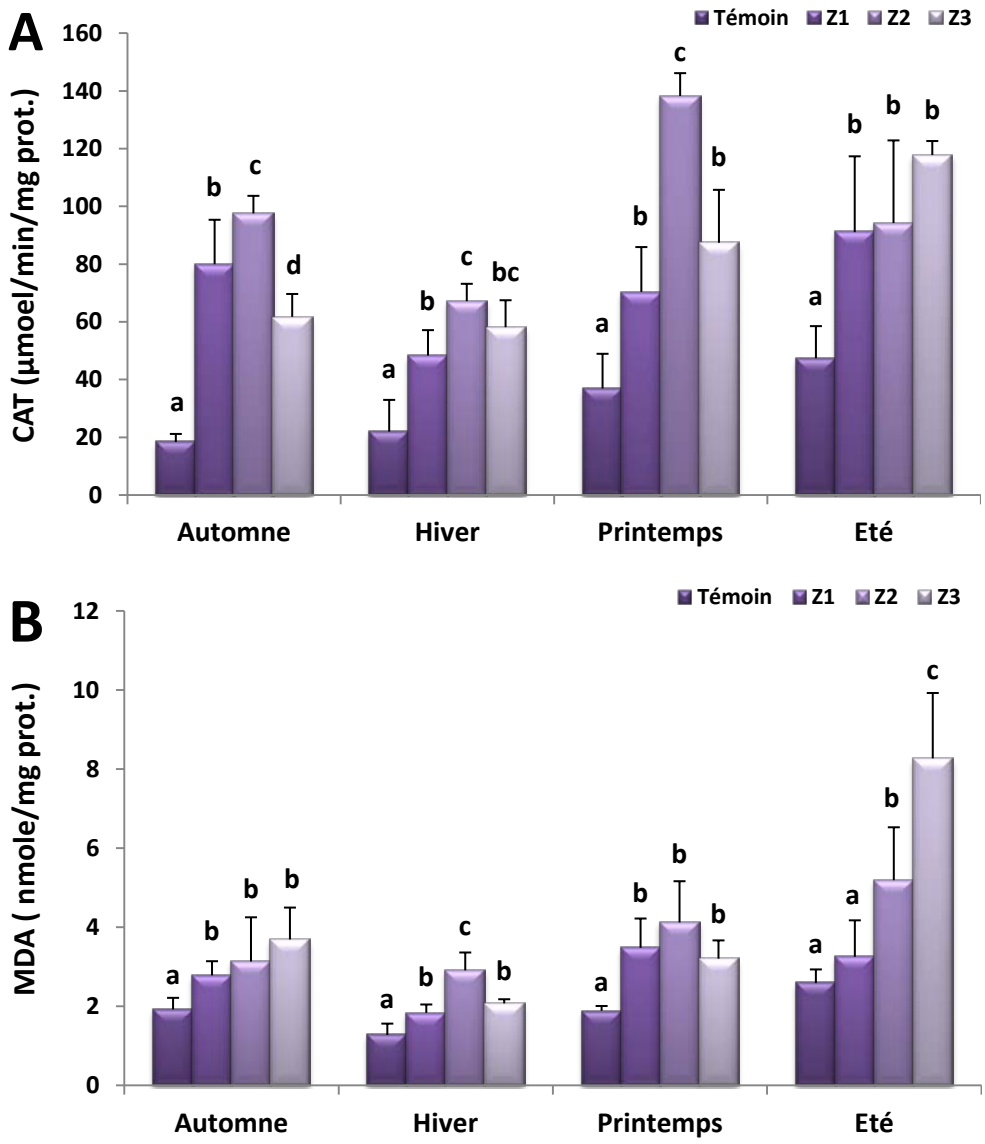


Figure 31: Variation spatio-temporelle de l'activité catalase (A) et du taux d'accumulation du malondialdéhyde (B) au niveau des branchies de la palourde *Ruditapes decussatus* collectée, saisonnièrement, dans les trois sites de la lagune de Tunis et le témoin entre septembre 2008 et août 2009. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Les différentes lettres a, b, c et d indiquent une différence significative entre les sites durant la même saison, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

Les valeurs les plus élevées du taux d'accumulation de MDA ont été enregistrées dans les branchies des palourdes collectées dans les sites Z2 et Z3 en été avec une augmentation respectivement de 2 fois et 3,2 fois par rapport au témoin. Les palourdes provenant du site Z1 présentent les teneurs les plus faibles en MDA par rapport aux autres sites pendant l'automne, l'hiver et l'été. La teneur la plus élevée de MDA enregistrée dans le site Z1 a été observée en printemps avec une augmentation de 1,8 fois par rapport au témoin. Les résultats des taux

d'accumulation de MDA au niveau des branchies montrent une diminution des teneurs en hiver alors que les teneurs les plus élevées ont été enregistrées en été.

5.1.3. L'activité acétylcholinestérase (AChE) : biomarqueur de neurotoxicité

La figure 32 présente les résultats de suivi de l'activité acétylcholinestérase (AChE) au niveau des branchies de la palourde *Ruditapes decussatus* collectée dans la lagune de Tunis et les témoins. L'activité AChE est significativement inhibée chez les palourdes provenant de la lagune de Tunis par rapport au témoin pendant les différents saisons. La plus faible inhibition de l'activité a été enregistrée dans le site Z1. L'inhibition la plus forte de l'activité AChE a été notée dans le site Z2 pendant l'hiver et le printemps et dans le site Z3 pendant l'automne et l'été. En ce qui concerne la variation temporelle, les activités AChE les plus faibles ont été enregistrées en hiver. Une absence d'une variation saisonnière significative de l'activité a été observée dans les sites Z1 et Z2 pendant les périodes d'automne, de printemps et d'été et dans le site Z3 pendant l'automne et l'été.

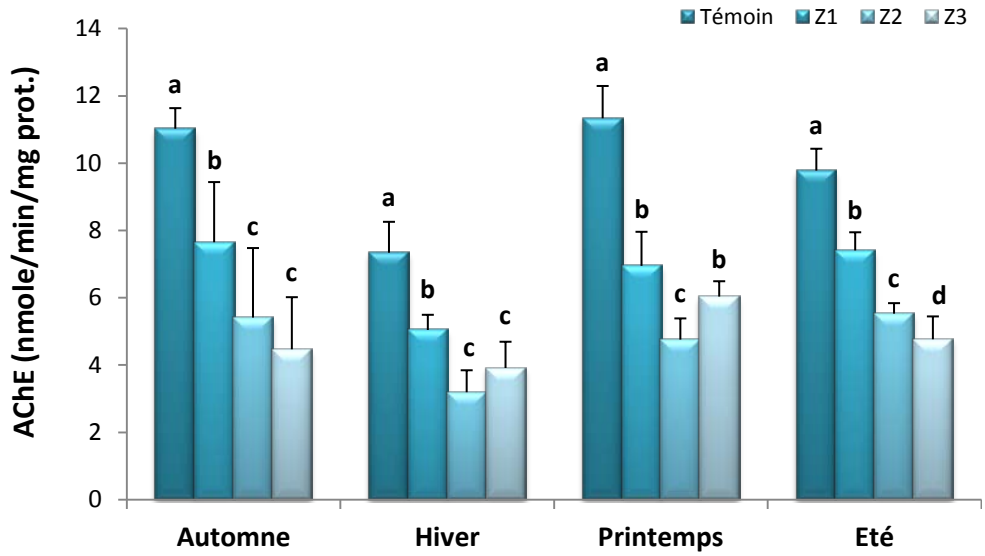


Figure 32: Variation spatio-temporelle de l'activité acétylcholinestérase au niveau des branchies de la palourde *Ruditapes decussatus* collectée saisonnièrement dans les trois sites de la lagune de Tunis et les témoins entre septembre 2008 et août 2009. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Les différentes lettres a, b, c et d indiquent une différence significative entre les sites durant la même saison, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

5.2. Evaluation des marqueurs biochimiques au niveau de la glande digestive de *R. decussatus*

5.2.1. Les biomarqueurs de métabolisation

Les biomarqueurs de métabolisation étudiés dans la glande digestive sont représentés par l'activité benzo(a)pyrène hydroxylase (BPH), impliquée dans la phase I du métabolisme de biotransformation et l'activité glutathion S-transférase (GST) impliquée dans la phase II du métabolisme de biotransformation.

Le suivi mensuel des activités BPH et GST a été réalisé dans les trois sites d'étude (Z1, Z2 et Z3) dans la lagune de Tunis (figure 33). Les activités enzymatiques de métabolisation BPH et GST chez les palourdes collectées dans Z1, Z2 et Z3 sont significativement plus élevées comparés aux témoins pendant toute la période d'étude.

Une comparaison entre les trois sites montre que le site Z1 présente l'activité BPH la plus élevée alors que le site Z3 présente l'activité la plus faible pendant la majorité des mois. L'analyse comparative inter-mensuelle montre une variabilité importante de l'activité BPH chez les palourdes durant une année d'étude avec une diminution de l'activité pendant les mois froids en atteignant des valeurs minimales en janvier et février. Toutefois, l'activité BPH augmente pendant le reste des mois et atteint des valeurs maximales en juin. En effet, l'évolution de l'activité BPH montre trois périodes distinctes. La première période de septembre à décembre illustre des activités élevées de BPH. La deuxième période, entre décembre et mars, est caractérisée par une baisse des activités BPH. Enfin, la troisième période située entre avril et août avec une augmentation de nouveau des activités BPH. De plus, la figure 33 présentant la variation de l'activité BPH montre deux courbes en cloche, la première située entre septembre et janvier avec un pic maximal en octobre alors que la deuxième courbe est située entre février et août avec un pic maximal en juin.

Pour l'activité GST, la variabilité inter-sites est moins importante comparée avec l'activité BPH. L'activité GST présente une augmentation significative dans le site Z1 pendant les mois de novembre, décembre, mai et juin comparée aux deux autres sites d'échantillonnage. Comme pour l'activité BPH, l'évolution de l'activité GST présente aussi trois périodes distinctes. La première période allant de septembre au janvier et la troisième période entre avril et août sont caractérisées par de fortes activités GST et les deux séparées par la deuxième période qui est caractérisée par une diminution des activités GST. La

variation mensuelle de la GST décrit deux courbes en cloche, l'une située entre septembre et février avec un pic d'activité maximale en décembre et l'autre située entre mars et août avec un pic d'activité en juin.

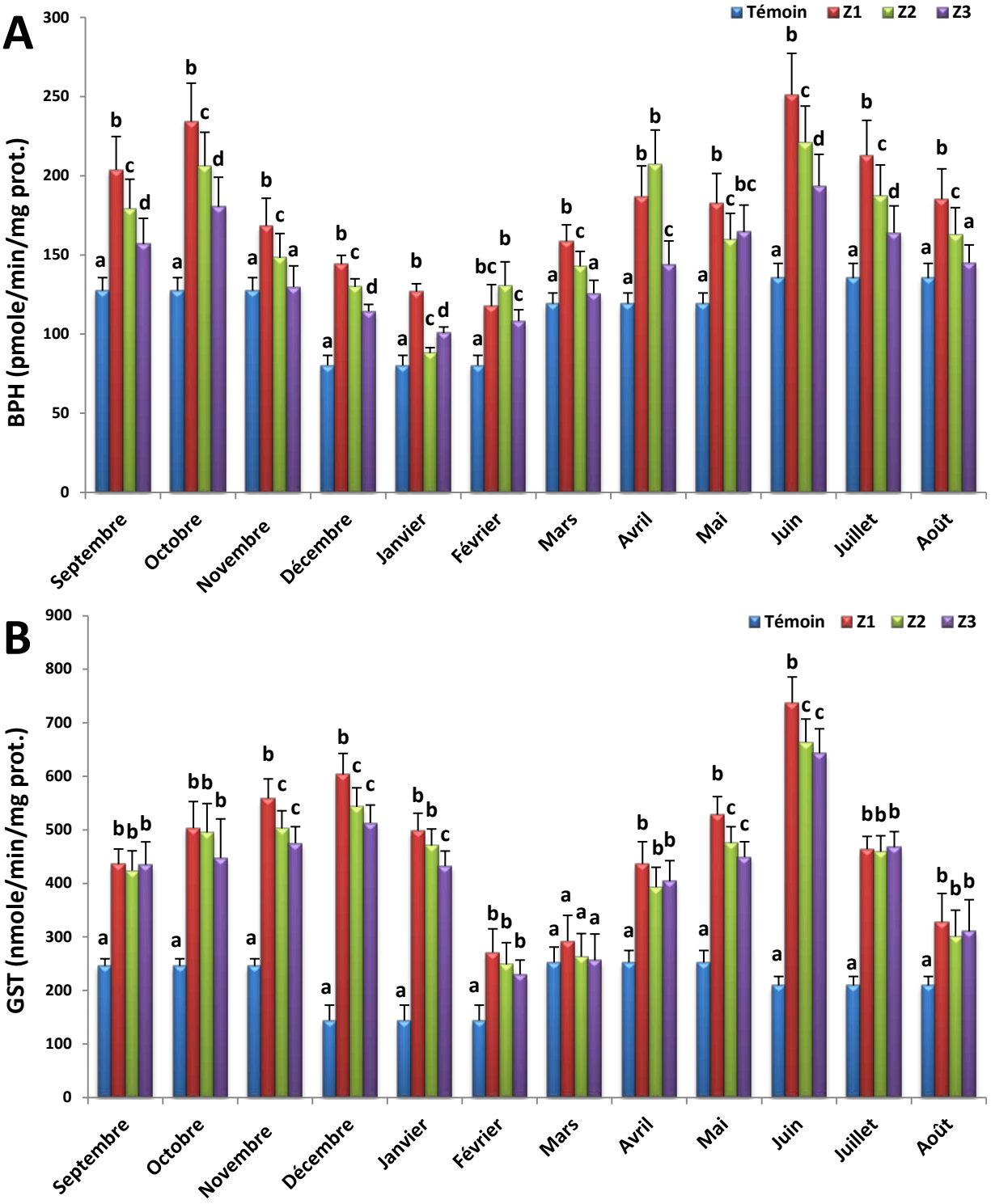


Figure 33: Variation spatio-temporelle des activités benzo(a)pyrène hydroxylase (A) et glutathion S-transférase (B) au niveau de la glande digestive de la palourde *Ruditapes decussatus* collectée dans les trois sites de la lagune de Tunis et les témoins entre septembre 2008 et août 2009. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Les différentes lettres a, b, c et d indiquent une différence significative entre les sites durant le même mois, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

5.2.2. Les biomarqueurs de stress oxydant

La variation mensuelle de l'activité catalase et du taux d'accumulation du malondialdéhyde (MDA) au niveau des glandes digestives des palourdes collectées dans les trois sites de la lagune de Tunis est rapportée dans la figure 34. Les biomarqueurs de stress oxydant étudiés (CAT et MDA) présentent une augmentation significative chez les palourdes provenant de la lagune de Tunis par rapport aux témoins pendant le cycle annuel.

L'activité CAT présente des niveaux significativement plus élevée dans le site Z1 par rapport aux autres sites durant la moitié de la période annuelle d'échantillonnage (septembre, novembre, mars, avril, mai et juin). Alors qu'il n'y a pas de différences entre les sites Z2 et Z3 pour toute l'année. L'évolution de l'activité CAT chez les palourdes de la lagune de Tunis montre des fluctuations temporelles importantes. Une comparaison inter-mois, a montré une augmentation significative de l'activité a été observée pendant les mois de septembre, octobre, décembre, mars (pour Z1), avril, mai et juin, alors qu'une diminution significative de l'activité a été notée pendant les mois de janvier, février, mars (pour Z2 et Z3), juillet et août. Les niveaux les plus faibles de l'activité CAT ont été enregistrés en août qui est caractérisé par la température la plus élevée durant la période d'échantillonnage.

Les résultats du taux d'accumulation de MDA montrent une variabilité inter-sites pendant les mois de novembre, décembre, janvier, avril, mai et juin avec un niveau plus élevé des teneurs en MDA chez les palourdes collectées dans le site Z1 comparées avec les autres sites. De même, une variation spatiale a été observée pendant les mois de février et mars avec un niveau plus faible des teneurs de MDA dans le site Z3 par rapport aux sites Z1 et Z2. L'évolution du taux d'accumulation de MDA montre deux périodes distinctes. La première période allant de septembre à mai présente une faible fluctuation des teneurs en MDA dans le site Z1 avec une légère diminution en février et une légère augmentation en novembre et mai. Pour les sites Z2 et Z3, la fluctuation pendant cette première période est plus importante marquée par une diminution significative des teneurs en MDA en janvier et février. La deuxième période, située entre juin et août, est caractérisée par une augmentation significative des teneurs en MDA dans les trois sites de la lagune de Tunis avec des valeurs maximales enregistrées en mois d'août qui correspond à une augmentation maximale de la température et une diminution maximale de l'activité CAT.

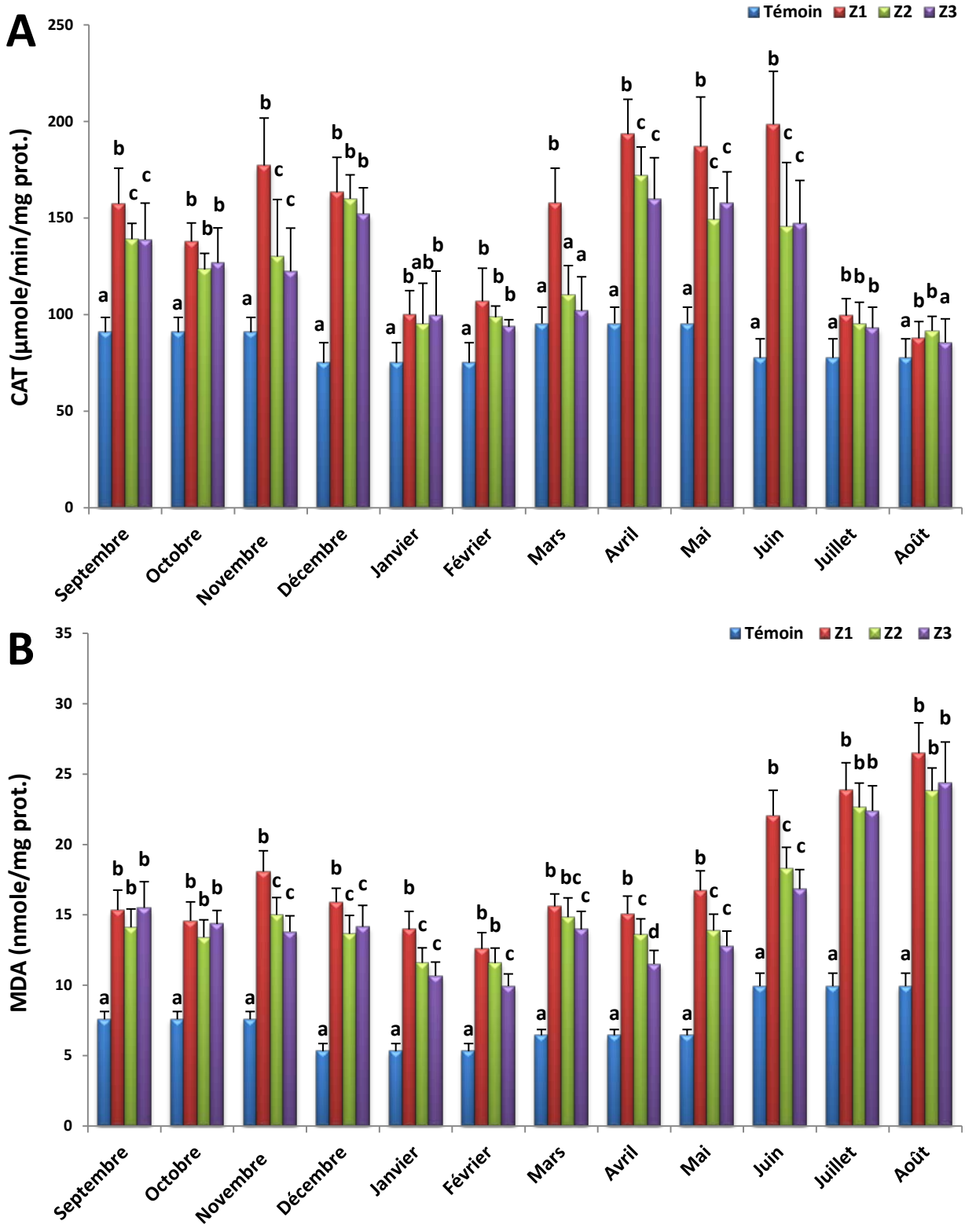


Figure 34: Variation spatio-temporelle de l'activité catalase (A) et du taux d'accumulation du malondialdéhyde (B) au niveau de la glande digestive de la palourde *Ruditapes decussatus* collectée dans les trois sites de la lagune de Tunis et les témoins entre septembre 2008 et août 2009. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Les différentes lettres a, b, c et d indiquent une différence significative entre les sites durant le même mois, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

6. ETUDE DE LA REPONSE TRANSCRIPTOMIQUE CHEZ LA PALOURDE *RUDITAPES DECUSSATUS*

L'analyse de l'expression relative de différents gènes (le gène du cytochrome c oxydase 1 (*cox1*), l'ARN ribosomique 16S (*ARNr 16S*), le gène du superoxyde dismutase cytosolique (*Cu/Zn-sod*), le gène des protéines de choc thermique 70 kDa (heat shock proteins 70, *hsp70*) et le gène des métallothionéines (*mt*)) codant pour des protéines impliqués dans le métabolisme mitochondrial, le système de défense antioxydant, la réparation et la protection des protéines et le système de détoxication, a été réalisée au niveau des branchies et de la glande digestive de *Ruditapes decussatus* collectée dans la lagune de Tunis pendant le printemps en utilisant la RT-PCR en temps réel.

6.1. Expression génétique relative au niveau des branchies

Les expressions relatives des différents gènes (*cox1, ARNr 16S, sod*, *hsp70* et *mt*) au niveau des branchies de *Ruditapes decussatus* collectée dans les trois sites de la lagune de Tunis pendant le printemps sont rapportées dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII : Expression relative des gènes étudiés au niveau des branchies de *Ruditapes decussatus* collectée dans les trois sites de la lagune de Tunis et témoin en printemps.

	Métabolisme mitochondrial		Réponse au stress oxydant	Réparation et protection des protéines	Détoxification
Site	***cox1***	***ARNr 16S***	***sod***	***hsp70***	***mt***
Témoin	0,46 ± 0,08 a	2,9 ± 0,6 a	(0,45 ± 0,09) $.10^{-3}$ a	(0,20 ± 0,04) $.10^{-5}$ a	(0,6 ± 0,2) $.10^{-6}$ a
Z1	8,0 ± 0,9 b	24 ± 4 b	(2,9 ± 0,6) $.10^{-3}$ b	(2,0 ± 0,4) $.10^{-5}$ b	(4,5 ± 0,5) $.10^{-6}$ b
Z2	10 ± 1 b	32 ± 6 b	(7,4 ± 0,5) $.10^{-3}$ c	(8,0 ± 0,9) $.10^{-5}$ c	(9,3 ± 0,8) $.10^{-6}$ c
Z3	9 ± 2 b	29 ± 5 b	(4,2 ± 0,8) $.10^{-3}$ b	(3,5 ± 0,8) $.10^{-5}$ b	(3,6 ± 0,9) $.10^{-6}$ b

Expression des gènes a été normalisée par rapport à *ARNr 18S* (moyenne ± SEM, $n = 5$). différentes lettres a, b, c et d indiquent une différence significative entre les sites, selon ANOVA et le test de Duncan, $p < 0,05$.

Une induction des expressions relatives des gènes *cox1* et *ARNr 16S* a été observée au niveau des branchies de *R. decussatus* collectée dans les différents sites de la lagune de Tunis comparée au témoin, sans noter de différences significatives entre les trois sites d'échantillonnage. Les facteurs d'expression relative (FER) par rapport au témoin calculés pour les gènes *cox1* et *ARNr 16S*, impliqués dans la respiration mitochondriale, sont respectivement de l'ordre de 17, 22 et 19 fois (*cox1*) et de 8, 11 et 10 fois (*ARNr 16S*) dans les

sites Z1, Z2 et Z3. De même, une induction de l'expression relative des gènes *sod*, *hsp70* et *mt* chez les palourdes provenant de la lagune par rapport au témoin, avec des taux d'expression significativement plus élevés dans le site Z2 comparé aux sites Z1 et Z3. Les FER déterminés pour le gène *sod* sont respectivement de l'ordre de 6, 16, et 9 fois, pour le gène *hsp70*, de l'ordre de 10, 41, et 18 fois et pour le gène *mt*, de l'ordre de 7, 15 et 6 fois dans les sites Z1, Z2 et Z3.

6.2. Expression génétique relative au niveau de la glande digestive

Le tableau XIX présente l'expression génétique relative des cinq gènes étudiés (*cox1, ARNr 16S, sod, hsp70, mt)* au niveau de la glande digestive de *Ruditapes decussatus* collectée dans la lagune de Tunis.

Tableau XIX : Expression relative des gènes étudiés au niveau de la glande digestive de *Ruditapes decussatus* collectée dans les trois sites de la lagune de Tunis et témoin en printemps.

	Métabolisme mitochondrial		Réponse au stress oxydant	Réparation et protection des protéines	Détoxification
Site	***cox1***	***ARNr 16S***	***sod***	***hsp70***	***mt***
Témoin	0,08 ± 0,02 a	1,46 ± 0,28 a	$(2,2 \pm 0,4) .10^{-4}$ a	$(0,30 \pm 0,09) .10^{-4}$ a	$(0,1 \pm 0,03) .10^{-6}$ a
Z1	1,07 ± 0,1 b	7,89 ± 1,14 b	$(16,8 \pm 5,4) .10^{-4}$ b	$(10,7 \pm 2,3) .10^{-4}$ b	$(0,77 \pm 0,07) .10^{-6}$ bc
Z2	1,15 ± 0,14 b	5,88 ± 1,68 b	$(18,4 \pm 6,4) .10^{-4}$ b	$(9,7 \pm 1,1) .10^{-4}$ b	$(1,16 \pm 0,28) .10^{-6}$ b
Z3	0,58 ± 0,14 c	5,21 ± 1,04 b	$(7,3 \pm 0,8) .10^{-4}$ b	$(5,1 \pm 0,7) .10^{-4}$ c	$(0,50 \pm 0,05) .10^{-6}$ c

Expression des gènes a été normalisée par rapport à *ARNr 18S* (moyenne ± SEM, $n = 5$). différentes lettres a, b, c et d indiquent une différence significative entre les sites, selon ANOVA et le test de Duncan, $p < 0,05$.

Les cinq gènes sont surexprimés chez les palourdes provenant des sites de la lagune de Tunis comparés au témoin. Concernant le gène *cox1*, une différence significative entre les sites Z1 et Z2 par rapport au site Z3 a été enregistré, avec des FER de l'ordre de 13, 14 et 7 fois, respectivement. Le gène *hsp70* est significativement surexprimé au niveau des sites Z1 et Z2 par rapport au site Z3, avec des FER (facteurs d'expression relative) de l'ordre de 35, 32 et 17 fois, respectivement. Le gène *mt* est sous-exprimé au niveau du site Z3 par rapport au site Z2, avec des FER de l'ordre de 9 et 3 fois, respectivement. Les expressions des gènes *ARNr 16S* et *sod* ne montrent aucune différence significative entre les trois sites d'échantillonnage.

7. ETUDE DES REPONSES HISTOPATHOLOGIQUES CHEZ LA PALOURDE *RUDITAPES DECUSSATUS*

7.1. Les altérations histopathologiques au niveau des branchies

Les altérations histopathologiques au niveau des branchies des palourdes collectées dans la lagune de Tunis sont illustrées dans la figure 35.

Les palourdes témoins présentent des branchies normales avec des lamelles branchiales (LB) bien définies et arrangées uniformément. Les lamelles sont constituées d'une seule couche de cellules épithéliales de différents types attachées à un tissu chitineux de soutien (TCS). La membrane épithéliale des lamelles est formée par des cellules ciliées (cils frontaux, CF et cils latéraux, CL) entre lesquelles des cellules muqueuses caliciformes (CMC) ou mucocytes sont intercalées. Au niveau des lamelles branchiales des témoins de rares cas d'érosion ciliaire ont été observés contrairement aux palourdes collectées dans la lagune de Tunis. La partie centrale des lamelles est constituée d'un tissu conjonctif fibreux ou vésiculeux où se trouvent des hémocytes, des fibres musculaires et les structures chitineuses de soutien. Les sinus hémolymphatiques des branchies non endommagées contiennent un nombre optimal des hémocytes. Les branchies des témoins présentent, dans certains cas, une infiltration modérée des hémocytes (figure 35 A, B et C).

Les altérations les plus fréquentes observées chez les palourdes collectées dans les trois sites de la lagune de Tunis consistent en une inflammation des branchies révélée par des degrés variables d'infiltration hémocytaire. Les branchies les plus endommagés chez les palourdes provenant des sites Z2 et Z3 montrent des inflammations répondues manifestés par des infiltrations hémocytaires étendues (figure 35 H et L). Les palourdes provenant des trois sites de la lagune de Tunis présentent différents lésions histologiques au niveau des lamelles branchiales, y compris l'érosion ciliaire (EC) (figure 35 E, G, K et N), la fusion des lamelles (FL) (figure 35 D, E et F), des malformations (MF) à l'extrémité des lamelles (figure 35 D et J) et l'altération de l'épithélium (AE) (figure 35 E, F, G, K et L). Des altérations aiguës des lamelles (AL), caractérisées par une destruction et disparition totale de l'épithélium, ont été observées au niveau des branchies des palourdes collectées dans la lagune (figure 35 E, H, I, L et M). Les lésions AL sont plus fréquentes chez les palourdes provenant des sites Z2 et Z3. Le développement d'un fibrome (figure 35 L) a été observé chez quelques individus causant ainsi une grave lésion chez les palourdes des sites Z2 et Z3.

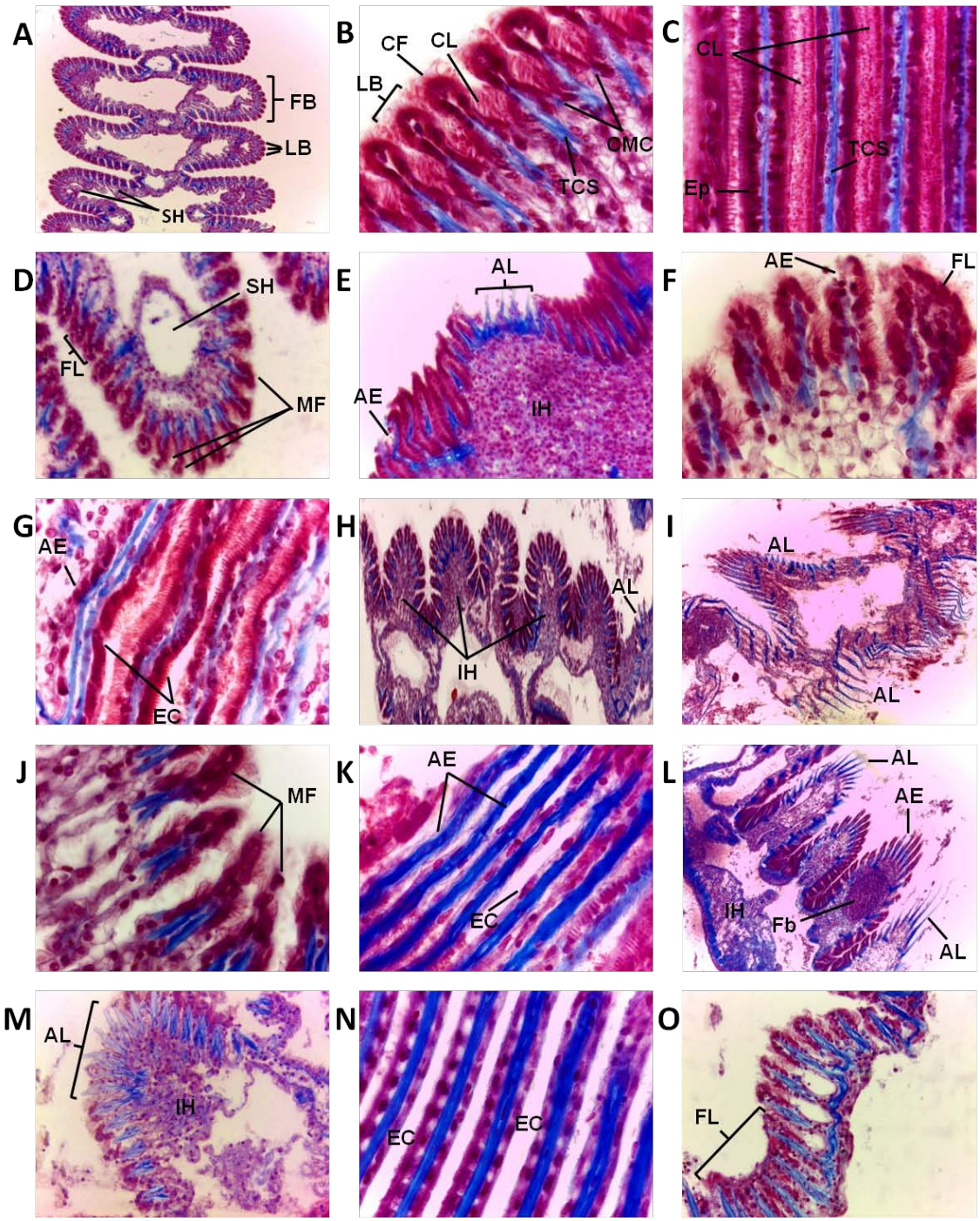


Figure 35: Observations microscopiques des branchies de *R. decussatus* collectées dans la lagune de Tunis et témoins pendant le printemps. Coloration au Trichrome de Masson. (**A-B-C**) Coupe histologique des branchies témoins. Structure normale des branchies présentant un arrangement uniforme des filaments (FB) et des lamelles branchiales (LB) avec des cils frontaux (CF) et latéraux (CL) et un épithélium lamellaire intact. SH: sinus hémolymphatique. TCS: Tissu chitineux de soutien. CMC: cellule muqueuse caliciforme (**A**, *G*×100; **B**, **C**, *G*×1000).
(**D-E-F-G**) Altérations de l'histoarchitecture des branchies de *R. decussatus* du site Z1. Infiltration hémocytaire (HI), fusion des lamelles (FL), malformation (MF) des extrémités des lamelles, altération de l'épithélium lamellaire (AE), érosion ciliaire des lamelles (EC) et altération des lamelles branchiales (AL) (**D**, **E**, *G*×400; **F**, **G**, *G*×1000).
(**H-I-J-K**) Altérations de l'histoarchitecture des branchies de *R. decussatus* du site Z2. Infiltration hémocytaire (HI) diffuse dans les filaments branchiaux, malformation (MF) des extrémités des lamelles, altération de l'épithélium lamellaire (AE), érosion ciliaire des lamelles (CE) et altération des lamelles branchiales (AL) (**H**, **I**, *G*×100; **J**, **K**, *G*×1000).

(**L-M-N-O**) Altérations de l'histoarchitecture des branchies de *R. decussatus* du site Z3. Altération de l'épithélium lamellaire (AE), érosion ciliaire des lamelles (EC), fusion des lamelles (FL), altération des lamelles (AL), infiltration hémocytaire (IH) diffuse dans les filaments branchiales et formation d'une fibrose (Fb) (**L**, *G*×100; **M**, **O**, *G*×400; **N**, *G*×1000).

L'intensité de chaque lésion au niveau des branchies des palourdes et l'indice de dommages (ID) sont présentés dans le tableau XX. En effet, l'infiltration hémocytaire, l'altération des lamelles, l'érosion des cils lamellaire étaient plus fréquentes dans les sites Z2 et Z3 par rapport à Z1. L'altération de l'épithélium lamellaire était plus abondante au niveau du site Z2. La fusion des lamelles et la malformation des extrémités des lamelles étaient plus fréquentes chez les palourdes collectées dans le site Z1. La formation de fibroses n'a été observée que chez les palourdes provenant des sites Z2 et Z3. Concernant l'indice de dommages (ID), le site Z2 présentait l'ID le plus élevé (2,21) alors que le site Z1 présentait l'ID le plus faible (1,43).

Tableau XX : Intensité des altérations histopathologiques au niveau des branchies de *R. decussatus* collectée dans lagune de Tunis et le témoin.

	Témoin	Z1	Z2	Z3
Infiltration hémocytaire (IH)	+/-	++	+++	+++
Altération de l'épithélium lamellaire (AE)	-	++	+++	++
Erosion ciliaire (EC)	+/-	+	+++	++
Altération des lamelles (AL)	-	+	+++	++
Malformation des extrémités des lamelles (MF)	-	++	++	+
Fusion des lamelles (FL)	-	++	+	+
Fibrose (Fb)	-	-	+/-	+/-
Indice de dommages	0,14	1,43	2,21	1,64

Incidence des lésions: (-) absent, (+/-) parfois, (+) fréquent, (++) très fréquent, (+++) toujours présent.

7.2. Les altérations histopathologiques au niveau de la glande digestive

Les altérations histopathologiques au niveau des glandes digestives des palourdes collectées dans la lagune de Tunis pendant le printemps sont illustrées dans la figure 36.

L'histoarchitecture normale de la glande digestive du témoin consiste en de nombreux tubules digestifs (TD) formés par une seule couche de cellules épithéliales ciliées, avec une lumière (Lu) étroite au centre des tubules. Il y a différents types de cellules épithéliales : les

cellules digestives (CD), reconnaissables grâce à leurs nombreuses vacuoles claires, occupent la partie centrale des tubules et les cellules sécrétrices basophiles (CSB), caractérisées par un aspect pyramidal et sombre, sont regroupées aux deux extrémités des tubules digestives. Le tissu interstitiel (TI) péritubulaire normal est formé par quelques fibrocytes et hémocytes (figure 36 A, B et C).

La glande digestive de *Ruditapes decussatus* collectée dans différents sites de la lagune de Tunis pendant le printemps présente une fragmentation du cytoplasme apical (FCA) (figure 36 D, E, G, H, K et O), un rétrécissement des cellules épithéliales (RE) (figure 36 D, E, G, J, K, L et M), une dilatation de la lumière (LD) (figure 36 D, E, F, H, J, K, L et M) contenant occasionnellement des débris cellulaires (DC) (figure 36 D, E, G, L et M). Des infiltrations hémocytaires (IH) dans le tissu interstitiel péritubulaire ont été observées au niveau des glandes digestives endommagées indiquant la présence d'une réponse inflammatoire (figure 36 E, F, I, M et N). Chez plusieurs individus provenant de la lagune une rupture de la lame basale (RLB) (figure 36 D, E, G et O) a été observée, ainsi que la formation de nécroses des tubules (NT) contenant des débris cellulaires (DC) dans la lumière (figure 36 D et N) et de nécroses cellulaires (NC) (figure 36 D, G, K et O). Quelques individus provenant du site Z1 et Z2 présentent des glandes digestives sévèrement endommagées avec une formation de fibrose (Fb) (figure 36 F).

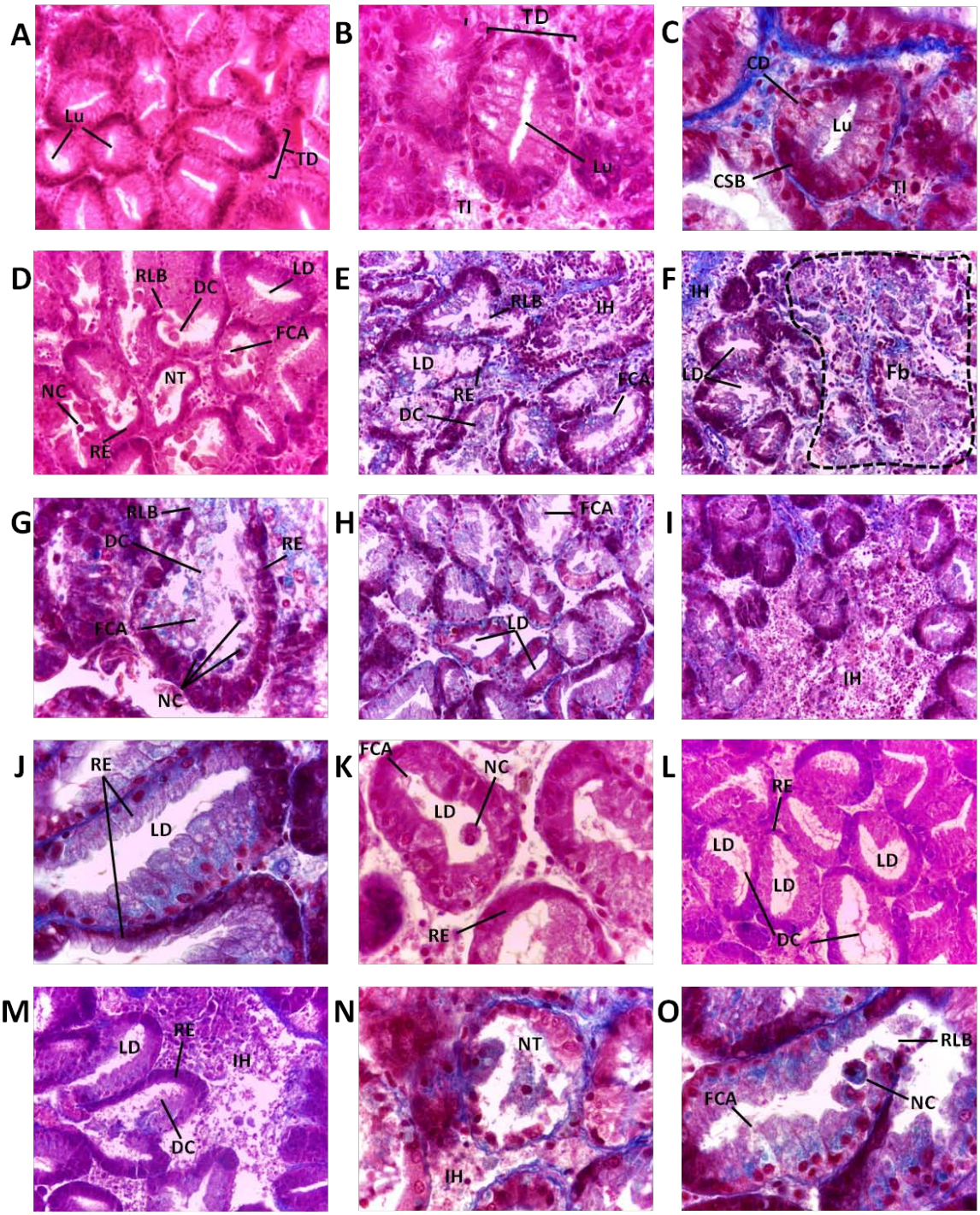


Figure 36: Observations microscopiques de la glande digestive de *R. decussatus* collectées dans la lagune de Tunis et témoins pendant le printemps. Colorations à l'Hématoxyline-Eosine (**A**, **B**, **D**, **K** et **L**) et au Trichrome de Masson (**C**, **E**, **F**, **G**, **H**, **I**, **J**, **M**, **N** et **O**). (**A-B-C**) Coupe histologique de la glande digestive témoin. Une structure normale de la glande digestive montrant des tubules digestifs (TD) constitués d'une seule couche de cellules épithéliales, les cellules digestives (CD) et les cellules sécrétrices basophiles (CSB). La lumière (Lu) du tubule est étroite ou presque close. Le tissu interstitiel (TI), entre les tubules, est composé de cellules (fibrocytes et hémocytes) (**A**, *G*×400; **B**, **C**, *G*×1000).

(**D-E-F-G**) Altérations de l'histoarchitecture de la glande digestive de *R. decussatus* du site Z1. Les tubules présentent une lumière dilatée (LD) contenant généralement des débris cellulaires (DC), un rétrécissement épithélial (RE), une fragmentation du cytoplasme apical (FCA), une rupture de la lame basale (RLB) et des nécroses cellulaires (NC) et tubulaires (NT). Présence d'infiltration hémocytaire (IH) dans le tissu interstitiel et la formation de fibrose (Fb) dans les glandes digestives sévèrement affectés (**D**, **E**, **F**, *G*×400; **G**, *G*×1000).

(**H-I-J-K**) Altérations de l'histoarchitecture de la glande digestive de *R. decussatus* du site Z2. Dilatation de la lumière tubulaire (LD), fragmentation du cytoplasme apical (FCA), rétrécissement épithélial (RE) au niveau des tubules, formation de nécrose cellulaire (NC) et infiltration hémocytaire dans le tissu interstitiel (IH) (**H**, **I**, *G*×40; **J**, **K**, *G*×1000).
(**L-M-N-O**) Altérations de l'histoarchitecture de la glande digestive de *R. decussatus* du site Z3. Tubules avec lumière dilatée (LD) contenant des débris cellulaires (DC), rétrécissement épithélial (RE) des tubules, fragmentation du cytoplasme apical (FCA), rupture de la lame basale (RLB), formation des nécroses cellulaires (NC) et tubulaires (NT) et infiltration hémocytaire (HI) (**L**, **M**, *G*×40; **N**, **O**, *G*×100).

L'intensité de chaque lésion au niveau des glandes digestives des palourdes et l'indice de dommages (ID) sont présentés dans le tableau XXI. Nous avons observé que l'infiltration hémocytaire a été toujours présente au niveau des trois sites. Les altérations concernant la dilatation de la lumière des tubules, la fragmentation du cytoplasme apical, le rétrécissement des cellules épithéliales et la formation des débris cellulaires étaient plus fréquentes au niveau des sites Z1 et Z2 par rapport à Z3. La rupture de la lame basale, les nécroses cellulaire et tubulaire et les fibroses étaient plus abondantes au niveau du site Z1 par rapport aux autres sites (Z2 et Z3).

Tableau XXI : Intensité des altérations histopathologiques au niveau de la glande digestive de *R. decussatus* collectée dans lagune de Tunis et le témoin.

	Témoin	Z1	Z2	Z3
Infiltration hémocytaire (IH)	+/-	+++	+++	+++
Lumière dilatée (LD)	+/-	+++	+++	++
Fragmentation du cytoplasme apical (FCA)	-	+++	+++	++
Rétrécissement des cellules épithéliales (RE)	-	++	++	+
Débris cellulaires (DC)	-	+++	+++	+
Rupture de la lame basale (RLB)	-	++	+	+
Nécrose cellulaire (NC)	-	+++	++	++
Nécrose des tubules (NT)	-	++	+	+
Fibrose (Fb)	-	+	+/-	-
Indice de dommages	0,11	2,44	2,05	1,44

Incidence des lésions: (-) absent, (+/-) parfois, (+) fréquent, (++) très fréquent, (+++) toujours présent.

8. DISCUSSION

8.1. Contamination des sédiments par les HAPs et les métaux traces

Dans le but de caractériser la qualité physico-chimique de la lagune de Tunis, un suivi mensuel de la température, la salinité et le pH a été réalisé sur la période allant de septembre 2008 à août 2009. Les six sites de la lagune de Tunis ne montrent pas de différences significatives des paramètres physico-chimiques. Cependant, ce travail montre une fluctuation temporelle significative, plus marquée entre les saisons, des trois paramètres abiotiques étudiés. Les saisons d'été et d'automne présentent les températures et les salinités les plus élevées avec des pics en août et en septembre. Alors que la saison hivernale présente les températures et les salinités minimales. La variation temporelle de pH est moins importante, avec des pH maximales en février et minimales en septembre. Globalement, ces fluctuations temporelles concordent bien avec le climat de la Tunisie qui est de type méditerranéen caractérisé par l'alternance entre une saison sèche et chaude, l'été et une saison fraîche et humide, l'hiver (tableau X).

L'analyse chimique des sédiments a un rôle important dans le suivi de l'état de pollution de l'environnement marin (Bellucci et al., 2002), car ils représentent un réservoir dans lequel s'accumulent les divers contaminants marins. Nos résultats ont montré une contamination plus élevée par les HAPs totaux au niveau des sédiments superficiels de la lagune de Tunis par rapport aux sédiments du site de référence (Louza), due à la présence de plusieurs sources de pollution aux alentours de la lagune comme le port commercial de Radès, le port de La Goulette destiné au trafic des passagers, le canal de navigation, les industries pétrochimiques, la centrale électrique de Radès et les effluents urbains de la ville de Tunis (tableau XII). A cause de leur caractère hydrophobe, les HAPs ont tendance à s'adsorber aux particules en suspension et à s'accumuler dans les sédiments (Bertrand et Mille, 1989). L'adsorption des hydrocarbures au niveau des sédiments les rend plus stables et moins accessibles à la biodégradation par les micro-organismes. Ainsi, ces polluants peuvent persister dans les sédiments plusieurs mois voire plusieurs années. Les sédiments sont considérés à l'heure actuelle comme de véritables réservoirs des HAPs (Djomo et al., 1995; Baumard et al., 1998).

Une comparaison inter-sites montre que le site S4 est le plus contaminé par les HAPs, ce qui peut être dû à sa localisation près de la zone industrielle qui comporte plusieurs industries pétrochimiques et du canal de navigation qui assure le trafic des bateaux entre le

plus important port commercial en Tunisie et la Méditerrané. Le site de référence, choisi dans cette étude, est relativement contaminé par les HAPs malgré qu'il soit localisé dans une région caractérisée par l'absence des industries et des ports. Ces HAPs peuvent résulter du dépôt atmosphérique sec ou humide, et par conséquent, ils seront transférés aux sédiments à travers la colonne d'eau. En effet, les HAPs peuvent être transportés sur de longues distances dans l'atmosphère et ils peuvent contaminer ainsi des sites localisés loin de leurs sources d'émission par dépôt sec ou humide (Neff, 1979 ; Bjorseth et Olufsen, 1983). Une autre hypothèse expliquant la présence des HAPs dans le site de référence serait une possibilité de l'extension de la contamination marine à partir d'autres région plus contaminées, qui peut être dans notre cas la région de Sfax localisée au sud de Louza et caractérisée par des activités industrielles intenses. A l'échelle nationale, la lagune de Tunis présente des teneurs sédimentaires en HAPs plus élevées comparées à celles trouvées dans la lagune de Bizerte avec des valeurs comprises entre 83 et 447 ng/g poids sec (Trabelsi et Driss, 2005). Les concentrations des HAPs sédimentaires enregistrés dans ce travail sont similaires à celles enregistrées dans des sites localisés sur les côtes méditerranéennes de la région de Jarzouna et situés au voisinage du point de rejet d'une raffinerie, présentant des concentrations allant de 916 à 4541 ng/g poids ses (Zrafi-Nouira et al., 2010). A l'échelle internationale et dans le bassin méditerranéen, des teneurs en HAPs plus faibles que celles présentées dans ce travail ont été enregistrées dans les la lagune de Marano et Grado (Italie), avec des valeurs comprises entre 50 et 1026 ng/g poids sec (Acquavita et al., 2014). Une fluctuation temporelle des concentrations des HAPs totaux dans les sédiments de la lagune de Tunis a été observé mais sans pouvoir déceler un profil d'évolution claire (tableau XII), ce qui suggère que ces variations temporelles sont dues à la variation des apports anthropiques des HAPs. Dans les sédiments de la lagune de Tunis, les 24 HAPs ont été détectés, même les HAPs qui sont connus pour être extrêmement volatils tels que le naphtalène et ses dérivés ont été détecté. Ceci suggère que la lagune est continuellement soumise à une contamination par les HAPs. De plus, la présence du naphtalène dans les sédiments témoigne d'une contribution pétrogénique. La présence du chrysène dans les trois sites d'échantillonnage pendant les trois saisons peuvent être associées à l'effet de la décomposition chimique du pétrole brut. Le chrysène est considéré comme étant un composé conservé du pétrole et peut être choisi comme un bon indicateur des produits pétroliers à cause de sa résistance à la décomposition et la biodégradation (Wang et Fingas, 2003). L'analyse du nombre de cycles des HAPs a, historiquement, été employée par les géochimistes des pétroles dans la caractérisation des sources des pétroles déversés. Les sources pétrolières contiennent en général, des

concentrations relativement plus élevées des HAPs de bas poids moléculaire (Tolosa et al., 1996), tandis qu'une grande proportion des HAPs de haut poids moléculaire est une caractéristique typique des origines de combustion (Budzinski et al., 1997). L'analyse des HAPs individuels présents dans les sédiments de la lagune de Tunis, a montré la prédominance des HAPs de hauts poids moléculaires, ce qui implique une origine pyrolytique des HAPs présents dans les sédiments.

Les sources des HAPs dans l'environnement sont diverses, ainsi un certain nombre de rapports de diagnostique des HAPs ont été développés afin de pouvoir identifier la source principale d'une contamination en HAPs dans les échantillons environnementaux (Yunker et al., 2002) (tableau XIII). Les rapports diagnostiques utilisés dans cette étude pour identifier les sources des HAPs dans les sédiments suggèrent la prédominance de la source de combustion ou pyrolytique des HAPs présents dans les sédiments de la lagune. Ces rapports indiquent aussi que les sites S1 (automne et hiver) et S2 (automne) sont caractérisés par des contaminations mixtes à la fois pyrolytiques et pétrogéniques. Le rapport (IP/IP + B[ghi]Pér) a montré que la plupart des échantillons de sédiments prélevés dans la lagune de Tunis sont contaminés par des HAPs provenant de la combustion des fiouls et du pétrole brut.

Concernant les contaminants métalliques, les teneurs des métaux traces dans les sédiments superficiels de la lagune de Tunis sont plus élevées que dans les sédiments de Louza (référence), due à la présence de plusieurs sources de pollution aux alentours de la lagune (tableau XVI). Les sédiments des sites S1, S2 et S4 sont les sites les plus contaminés par les métaux traces. Pour le Pb, les sources principales de contamination sont les eaux usées, les activités industrielles et le pétrole brut (Literathy, 1993). Les sédiments avec des concentrations de Pb supérieurs à 6 ppm peuvent être considérés comme contaminés (Langston, 1990), ainsi les sédiments de la lagune de Tunis sont fortement contaminés par le Pb. Le V est un métal lié au pétrole car il existe principalement sous une forme organométallique dans le pétrole brut et peut être utilisé ainsi comme un marqueur d'une contamination par les hydrocarbures. Les teneurs de V déterminées dans les sédiments de la lagune sont largement supérieurs aux teneurs enregistrés dans des sédiments prélevés à partir d'un site fortement contaminé dans l'Arabie Saoudite après un an du déversement du pétrole survenu lors de la guerre du Golf (Al-Arfaj et Alam, 1993). Dans ce travail, la forte contamination des sédiments par le V n'est pas due au simple trafic des navires mais semble plutôt être le résultat de déversement de pétrole dans le milieu lagunaire. De plus, nous avons considéré que les concentrations de Hg sont élevées dans les sites proches de la centrale

électrique de Radès (S2 et S3) alors qu'elles diminuent en s'éloignant de la centrale (tableau XVI). Ainsi, la centrale électrique peut être considérée comme la source principale de contamination par le Hg dans la lagune.

Une variation saisonnière des teneurs en métaux traces dans les sédiments de la lagune sans pouvoir déterminer un profil temporel claire. Cette variation saisonnière peut être liée aux fluctuations des paramètres physico-chimiques du milieu, exceptionnellement la salinité de l'eau, qui peut agir sur l'adsorption des métaux aux particules sédimentaires (Maest et al., 1990 ; Ettajani et Amiard, 1995). Elle peut être liée aussi à la variabilité naturelle des caractéristiques des sédiments entre les saisons, comme elle peut être due à la variabilité des apports anthropiques et/ou naturels (Cheggour et al., 2005). La présence d'une faible variation saisonnière des teneurs en métaux dans les sédiments de la lagune de Tunis et l'absence d'une évolution saisonnière marquante implique la dominance de l'impact anthropique.

8.2. Contamination de *R. decussatus* par les HAPs et les métaux traces

La palourde *Ruditapes decussatus* est un mollusque filtreur représentant une ressource économique et écologique importante dans les écosystèmes côtiers lagunaires. Cet organisme a été largement utilisé en tant qu'espèce bioindicatrice de la pollution en raison de sa capacité d'accumuler les contaminants dans ses tissus à partir du milieu environnant (Bebianno et al., 2004). Les palourdes collectées dans les sites de la lagune de Tunis présentent des teneurs en HAPs totaux plus élevées que celles enregistrées chez les palourdes témoins ce qui implique la biodisponibilité des HAPs présents dans le milieu environnant pour ces organismes (tableau XIV). Une comparaison intersites montre une variation spatiale significative des teneurs tissulaires en HAPs totaux. Les palourdes du site Z1 présentent les teneurs les plus fortes en HAPs alors que les palourdes du site Z3 présentent les teneurs les plus faibles (à l'exception de la saison d'automne), malgré le fait que les sédiments du site S4 (correspond au site Z2 pour les palourdes) présentent les teneurs en HAPs les plus élevées. Ces résultats en plus de l'absence d'une corrélation significative entre les concentrations des HAPs totaux présentes dans les sédiments et dans les tissus des palourdes suggèrent l'absence d'une contribution directe des sédiments dans la contamination des bivalves par les HAPs. De plus, l'absence de relations entre les concentrations des HAPs totaux dans les sédiments et dans les palourdes peut refléter l'importance d'autres vecteurs tels que l'eau de mer et la nourriture dans la contamination des bivalves par les HAPs. Il a été rapporté que les HAPs dissous sont plus biodisponibles que les HAP adsorbés sur les particules sédimentaires (Neff, 1985). Nos

résultats montrent que la bioaccumulation des HAPs totaux chez la palourde *R. decussatus* de la lagune de Tunis est plus élevée par rapport aux concentrations enregistrées au niveau de la glande digestive de la moule *M. galloprovincialis* collectée dans la lagune de Bizerte (Tunisie) avec des valeurs comprises entre 190 et 2030 ng/g poids sec (Kamel, 2014). Les concentrations tissulaires des HAPs totaux trouvés dans notre travail sont aussi plus élevées que celles enregistrées chez *M. galloprovincialis* collectées dans différents sites sur les côtes méditerranéennes de l'Espagne, ces valeurs varient entre 6 et 246 ng/g poids sec (Fernández et al., 2012). Les concentrations des HAPs enregistrées dans les tissues de la moule *M. galloprovincialis* collectée dans la Baie d'Izmit (Turquie) après un incendie dans une raffinerie sont plus élevées et varient de 1,5 à 800 µg/g poids sec (Okay et al., 2003).

Nos résultats ont montré une fluctuation saisonnière des teneurs tissulaires en HAPs (tableau XIV). En effet, les palourdes ont tendance à accumuler des concentrations plus élevées de HAPs en hiver. Cette variation du niveau de bioaccumulation peut être liée indirectement aux conditions physico-chimiques du milieu. L'adsorption des HAPs aux particules en suspension et la sédimentation aboutit à l'incorporation et au piégeage de ces composés chimiques dans les sédiments ce qui diminue leur biodisponibilité pour les organismes (James et Kleinow, 1994). Ainsi, plus l'HAP est soluble dans l'eau plus il est biodisponible. Tremblay et al. (2005) ont observé une augmentation de 40 à 64% de la fraction de HAPs liés aux matières en suspension avec des salinités croissantes. Dans notre étude, l'augmentation du niveau d'accumulation des HAPs chez les palourdes en hiver peut être due à la diminution de la salinité de l'eau de mer pendant cette période. Cependant, la teneur tissulaire élevée en HAPs totaux enregistrée chez les palourdes collectées dans le site Z1 en été peut être due à une augmentation des apports anthropiques de HAPs dans ce site. La diminution significative des concentrations tissulaires des HAPs en automne peut être due au processus de la ponte chez la palourde qui aboutit à la diminution du taux des lipides dans lesquels s'accumulent les HAPs.

La présence de fortes concentrations de chrysène dans les tissus des palourdes indique une contamination par les produits pétroliers (origine pétrogénique). D'autre part, la prédominance des HAPs à 4-6 cycles par rapport aux HAPs à 2-3 cycles est un indice en faveur d'une origine pyrolytique. Ceci suggère une origine mixte, pétrogénique et pyrolytique, des HAPs dans la lagune de Tunis. Les deux rapports de diagnostique (Phé/An) et (An/An + Phé) suggèrent la prédominance de la source de combustion des HAPs présents dans les tissus des palourdes de la lagune de Tunis (tableau XV). Le rapport (B[a]A/[B [a]A +

Chry) indique une origine mixte des HAPs présents dans les palourdes des sites Z1 et Z2 collectée en hiver et en été. Le rapport (IP/IP + B[ghi]Pér) indique une source pétrogénique des HAPs accumulés dans les palourdes provenant du site Z2 en printemps. Ce rapport suggère aussi que les HAPs accumulés par les palourdes de la lagune de Tunis pendant les quatre saisons proviennent de la combustion des fiouls (essence, kérosène, diesel) et du pétrole brut. D'une manière générale, nos résultats montrent que les HAPs présents dans la lagune de Tunis ont une origine mixte à la fois pétrogénique et pyrolytique avec une prédominance de la source pyrolytique.

Concernant les contaminants métalliques, les palourdes collectées dans les trois sites de la lagune de Tunis présentent des concentrations métalliques plus élevées par rapport aux palourdes témoins. A l'inverse de la contamination métallique des sédiments, nos résultats montrent une faible variation spatiale des teneurs tissulaires en métaux traces (tableau XVII). Les teneurs élevées des métaux enregistrées dans les tissus mous des palourdes de la lagune de Tunis peuvent être principalement liées aux rejets des industries et de la centrale électrique dans le site Z1, au trafic maritime et aux apports industriels dans le site Z2 et aux apports du port de Radès et du trafic maritime dans le site Z3. La contamination métallique dans la lagune peut être liée aussi aux apports urbains de la ville de Tunis. La bioaccumulation d'un métal spécifique chez un organisme ne dépend pas seulement du niveau d'exposition au métal et de sa biodisponibilité dans l'environnement, mais dépend aussi des stratégies à travers lesquelles l'organisme se comporte face au métal (Luoma et Rainbow, 2008). Dans ce travail, les palourdes ont une tendance à accumuler des concentrations plus élevées de Zn, d'As, de Mn, de Ni et de Cu que des concentrations de Pb, de V, d'Ag, de Cd et de Hg. Cette différence dans l'accumulation de ces deux groupes de métaux est due au fait que les éléments métalliques de Zn, Mn, Ni et Cu sont des métaux essentiels et ils sont indispensables pour les activités métaboliques de l'organisme (Rejomon et al., 2010). Les fortes teneurs en As (métal non essentiel) et les faibles teneurs en V (métal essentiel) dans les tissus des palourdes peuvent être expliquées par la variabilité de leurs biodisponibilités dans l'environnement.

Les résultats montrent une variabilité saisonnière de l'accumulation des métaux chez les palourdes provenant de la lagune de Tunis. La majorité des métaux (As, Cd, Hg, Ni, Pb, V, Cu et Zn) présentent les concentrations les plus fortes en hiver (et en printemps pour le Hg), saison caractérisée une baisse maximale de la température et de la salinité de l'eau de mer de la lagune. Par contre, l'Ag atteint des concentrations tissulaires maximales en été alors qu'en hiver il est indétectable (tableau XVII). Les fluctuations saisonnières des teneurs

métalliques chez les palourdes sont liées aux paramètres abiotiques de l'eau de mer (températures et salinité) et aux facteurs intrinsèques qui contrôlent le cycle de croissance et l'activité de reproduction (Szefe et al., 2002 ; Saha et al., 2006). En effet, une réduction de la salinité de l'eau de mer réduit la concentration en chlorure, ainsi la complexassion des ions métalliques au chlorure sera réduite ce qui provoque une augmentation de la biodisponibilité des ions métalliques libres. Par ailleurs, si le taux d'absorption est déterminé par la biodisponibilité des ions métalliques libres dans le milieu environnant, une diminution de la salinité devrait induire donc une augmentation du taux d'absorption des métaux (Rainbow, 1997). Ceci a été confirmé par plusieurs auteurs (Chong et Wang, 2000 ; Martín-Díaz et al., 2005) en montrant une réduction de la biodisponibilité du Cd et du Zn suite à l'augmentation de la salinité. En outre, les variations saisonnières d'accumulation des métaux peuvent être liées aux variations saisonnières du cycle de reproduction et de la disponibilité de la nourriture qui conduisent, généralement, à des altérations au niveau du poids et de la composition du corps (Giarratano et al., 2011). Les palourdes provenant de la lagune de Tunis présentent une diminution des teneurs en métaux pendant la période estivale correspondant à la période de ponte chez *R. decussatus*, ce qui met en évidence l'influence naturelle de la reproduction qui réduit biologiquement les teneurs corporelles en métaux traces chez les bivalves (Giarratano et al., 2011). Mathieu et Lubet (1993) ont rapporté que les teneurs corporelles en métaux sont réduites de 30 à 60% pendant la ponte. L'augmentation des teneurs tissulaires en Ag pendant les saisons à températures modérément et hautement élevées (printemps, été et automne) peut être due à l'augmentation de la disponibilité de la nourriture dans le milieu et l'augmentation du taux de filtration chez l'animal pendant ces saisons, alors que l'absence de ce métal dans les tissus des palourdes en hiver peut être liée à la réduction de la disponibilité de la nourriture et du taux de filtration chez la palourde.

8.3. Réponse biochimique chez *R. decussatus*

L'étude des réponses biologiques chez les organismes au stress environnemental a été considérée comme une approche fructueuse pour évaluer l'état de santé d'un écosystème (Bebianno et al., 2004 ; Jebali et al., 2007 ; Banni et al., 2009a). Plusieurs auteurs ont soulignés l'importance d'utiliser différents biomarqueurs en même temps et chez les même organismes afin d'évaluer les effets des contaminants environnementaux (Bodin et al., 2004 ; Giarratano et al., 2011).

Dans ce travail, une approche multibiomarqueurs a été appliquée dans le but d'étudier les réponses biologiques chez *Ruditapes decussatus* à une contamination multiparamétrique dans la lagune de Tunis. Les réponses biologiques au niveau des branchies et de la glande digestive de *R. decussatus* ont été évaluées à différents niveaux, biochimique, génétique et tissulaire, de l'organisation cellulaire.

L'activité BPH reflète l'activité du système cytochrome P450 (CYP450) impliquée dans la phase I de métabolisation. Le processus permettant la métabolisation des polluants organiques tels que les HAPs et les PCBs par le système CYP450, se déroule principalement au niveau de la glande digestive chez les bivalves. En effet, ils sont présents dans les microsomes de la glande digestive (Peters et al., 1998). Les isoformes des cytochromes P450 responsables de l'activité BPH n'ont pas encore été identifiées chez les mollusques, mais il semblerait qu'elles soient homologues aux isoformes CYP4501A1 des vertébrés, qui ont la particularité d'être spécifiquement induites par les HAP (Mora et al., 1999). Les résultats de notre travail ont révélé une forte activité BPH au niveau de la glande digestive de *R. decussatus* de la lagune de Tunis par rapport au témoin (figure 33). Cette augmentation de l'activité dans la lagune se traduit par une forte activité de détoxication chez les palourdes liée à une exposition dans le milieu aux contaminants organiques, essentiellement les HAPs. Dans ce sens, plusieurs études, *in situ*, ont montré qu'une élévation des CYP450 chez différents bivalves est fortement associée aux concentrations des HAPs dans les tissus (Porte et al., 1991 ; Solé et al., 1994). L'étude menée par Suteau et al. (1988), a montré une augmentation de 50% de l'activité BPH chez des moules *Mytilus galloprovincialis* colectées dans des sites pollués par les HAPs dans les côtes méditerranéennes de la France par rapport aux témoins. Ces travaux sont comparables à ceux de Nasci et al. (1999), qui ont observé une augmentation de l'activité BPH chez des palourdes *Mercenaria mercenaria* transplantées dans un site contaminé par les HAP (Baie de Tampa, Florida). De même, Solé et al. (1998) ont observé une induction de l'activité BPH au niveau de la glande digestive des moules *Mytilus edulis* transplantées dans un site contaminé dans les îles de Féroé. Nos résultats sont comparables à ceux trouvés par Bebianno et Barreira (2009), qui ont enregistré une induction de l'activité BPH au niveau de la glande digestive des palourdes *Ruditapes decussatus* transplantées dans la lagune de Ria Formosa (Portugal). Michel et al. (1994) ont montré que le 3-methylcholanthrene provoque une augmentation de 63% de l'activité BPH chez les moules. De même, Akcha et al. (2000) ont montré que l'activité BPH augmente en exposant des moules, au laboratoire, au benzo(a)pyrène. Des travaux plus récentes, ont montré qu'une

augmentation de l'activité BPH chez des moules *Mytilus galloprovincialis* collectées dans la lagune de Bizerte est fortement liée aux concentrations des HAPs dans leurs glandes digestives (Kamel et al., 2014).

Les glutathion S-transférases GST sont des enzymes du métabolisme de détoxication de phase II capables de conjuguer une molécule de glutathion réduit (GSH) au centre électrophile d'un xénobiotique afin de rendre celui-ci plus soluble et donc plus facilement excrétable par l'organisme. Leur expression peut être induite ou inhibée par certains contaminants, ce qui leur confère un grand intérêt en tant que biomarqueurs potentiels de pollution. Les palourdes provenant de la lagune de Tunis montrent une augmentation de l'activité GST mesurée au niveau des branchies et de la glande digestive par rapport aux témoins (figures 30 et 33). Cette augmentation de l'activité GST implique une induction du système de métabolisation chez les palourdes suite à leur exposition aux contaminants métalliques et organiques dans la lagune. Une augmentation de la GST a été également signalée chez *Ruditapes decussatus* (Hoarau et al., 2001), et chez d'autres bivalves comme *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* exposées à des HAPs (Narbonne et al., 2005). Moreira et al. (2004) ont rapporté une induction de la GST dans les branchies de *M. galloprovincialis* après un déversement de mazout. Par ailleurs, Vidal-Liñán et al. (2010) ont rapporté des corrélations positives entre l'activité GST dans les branchies des moules et les concentrations des HAP et des PCB dans les tissus de ces moules collectés dans les zones côtières de Galicia (Espagne). Plusieurs études ont montré une augmentation de l'activité GST chez différentes espèces suite à une exposition aux métaux (Bouraoui et al., 2008 ; Guilherme et al., 2008 ; Oliveira et al., 2008). Cependant, les travaux de Morales-Caselles et al. (2008) ont montré que l'activité GST au niveau de la glande digestive des palourdes *Ruditapes philippinarum* exposées, *in situ*, aux sédiments contaminés par les HAP, les PCB et les métaux lourds ne présente pas de variation significative par rapport aux témoins. Nos résultats montrent une activité GST plus élevée au niveau des branchies par rapport à la glande digestive chez *Ruditapes decussatus*. Ce résultat est en accord avec les travaux réalisés chez la même espèce de la lagune de Ria Formosa au Portugal (Bebianno et Barreira, 2009). Il a été rapporté que, dans les branchies, les GST peuvent agir en tant qu'une peroxydase, plutôt qu'une enzyme de métabolisation de phase II (Soldatov et al., 2007).

Les biomarqueurs de métabolisation de phase I et II (BPH et GST) au niveau de la glande digestive présentent une fluctuation temporelle similaire (figure 33). L'évolution mensuelle des deux activités semble discerner trois périodes distinctes selon la variation de la

température, avec une diminution des activités en hiver et une augmentation pendant l'été et l'automne. La diminution hivernale des activités GST et BPH peut être expliquée par la variation des facteurs abiotiques, principalement la diminution de la température, le manque de la nourriture et des facteurs physiologiques correspondant au repos sexuel chez la palourde pendant cette période. L'augmentation des activités enzymatiques en été et en automne semble être liée à l'élévation de la température et au processus de la reproduction chez *R. decussatus*. Les deux activités BPH et GST sont caractérisées par deux pics durant l'année d'étude, le premier pic est observé en juin et le deuxième en octobre pour l'activité BPH et en décembre pour l'activité GST. Ceci est lié à la ponte chez la palourde et suggère une activation maximale des systèmes de métabolisation chez l'animal pendant les périodes de ponte. En effet, la palourde *R. decussatus* en Tunisie présente trois périodes principales d'émission gamétique : la première commence début juin, la deuxième début juillet pour s'achever en octobre et la troisième en décembre. D'une façon générale, il s'agit d'une période continue d'émission gamétique s'étalant de juin jusqu'en décembre avec un intervalle de temps irrégulier entre les émissions (Hamida, 2004). L'augmentation progressive des activités BPH et GST de mars jusqu'à juin correspondent à la période de croissance ovocytaire (phase de maturation sexuelle) chez *R. decussatus* qui dépend elle-même des augmentations progressives des températures. En effet, à partir de mars-avril l'activité gonadique chez les palourdes s'accélère et reste soutenue jusqu'en novembre-décembre, due à l'élévation de la température de l'eau qui passe de 10,2°C en février à 30,7°C en août dans la lagune de Tunis et à l'abondance trophique procurée par les efflorescences phytoplanctoniques (Hamida, 2004). D'autres auteurs ont rapporté que les GST sont beaucoup moins sensibles aux variations saisonnières que les biomarqueurs de stress oxydatif et les composants du métabolisme de phase I (Power et Sheehan, 1996). Contrairement à la glande digestive, l'activité GST au niveau des branchies atteignent les niveaux les plus élevés en hiver dans les sites Z2 et Z3, ce qui est due aux augmentations des teneurs en métaux traces dans les tissus des palourdes pendant cette période.

La contamination environnementale entraîne la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui peuvent modifier certains paramètres biologiques et générer un stress oxydant chez les organismes (Lima et al., 2007). Le stress oxydant se produit lorsque le taux de génération des ERO excède le système de défense antioxydant. Ces ERO peuvent causer des effets biologiques délétères tels que l'altération de l'ADN, l'oxydation des protéines et la peroxydation des lipides insaturés dans les membranes biologiques (Regoli et al., 2004). Dans

la cellule, il existe plusieurs mécanismes antioxydants, tel que la catalase, afin de maintenir des taux faibles en ERO dans l'organisme (Hermes-Lima, 2005). Le stress oxydant chez *R. decussatus* collectée dans la lagune de Tunis a été évaluée par la mesure de l'activité CAT et le niveau de la peroxydation lipidique, à travers le dosage de MDA, au niveau des branchies et de la glande digestive. Ces biomarqueurs de stress oxydant montrent des niveaux plus élevées chez *R. decussatus* de la lagune de Tunis par rapport aux témoins (figures 31 et 34). Cette augmentation indique que ces bivalves sont confrontés à un défi oxydant, probablement associé à la présence de contaminants dans l'environnement. Des travaux antérieurs ont montré une augmentation de l'activité CAT au niveau des branchies et de la glande digestive de *R. decussatus* collectée dans différents sites contaminés du littoral tunisien (Jebali et al., 2007 ; Banni et al., 2009a). De Luca-Abbott et al. (2005) ont montré que l'activité CAT est plus élevée chez la palourde *R. philippinarum* transplantée dans différents sites dans les côtes de Hong Kong et durant différentes périodes (14 et 28 jours) par rapport aux témoins. De même, Wang et al., (2012) ont montré une augmentation de l'activité CAT chez *R. philippinarum* après une transplantation *in situ* de 7 jours dans la Baie de Maluan (Chine). Fernandez et al. (2010) ont signalé une corrélation positive entre l'activité CAT dans les branchies de *M. galloprovincialis* et les HAPs dans les côtes méditerranéennes de l'Espagne. Une induction de l'activité CAT liée à une augmentation des contaminants métalliques a été observée chez des espèces transplantées dans le golfe Saronikos en Grèce (Vlahogianni et al., 2007). Par contre, une diminution de l'activité CAT a été enregistré chez des moules maintenues dans des cages sur des sites influencés par des activités anthropiques sur les côtes grecques (Tsangaris et al., 2010).

La peroxydation lipidique a été estimée chez *R. decussatus* par le dosage du taux d'accumulation de MDA en utilisant le test de TBARS. Les xénobiotiques tels que les métaux, les HAPs et les PCBs peuvent provoquer une peroxydation lipidique des membranes biologiques (Ladhar-Chaabouni et al., 2009, Banni et al., 2009b ; Attig et al., 2010). Des niveaux élevés de la peroxydation lipidique, liés à une contamination métallique, ont été déterminés chez le crabe *Carcinus maenas* collecté dans la lagune de Bizerte par rapport au site de référence (Ben Khedher et al., 2013). La palourde *R. decussatus* transplantée dans la lagune de Ria Formosa (Portugal) a présenté une augmentation du niveau de la peroxydation lipidique due à une contamination par les HAPs (Bebianno et Barreira, 2009). Pellerin-Massicotte (1997) a révélé une augmentation de la peroxydation lipidique chez des moules *Mytilus edulis* prélevées, *in situ*, dans les côtes canadiennes.

La palourde *R. decussatus* de la lagune de Tunis présente une variation saisonnière de l'activité CAT et du taux de MDA au niveau des branchies avec une diminution des niveaux pendant l'hiver et une augmentation en été (figure 31). Ces résultats sont en accord avec les résultats de Kamel et al., (2014) qui ont montré une augmentation de l'activité CAT et du taux de MDA en juillet et août chez la moule *M. galloprovincialis* collectée dans la lagune de Bizerte. De même, une augmentation de l'activité CAT en été et en automne a été observé chez la palourde *R. decussatus* et la moule *M. galloprovincialis* collectées mensuellement dans la lagune de Bizerte (Dellali et al., 2001a).

Au niveau de la glande digestive, les biomarqueurs de stress oxydant présentent une fluctuation temporelle fortement liée à la variation des températures (figure 34). L'évolution mensuelle de l'activité CAT montre une diminution pendant les périodes janvier-février et juillet-août. La première diminution est due à la baisse importante des températures et correspond aussi à la période de repos sexuel de l'animal, alors que la deuxième diminution est due aux très fortes températures enregistrées pendant cette période et qui agissent inversement sur le niveau de l'activité enzymatique. Cependant, une augmentation de l'activité CAT a été enregistrée pendant les périodes allant d'avril à juin et de septembre à décembre. Ces augmentations d'activité enzymatique sont dues aux augmentations modérées de la température et au processus de la reproduction chez la palourde. Banni et al. (2009a) ont rapporté aussi une fluctuation saisonnière de l'activité CAT mesurée au niveau de la glande digestive de *R. decussatus* dans différents sites du littoral tunisien avec une augmentation importante pendant le printemps et l'automne. La variation temporelle de l'activité CAT chez les bivalves est associée à la température alors qu'elle est négativement corrélée aux taux d'oxygène dans l'eau (Dellali et al., 2001a).

L'évolution mensuelle du taux d'accumulation de MDA au niveau de la glande digestive, montre une fluctuation temporelle moins importante par rapport à l'activité CAT avec des taux de MDA plus ou moins stables pendant la période située entre septembre et mai marquée par une faible diminution pendant la période hivernale (janvier-février) due à la baisse de la température, à la diminution de la disponibilité de la nourriture et à la baisse des activités métaboliques chez la palourde (repos sexuel) (figure 34). Une augmentation importante et progressive du taux d'accumulation de MDA a été observée du juin jusqu'à août due essentiellement aux fortes augmentations de la température. Les palourdes *R. decussatus* prélevées saisonnièrement dans différents sites sur les côtes tunisiennes ont montré une augmentation des taux d'accumulation de MDA pendant l'été et l'automne (Banni et al.,

2009a). Par contre, une diminution de la peroxydation lipidique a été enregistrée en février comparée au mois de juillet chez le crabe *Carcinus maenas* collecté dans la lagune de Bizerte (Ben Khedher et al., 2013). Le mois d'août, caractérisé par la température maximale tout au long de la période d'échantillonnage, présente l'activité CAT la plus faible et le taux de MDA le plus élevé. Ces résultats suggèrent un effet délétère des températures très élevées sur le système antioxydant en l'inhibant et provoquant ainsi un stress oxydant chez l'organisme avec une induction importante de la peroxydation lipidique. Toutefois, la température n'agit pas seule sur le niveau biomarqueurs du stress oxydant, mais combinée aux effets des facteurs intrinsèque chez la palourde représentés essentiellement par le cycle de la reproduction (croissance ovocytaire, émission gamétique,….). En effet, une augmentation de l'activité CAT et une diminution de la peroxydation lipidique ont été observées en septembre en dépit des fortes températures enregistrées pendant ce mois.

L'activité AChE a été largement utilisé comme un biomarqueur de neurotoxicité chez les bivalves (Munari et al., 2013 ; Campillo et al., 2013). L'activité AChE a été largement utilisée comme biomarqueur d'exposition aux pesticides organophosphorés et aux carbamates (Jin et al., 2015). Récemment, plusieurs études ont montré que d'autres types de contaminants comme les métaux et les hydrocarbures peuvent aussi influencer l'activité AChE d'un organisme (Bouraoui et al., 2009 ; Banni et al., 2010b). L'activité AChE mesurée au niveau des branchies des palourdes prélevées dans la lagune de Tunis est significativement plus inhibée que celle des témoins (figure 32). L'inhibition de l'activité AChE est probablement provoquée par les métaux traces et les hydrocarbures présents dans la lagune. Matozzo et al. (2012) ont montré aussi l'inhibition de l'activité AChE mesurée dans les branchies de la palourde *Ruditapes philippinarum* collectées dans des sites contaminés par les polluants organiques persistants dans la lagune de Venice (Italy). Solé et al. (2009) ont constaté une inhibition significative de l'activité AChE chez le polychète *Nereis diversicolor* et les palourdes *Scrobicularia plana* des sites les plus pollués dans un marécage en Espagne. Ces derniers, ont rapporté que l'inhibition de l'activité AChE ne peut pas être attribué seulement aux apports des pesticides, mais aussi à l'exposition chronique aux métaux, aux surfactants et aux autres produits chimiques qui ont différentes origines. Dans ce travail, l'activité AChE chez *R. decussatus* est négativement corrélée avec les teneurs tissulaires en métaux (As, r = -0,58, $p < 0,01$; Cd, r = -0,59, $p < 0,01$; Hg, r = -0,48, $p < 0,01$; Mn, r = -0,54, $p < 0,01$; Ni, r = -0,61, $p < 0,01$; Pb, r = -0,56, $p < 0,01$; V, r = -0,73, $p < 0,01$; Zn, r = -0,69, $p < 0,01$ et Cu, r = -0,51, $p < 0,01$), ce qui suggère un effet inhibiteur des contaminants métalliques sur

l'activité AChE. A part les pesticides, les autres contaminants tels que les métaux peuvent influencer l'activité AChE chez un organisme en altérant la voie de synthèse de l'enzyme ou simplement en affectant la santé générale de l'organisme en réduisant la production des enzymes (Ricciardi et al., 2010). Une inhibition de l'activité AChE a été observée chez *R. decussatus* collectée dans des sites présentant une contamination mixte (métaux, HAPs, tributylétain) dans la lagune de Ria Formosa (Portugal) (Cravo et al., 2012). De même, une inhibition de l'activité AChE a été notée chez le crabe *Carcinus maenas* collecté dans des sites contaminés par les métaux lourds dans lagune de Bizerte (Ben Khedher et al., 2013).

Nos résultats montrent une fluctuation saisonnière de l'activité AChE chez les palourdes de la lagune de Tunis, avec une diminution de l'activité en hiver alors que pendant les autres saisons elle est quasiment stable. En raison de son rôle dans la neurotransmission, l'AChE est considéré comme étant très sensible aux changements biotiques et abiotiques. Il est bien connu que l'activité AChE est directement influencée par la température (Dellali et al., 2001b). D'autres travaux ont montré que l'activité AChE évolue négativement avec la salinité et l'oxygène dissous (Cravo et al., 2012).

Globalement, les résultats des marqueurs biochimiques montrent que les effets temps sont plus marqués sur les palourdes de la lagune de Tunis par rapport aux témoins, ce qui semble être lié aux effets combinés de la température, des facteurs physiologiques et de la contamination. De plus, les biomarqueurs mesurés au niveau de la glande digestive des palourdes montrent que le site Z1 est le plus affecté par la pollution, alors qu'au niveau des branchies les biomarqueurs montrent que les sites Z2 et Z3 sont plus affectés par la pollution. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les palourdes dans le site Z1 sont contaminées essentiellement par voie trophique alors que les palourdes des sites Z2 et Z3 sont contaminées principalement par l'eau de mer.

8.4. Réponse transcriptomique chez *R. decussatus*

Afin de déterminer les modifications biologiques chez les palourdes à un niveau d'organisation cellulaire précoce à celui des marqueurs biochimiques, une évaluation moléculaire de la réponse transcriptionelle a été réalisée au niveau des branchies et de la glande digestive chez *R. decussatus* collectée dans la lagune de Tunis pendant le printemps (tableaux XVIII et XIX). Les palourdes de la lagune présentent une augmentation de l'expression du gène mitochondrial *cox1* impliquant une augmentation de la respiration mitochondriale à travers une modification au niveau de la chaine de transport d'électrons dans

les mitochondries, liée à l'exposition des bivalves aux contaminants (métaux et HAPs). En effet, le gène *cox1* code pour la sous unité 1 du cytochrome c oxydase qui assure une fonction importante au cours de la respiration en transférant les électrons du cytochrome c à l'oxygène et en contribuant à la génération de l'ATP (Malatesta et al., 1995). La surexpression du gène *cox1* peut être considérée comme un mécanisme de compensation de la diminution de l'activité mitochondriale. Une surexpression du gène *cox1* a été notée chez le poisson zèbre *Danio rerio* contaminé par le méthylmercure (Gonzalez et al., 2005) et chez des bivalves marins et d'eau douce exposés au Cd et à un mélange de Cd-Zn (Achard-Joris et al., 2006). De plus, une augmentation de l'expression du gène mitochondrial *ARNr 16S* a été enregistrée chez les palourdes provenant de la lagune, indiquant une augmentation de la synthèse des mitochondries. La surexpression du gène *ARNr 16S* concorde bien avec la réponse compensatoire, suggérant que les cellules augmentent le nombre des mitochondries pour compenser ceux qui ne fonctionnent pas correctement. La surexpression des gènes *cox1* et *ARNr 16S* peut refléter aussi une demande énergétique plus élevée dans les organes étudiés probablement due aux mécanismes de détoxication. De même, la palourde *Ruditapes philippinarum* exposée à un mélange de métaux (Cd, Hg et Pb) a présenté une surexpression des gènes *cox1* et *ARNr 16S* (Dedeh et al., 2014b).

Dans notre travail, le stress oxydant induit chez les palourdes à cause de leur exposition aux contaminants est neutralisé par l'induction du gène *sod* impliqué dans la défense contre les radicaux libres. Banni et al. (2014) ont montré une surexpression du gène *sod* chez la moule *M. galloprovincialis* exposé au Ni pendant 72 heures.

Le gène *hsp70* est responsable du repliement ou l'assemblage des protéines natives et des fonctions immunorégulatrices extracellulaires (Reina et al., 2012). Le mécanisme de protection du *hsp70* est représenté par l'induction des protéines de réponse au stress comme les chaperons moléculaires intervenant lors d'un stress induit par la chaleur, les métaux lourds, les maladies, et les parasites (Tukaj et Tukaj, 2010). Les palourdes collectées dans la lagune de Tunis présentent une induction du gène *hsp70* au niveau des branchies et de la glande digestive. Cette induction de l'expression génétique relative suggère que l'animal est soumis à un stress environnemental liée essentiellement à la présence d'une contamination métallique et organique dans la lagune. Liu et al. (2014) ont montré une induction du gène *hsp70* chez la moule *Mytilus coruscus* suite à son exposition à un stress thermique, aux métaux (Cu et Cd) et au carburant. Ils ont rapporté aussi que cette induction est dépendante du temps d'exposition. De même, Chen et al. (2014) ont montré une surexpression du gène

hsp70 au niveau des branchies et de la glande digestive de la palourde *Corbicula fluminea* après son exposition à composés un pharmaceutique (carbamazepine).

Le gène *mt* est impliqué dans l'homéostasie des métaux essentiels tels que le cuivre et le zinc, la détoxication des métaux toxiques tels que le cadmium et le mercure (Amiard et al., 2006), la protection contre le stress oxydant (Bebianno et al., 2005) et éventuellement dans la régulation de la transcription génétique (Roesijadi et al., 1998). Dans notre travail, *R. decussatus* collectée dans la lagune de Tunis présente une augmentation de l'expression du gène *mt* qui s'explique par la contamination de la lagune par les métaux traces et l'accumulation de ces métaux dans les tissus des palourdes. Banni et al. (2007) a rapporté que l'étude de l'expression différentielle des deux gènes *mt*10 et *mt20* chez les bivalves représente un outil très utile et robuste pour la surveillance de la pollution par les métaux lourds *in situ.* Ces auteurs ont montré une surexpression des gènes *mt10* et *mt20* chez *M. galloprovincialis* transplantée dans différents sites contaminés par les métaux lourds sur les côtes tunisiennes. D'autres travaux ont montré une surexpression du gène *mt10* chez des moules exposées au Ni (Attig et al., 2010). Nos résultats concernant l'expression génétique sont en accord avec ceux rapportés par Arini et al. (2014a) chez la palourde *Corbicula fluminea* transplantée pendant 24 jours dans la rivière de Riou-Mort (France) qui reçoit des rejets industriels riche en métaux. Ces auteurs ont montré une surexpression des gènes *sod, ARNr 12S, mt et cox1* chez les palourdes contaminés.

Le niveau d'expression des gènes *sod*, *hsp70* et *mt* au niveau des branchies de *R. decussatus* montre que les palourdes du site Z2 sont les plus affectées par la pollution. Alors que le niveau d'expression des gènes au niveau de la glande digestive montre que les palourdes provenant du site Z3 sont le moins affectées par la pollution.

8.5. Altérations histopathologiques chez *R. decussatus*

Chez les organismes aquatiques, les branchies représentent un organe vital, car elles jouent un rôle important dans le transport des gaz respiratoires et régulent l'équilibre osmotique et ionique. Les substances toxiques tels que les métaux lourds et les hydrocarbures peuvent causer des altérations structurelles au niveau des branchies, réduisant ainsi la consommation d'oxygène et perturbant la fonction d'osmorégulation chez les organismes aquatiques (Ghate et Mulherkar, 1979). Dans notre travail, l'histopathologie des branchies des palourdes collectées dans la lagune de Tunis a révélé plusieurs altérations structurelles (figure 35). Les palourdes provenant des sites Z2 et Z3, localisés au voisinage du port de Radès, du

canal de navigation et des industries pétrochimiques, présentent des branchies avec des altérations inflammatoires plus importantes que chez les palourdes collectées dans le site Z1, qui est localisé au voisinage de la centrale électrique de Radès et des industries mais loin du port et du canal de navigation. Selon les travaux précédents, les modifications inflammatoires au niveau des branchies ont tendance à être non spécifiques et reflètent une adaptation physiologique au stress (Mallatt, 1985). Ces modifications peuvent être considérés comme un mécanisme de protection puisque la surface est altérée et ceci afin de maintenir les fonctions d'osmorégulation (Saravana Bhavan et Geraldine, 2000). Dans ce travail, les modifications inflammatoires (infiltration hémocytaire, malformation des lamelles et fusion des lamelles) observé en plus des autres altérations sévères (altération des lamelles et formation de fibrome) représentent une perte progressive des fonctions biologiques des branchies (la respiration et les régulations osmotique et ionique) plutôt que des mécanismes de protection et pourraient éventuellement aboutir à des branchies dysfonctionnelles voire même non fonctionnels. Des altérations similaires ont été observées chez la moule *P. viridis*, collectée dans l'estuaire d'Ennore localisée dans la côte sud-est de l'inde, avec des infiltrations hémocytaires, des fusions des lamelles et des altérations épithéliales (Arockia Vasanthi et al., 2012). Parmi les altérations les plus observées au niveau des branchies, l'érosion ciliaire qui correspond à une perte des cils lamellaire. Ces cils filtrent les particules en suspension présentes dans l'eau inhalée, ensuite ils sélectionnent et acceptent les particules alimentaires et rejette les grandes particules que l'animal ne peut les ingérer à traves le siphon exhalent sous forme de pseudofécés (Morton, 1987). Il a été montré que les cils des branchies peuvent être endommagés suite à une blessure mécanique due à l'exposition aux métaux (Viarengo et al., 1994) et aux particules solides en suspension (Shin et al., 2002). Des études sur la moule *P. viridis* exposé au cuivre ont mis en évidence des dommages aux taux de clairance chez l'animal qui ont été causés par des altérations structurales des cils (Nicholson, 2003). Les altérations des cils lamellaires peuvent interférer avec l'alimentation chez l'animal et par la suite avec la croissance de l'animal, donc elles représentent un biomarqueur potentiellement important sur le plan écologique (Nicholson et Lam, 2005). Des altérations histopathologiques ont été rapportées dans des travaux antérieurs au niveau des branchies de la palourde *R. philippinarum* et du crabe *C. maenas* collectée dans des sites contaminés par les métaux (Martín-Díaz et al., 2008; Ben Khedher et al., 2014). Les altérations histopathologiques observé dans notre étude sont similaires aux altérations trouvées chez *R. decussatus* collectée dans un site contaminé dans les côtes sud du Portugal (Costa et al., 2013) et chez *R. philippinarum* exposée au laboratoire à différents métaux (Cd, Cu et Zn) (Martín-

Díaz et al. 2005). Berthou et al. (1987) ont rapporté que les nécroses et les inflammations sont les altérations les plus abondantes chez des huitres collectées dans les zones côtières de la Bretagne (France) après le naufrage de l'Amoco Cadiz et le déversement de son pétrole. L'évaluation semi-quantitative des lésions histopathologiques a montré que les branchies des palourdes provenant du site Z2 sont plus altérées par rapport aux palourdes des sites Z1 et Z3. Ceci peut être lié aux fortes concentrations des métaux traces dans le site Z2.

La glande digestive chez les bivalves joue un rôle important dans la digestion des aliments et représente le principal site d'accumulation et de détoxication de plusieurs types de contaminants (HAPs, PCBs, métaux,…) (Arockia Vasanthi et al., 2012). La glande digestive de *R. decussatus* témoin montre un arrangement des tubules bien organisé. Ces tubules digestifs sont composés de différents types de cellules épithéliales. Il y a les cellules digestives caractérisées par leur aspect clair et la présence de nombreuses vacuoles et elles sont situées dans la partie centrale des tubules, alors que les cellules sécrétrices basophiles sont caractérisées par leur aspect sombre et leur forme pyramidale et elles sont regroupées dans les deux extrémités des tubules digestifs. Les tubules chez les témoins présentent une lumière centrale étroite ou presque close entouré par les cellules épithéliales (figure 36).

Les palourdes collectées dans la lagune de Tunis et qui ont été exposées aux métaux et aux HAPs dans leur milieu, présentent des altérations sévères de la structure des tubules digestifs et des cellules épithéliales. Parmi les altérations fréquemment observées, la formation d'une lumière dilatée et la présence d'une infiltration hémocytaire diffus dans le tissu interstitiel péritubulaire indiquant l'apparition d'une réponse inflammatoire. Une augmentation de la vacuolisation a été observée au niveau des tubules des palourdes prélevées dans les sites pollués. D'autres altérations des cellules épithéliales ont été trouvées chez les palourdes contaminées, représentées par une fragmentation du cytoplasme apical et un rétrécissement des cellules formant l'épithélium conduisant à l'accumulation des débris cellulaires dans la lumière dilatée et montant ainsi un aspect pré-nécrotique des tubules. D'autres types d'altérations plus sévères ont été observés aussi chez les palourdes de la lagune de Tunis représentés par une rupture de la lame basale des tubules la formation des nécroses cellulaires et tubulaires. Toutes ces altérations ont été observées chez les palourdes provenant des trois sites d'étude avec une fréquence d'apparition la plus élevée au niveau du site Z1 et la fréquence la plus faible au niveau du site Z3. Les palourdes du site Z1 montrent aussi des cas où la glande digestive est fortement endommagée avec l'apparition de fibrose. Ces résultats

suggèrent que les altérations histopathologiques semblent être associées à l'accumulation des HAPs dans les tissus des palourdes.

Plusieurs travaux antérieurs ont montré des résultats similaires aux notre chez des organismes aquatiques exposé *in situ* à des contaminants. Arockia Vasanthi et al. (2012) ont montré des altérations histologiques sévères (infiltration hémocytaire, altérations épithéliales, amincissement des tubules, altération de la membrane basale et atrophie) au niveau de la glande digestive chez *P. viridis* collectée dans l'estuaire d'Ennore (Inde) et ils ont lié ces altérations à l'accumulation des métaux au niveau des tissus mous de la moule. Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Costa et al. (2013) qui ont montré la formation de lumière dilatée avec la présence de débris cellulaires, l'infiltration hémocytaire, le rétrécissement des cellules épithéliales, la formation des nécroses tubulaires et la formation de fibroses chez *R. decussatus* collectée dans des sites soumis à une pression anthropique (port commercial et ferme aquacole) localisés dans les zones côtières sud du Portugal. Des résultats similaires ont été trouvés chez le crabe *Carcinus maenas* collectées dans différents sites contaminés par les métaux lourds dans la lagune de Bizerte (Ben Khedher et al., 2014). De même, une augmentation de la vacuolisation dans les tubules digestifs a été observée chez la palourde *Macoma calcarea* exposée au pétrole (Neff et al., 1987) et chez la moule *Mytilus edulis* exposée aux métaux lourds (Wedderburn et al., 2000). L'huître *Crassotrea virginica* collectée dans des sites contaminés par les hydrocarbures pétroliers et les métaux lourds a montré des altérations au niveau des tubules digestives et des branchies qui ont été bien corrélées avec les concentrations de la fraction non résolue des hydrocarbures (UCM) et de cadmium dans l'eau (Gold-Bouchot et al., 1995).

Des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées afin de résumer les informations recueillies durant la saison printanière. Chacune d'entre elles (figures 37 et 38) concerne un organe (branchies ou glande digestive). L'ACP a intégrée d'une part l'ensemble des données chimiques (métaux traces et HAPs totaux) au niveau des sédiments et du tissu mou de la palourde et d'autre part l'ensemble des réponses des biomarqueurs biochimiques, des niveaux des expressions génétiques et de l'indice de dommages histopathologiques (ID) au niveau des branchies ou de la glande digestive. Chacune des deux ACPs a permis d'extraire 3 axes parmi lesquels les axes F1 et F2 ont finalement été retenus pour représenter les variables dans un espace à deux dimensions.

Pour les branchies (figure 37A), toutes les variables contribuent d'une manière équitable à la formation de l'axe F1. Les teneurs des éléments métalliques (As, Cd, Hg, Ni, Pb et Zn) dans les sédiments, les teneurs du Pb et des HAPs totaux dans les tissus des palourdes et l'expression du gène *hsp70* au niveau des branchies contribuent majoritairement (contribution collective : 65,45%) à la formation du second axe F2. Le plan principal F1-F2 conserve 91,74% de l'information initiale. Dans le cercle des corrélations des variables, l'axe F1 montre une corrélation positive entre les concentrations des contaminants métalliques et organiques et la majorité des réponses biologiques. Cet axe montre aussi une corrélation négative entre l'activité AChE et le reste des variables étudiées. D'après la projection des individus dans le plan factoriel (figure 37B), on constate que l'axe F2 discrimine clairement les sites de la lagune de Tunis, principalement caractérisés par de fortes valeurs prises pour les variables concentrations des métaux et des HAPs, biomarqueurs biochimiques (BPH, GST, CAT et MDA), expressions des gènes et ID, du site de référence (témoin) présentant de faibles valeurs pour ces variables mais des valeurs élevées de l'activité AChE. L'axe F2 fait apparaître des différences entre les trois sites de la lagune de Tunis. Les sites Z1 et Z3 sont groupés présentant ainsi des profils de pollution similaires, alors que le site Z2 est clairement séparé de ces deux sites montrant un niveau de pollution plus élevé.

Pour la glande digestive (figure 38A), toutes les variables contribuent d'une manière équitable à la formation de l'axe F1. Les concentrations de l'As, le Cd et le Zn dans les sédiments et celles de l'Ag, le Mn, le Pb et des HAPs totaux dans les tissus des palourdes contribuent majoritairement (contribution collective : 60%) à la formation du second axe F2. Le plan principal F1-F2 conserve 92,69% de l'information initiale. Dans le cercle des corrélations des variables, l'axe F1 montre une corrélation positive entre toutes les variables chimiques et biologiques. D'après la projection des individus dans le plan factoriel (figure 38B), on observe une discrimination claire entre les sites de la lagune de Tunis, caractérisés par des valeurs élevées des variables chimiques et biologiques, et le site de référence, caractérisé par des faibles valeurs de ses variables, selon l'axe F1. L'axe F2 discrimine clairement entre les trois sites de la lagune de Tunis avec un gradient de pollution de la partie négative de l'axe vers la partie positive. Ainsi, le site Z2 est considérablement le plus affecté par la pollution, tandis que le site Z1 est plus pollué que le site Z3.

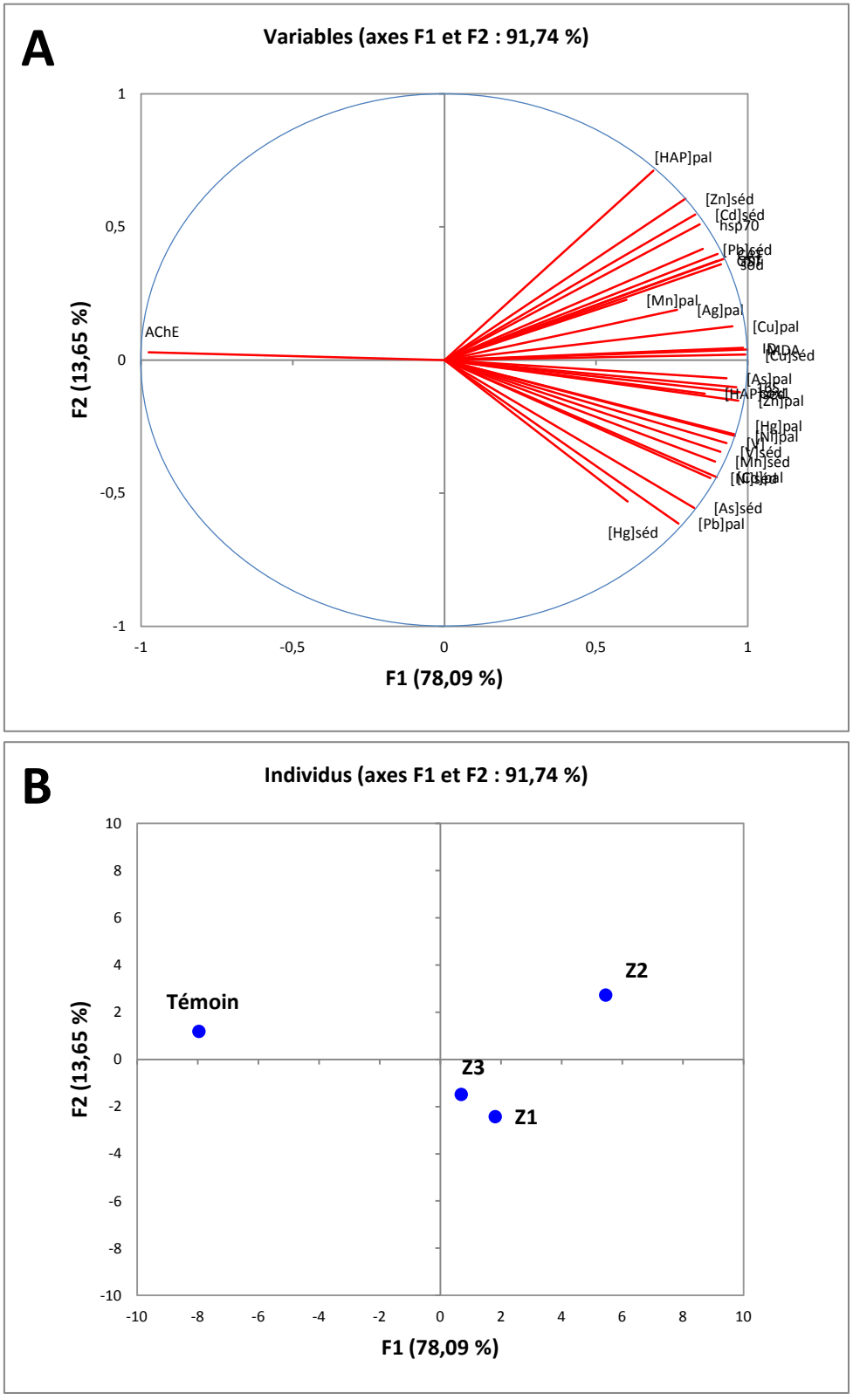


Figure 37 : Analyse en composantes principales appliquée à toutes les variables étudiées dans les branchies des palourdes et les sédiments issus des différents sites en printemps. (A) Cercle des corrélations. (B) Projection des individus sur le plan factoriel F1-F2.

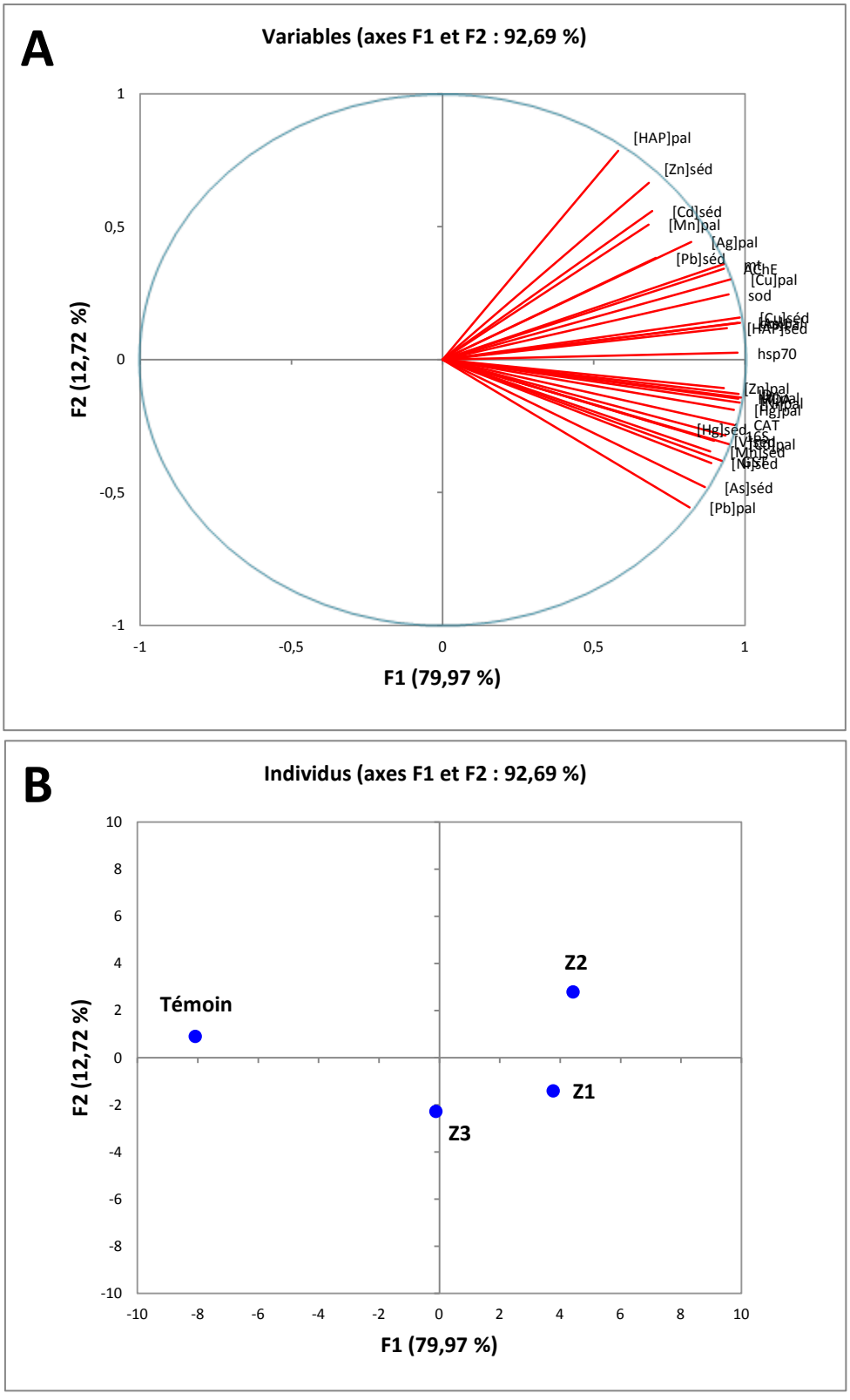


Figure 38 : Analyse en composantes principales appliquée à toutes les variables étudiées dans la glande digestive des palourdes et les sédiments issus des différents sites en printemps. (A) Cercle des corrélations. (B) Projection des individus sur le plan factoriel F1-F2.

B. Approche expérimentale :

Caractérisation des effets biochimiques, génétiques et génotoxiques du benzo(a)pyrène chez les bivalves marins

1. INTRODUCTION

Dans cette partie, cinq expériences ont été réalisées au laboratoire afin de caractériser la réponse des biomarqueurs biochimiques, de génotoxicité et transcriptionnelles au BaP chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Les concentrations de BaP utilisées dans ces expériences sont de deux types aiguë et subaiguë. Les concentrations subaiguës de BaP sont similaires à celles qui sont rencontrés dans l'eau de mer de la lagune de Tunis, comprises entre 0 et 10 µg BaP/L (tableau XI). La première expérience a été destinée à étudier l'effet du BaP chez *R. philippinarum* contaminée par voie trophique pendant 7 jours en utilisant la microalgue *Isochrysis galbana* comme vecteur de contamination.

Pour la deuxième expérience, les effets biochimiques et moléculaires des concentrations subaiguës de BaP ont été étudiés chez *R. philippinarum* contaminée par voie directe pendant 7 jours en utilisant l'eau de mer comme vecteur de contamination.

Dans la troisième expérience, la palourde *R. philippinarum* a été exposée à des concentrations aiguës de BaP via l'eau de mer pendant 7 jours.

La quatrième expérience, a été destinée à étudier la cinétique des effets biochimiques et moléculaires du BaP en exposant la palourde *R. philippinarum* à la concentration maximale de BaP (10 µg/L) enregistrée dans la lagune de Tunis pendant différentes périodes (1, 3, 7 et 14 jours). Concernant la dernière expérience, elle était destinée à évaluer la réponse biochimique et moléculaire chez l'huître creuse *C. gigas* exposée à des concentrations subaiguës et aiguës de BaP pendant 7 jours et la comparer à la réponse de la palourde *R. philippinarum.*

2. EFFETS DU BENZO(A)PYRENE ADMINISTRE PAR VOIE TROPHIQUE CHEZ *R. PHILIPPINARUM*

2.1. Concentrations de BaP dans les cultures de *I. galbana* et les tissus de *R. philippinarum*

Les concentrations de BaP enregsitrées dans les cellules de microalgue (*I. galbana*) témoin et contaminées pendant 24 heures sont rapportées dans le tableau XXII. Les résultats montrent une association du BaP aux cellules de microalgue pour les deux conditions 400 µg/L et 1000 µg/L avec des valeurs égales, respectivement, à 24295 ± 561 et 31499 ± 715 µg/g poids sec. La culture de microalgue exposée à la plus forte concentration du contaminant présente une augmentation de BaP de 30% par rapport à celle exposé à 400 µg/L de BaP. La culture de microalgue exposée au DMSO seulement (témoin) présente une concentration de BaP très faible, de l'ordre de 3,51 ± 0,72 µg/g poids sec. Les concentrations de BaP ont été analysées aussi dans les tissus mous des palourdes témoin et contaminées (par voie trophique) pendant 7 jours, les valeurs obtenues sont au dessous de la limite de détection. La non détection du BaP dans les tissus des palourdes contaminées est probablement due à l'utilisation de tout le tissu mou au lieu de la glande digestive seulement.

Tableau XXII : Concentrations de BaP (µg/g poids sec) dans les cellules de *I. galbana* contaminées et témoin.

	Témoin	**400 µg/L**	**1000 µg/L**
Concentration de BaP	3,51 ± 0,72	24295 ± 561*	31499 ± 715*

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 5). * indique une différence significative par rapport au témoin, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

2.2. Effet du BaP sur le taux d'accumulation du malondialdéhyde (MDA)

Les niveaux de la peroxydation lipidique au niveau des branchies et de la glande digestive de *R. philippinarum*, exprimés en termes de malondialdéhyde (MDA) et plus précisément de composés réagissant à l'acide thiobarbiturique (thiobarbituric acid reactive species, TBARS, dont le MDA représente l'espèce très majoritaire), sont illustrés dans la figure 39. Au niveau des branchies, le taux d'accumulation de MDA est significativement plus élevé chez les palourdes exposées à 400 µg BaP/L par rapport au témoin avec des valeurs

respectives égales à 2,5 ± 0,4 et 1,9 ± 0,4 nmole/mg P. Alors que les palourdes exposées à 1000 µg BaP/L ne présentent pas de différence par rapport au témoin.

Au niveau de la glande digestive, les palourdes des deux conditions de contamination présentent une augmentation significative du taux d'accumulation de MDA par rapport au témoin. Les valeurs des teneurs en MDA sont égales à 1,7 ± 0,7 et 1,8 ± 0,4 nmole/mg P pour les conditions respectives 400 µg BaP/L et 1000 µg BaP/L, contre 0,9 ± 0,1 nmole/mg P pour le témoin.

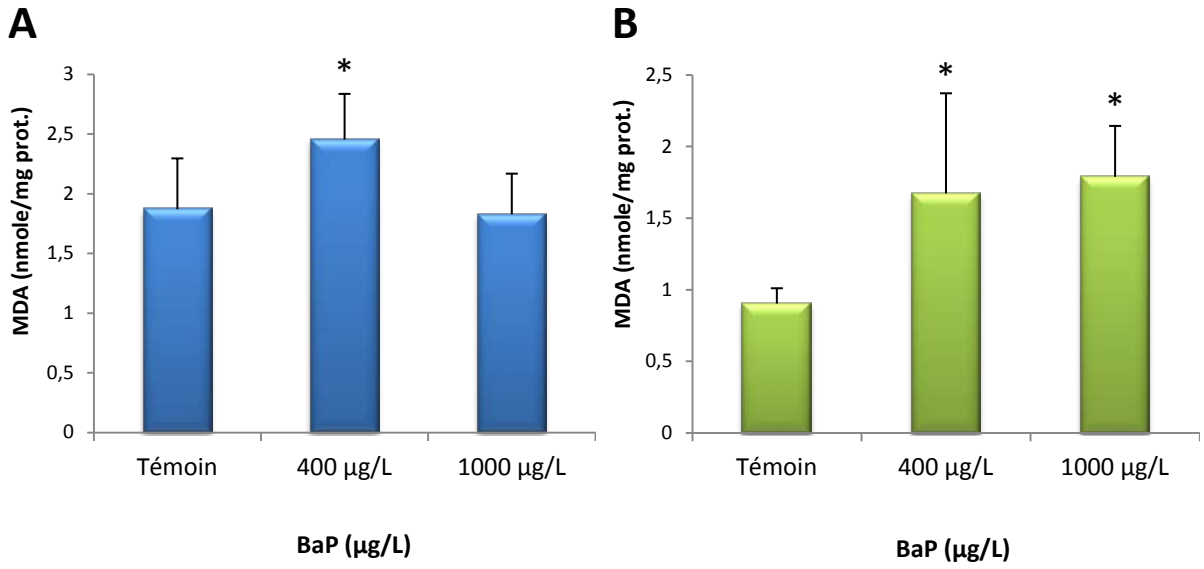


Figure 39: Taux d'accumulation du malondialdéhyde dans les branchies (A) et la glande digestive (B) de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours au BaP par voie trophique. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 6). * indique une différence significative par rapport au témoin selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

2.3. Effet génotoxique du BaP

Après 7 jours d'exposition au BaP, l'amorce OPB7 montre des différences dans la composition de l'ADN entre les palourdes contaminées et le témoin (tableau XXIII). En effet, le nombre de sites d'hybridation est 5 fois moins important au niveau des branchies des palourdes exposées à 1000 µg BaP/L par rapport au témoin. Une autre diminution du nombre de sites d'hybridation a été notée au niveau de la glande digestive des palourdes exposée à 400 µg BaP/L avec une valeur 4,5 fois moins importante que celle enregistrée chez le témoin.

Tableau XXIII : Nombre des sites d'hybridation relatifs des amorces RAPD par génome au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Organes	Amorces RAPD	Témoin	400 µg/L	1000 µg/L
Branchies	OPB7	$(14,4 \pm 4,1). 10^{-4}$	$(5,7 \pm 2,4). 10^{-4}$	$(2,9 \pm 0,8). 10^{-4}$*
	OPB11	$(3,7 \pm 1,1). 10^{-5}$	$(2,4 \pm 0,9). 10^{-5}$	$(6,6 \pm 3,2). 10^{-5}$
Glande digestive	OPB7	$(33,2 \pm 7,5). 10^{-5}$	$(7,4 \pm 1,9). 10^{-5}$*	$(17,3 \pm 5,5). 10^{-5}$
	OPB11	$(21,4 \pm 9,0). 10^{-5}$	$(10,3 \pm 5,5). 10^{-5}$	$(10,4 \pm 7,8). 10^{-5}$

Résultats exprimés en moyenne ± SEM (n = 10). * indique une différence significative par rapport au témoin selon le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Les deux amorces utilisées, OPB7 et OPB11, montrent des différences dans la fréquence d'apparition des produits de PCR entre branchies des palourdes contaminées et témoin (tableau XXIV). En utilisant l'amorce OPB7, les produits de PCR, dont les températures de fusion (T*m*) sont comprises dans l'intervalle [85-86[, présentent une diminution significative de la fréquence d'apparition au niveau des branchies des palourdes exposées à 1000 µg BaP/L (de 0,6 chez le témoin à 0,2 chez le contaminé). En utilisant l'amorce OPB11, les produits de PCR présentant des T*m* comprises dans les intervalles [75-79[, [80-81[, [81-82[, [82-83[, [83-84[, [87-88[montrent des différences dans la fréquence d'apparition entre les palourdes exposées à 400 µg BaP/L et le témoin. De même, les produits PCR avec des T*m* situées dans l'intervalle [79-80[montrent une diminution significative de la fréquence d'apparition chez les palourdes exposées à 1000 µg BaP/L.

Les résultats de la fréquence d'apparition des produits PCR au niveau de la glande digestive des palourdes après 7 jours d'exposition au BaP sont rapportés dans le tableau XXV. L'utilisation de l'amorce OPB7 montre une diminution significative de la fréquence d'apparition des produits PCR présentant des T*m* dans l'intervalle [83-84[chez les palourdes exposées à 1000 µg BaP/L par rapport au témoin (de 0,6 à 0,2). En utilisant l'amorce OPB11, les produits de PCR dont les T*m* appartiennent aux intervalles [80-81[et [85-86[montrent des différences significatives entre les palourdes exposées à 400 µg BaP/L et le témoin. De plus, les produits de PCR avec des T*m* appartenant aux intervalles [75-79[, [80-81[et [82-83[montrent des différences significatives entre les palourdes exposées à 1000 µg BaP/L et le témoin.

Tableau XXIV : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs T*m* appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau des branchies des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Intervalles de température (°C)	Amorce OPB7			Amorce OPB11		
	Témoin	400 µg/L	1000 µg/L	Témoin	400 µg/L	1000 µg/L
[75-79[	0,1	0,2	0,1	0,2	0,6*	0,2
[79-80[	0	02	0,2	0,4	0,5	0*
[80-81[	0,6	0,6	0,6	0,7	0,1*	0,8
[81-82[	0,3	0,1	0,1	0,1	0,5*	0,2
[82-83[	0	0,2	0,1	0,8	0,2*	0,5
[83-84[	0,9	0,8	0,9	0	0,7*	0,3
[84-85[	0,1	0	0	0,2	0	0,2
[85-86[	0,6	0,5	0,2*	0,3	0,4	0,5
[86-87[	0,3	0,4	0,2	0	0	0
[87-88[	0	0	0,1	0,4	0*	0,2
[88-89[	0,6	0,3	0,3	0	0,3	0
[89-92[	0,1	0,1	0,1	0	0	0,1

* indique une différence significative comparée au témoin (n = 10). Données analysées avec le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Tableau XXV : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs T*m* appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau de la glande digestive des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Intervalles de température (°C)	Amorce OPB7			Amorce OPB11		
	Témoin	400 µg/L	1000 µg/L	Témoin	400 µg/L	1000 µg/L
[75-79[	0,1	0,3	0,4	0	0,1	0,4*
[79-80[	0,1	0,2	0	0	0,1	0
[80-81[	0,6	0,5	0,5	0,9	0,4*	0,5*
[81-82[	0,3	0,2	0,1	0	0,3	0,2
[82-83[	0,1	0,3	0,4	0,9	0,8	0,5*
[83-84[	0,6	0,4	0,2*	0,1	0	0,2
[84-85[	0,2	0,2	0,3	0,4	0,1	0,1
[85-86[	0,4	0,4	0,1	0,4	0,8*	0,4
[86-87[	0,4	0,6	0,5	0	0	0,1
[87-88[	0	0	0,1	0,1	0	0
[88-89[	0,3	0,2	0,1	0	0	0
[89-92[	0	0,4*	0,2	0	0	0

* indique une différence significative comparée au témoin (n = 10). Données analysées avec le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

2.4. Effet du BaP sur l'expression relative des gènes

Les taux d'expression relative des gènes au niveau des branchies des palourdes après une exposition de 7 jours au BaP sont illustrés dans la figure 40. Les palourdes exposées à 400 µg BaP/L présentent une surexpression des gènes *cyp4*, *cat* et *ARNr 16S*, avec une augmentation respective de 1,9, 2,1 et 1,7 fois par rapport au témoin. Les palourdes exposées à 1000 µg BaP/L présentent une surexpression des gènes *cyp4*, *mdr*, *cat*, *cox1* et *ARNr 16S*, avec une augmentation respective de 2,2, 8,9, 2,7, 2,8, et 2,1 fois par rapport au témoin.

La figure 41 présente les taux d'expression relative des gènes au niveau de la glande digestive des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours. Concernant la première condition (400 µg BaP/L), on constate une augmentation significative du taux d'expression des gènes *gst*, *ahr* et *sod*. Pour la deuxième condition (1000 µg BaP/L), les gènes *cyp4*, *gst*, *ahr*, *mdr*, *cox1* et *sod* présentent des taux d'expression significativement plus élevé par rapport au témoin.

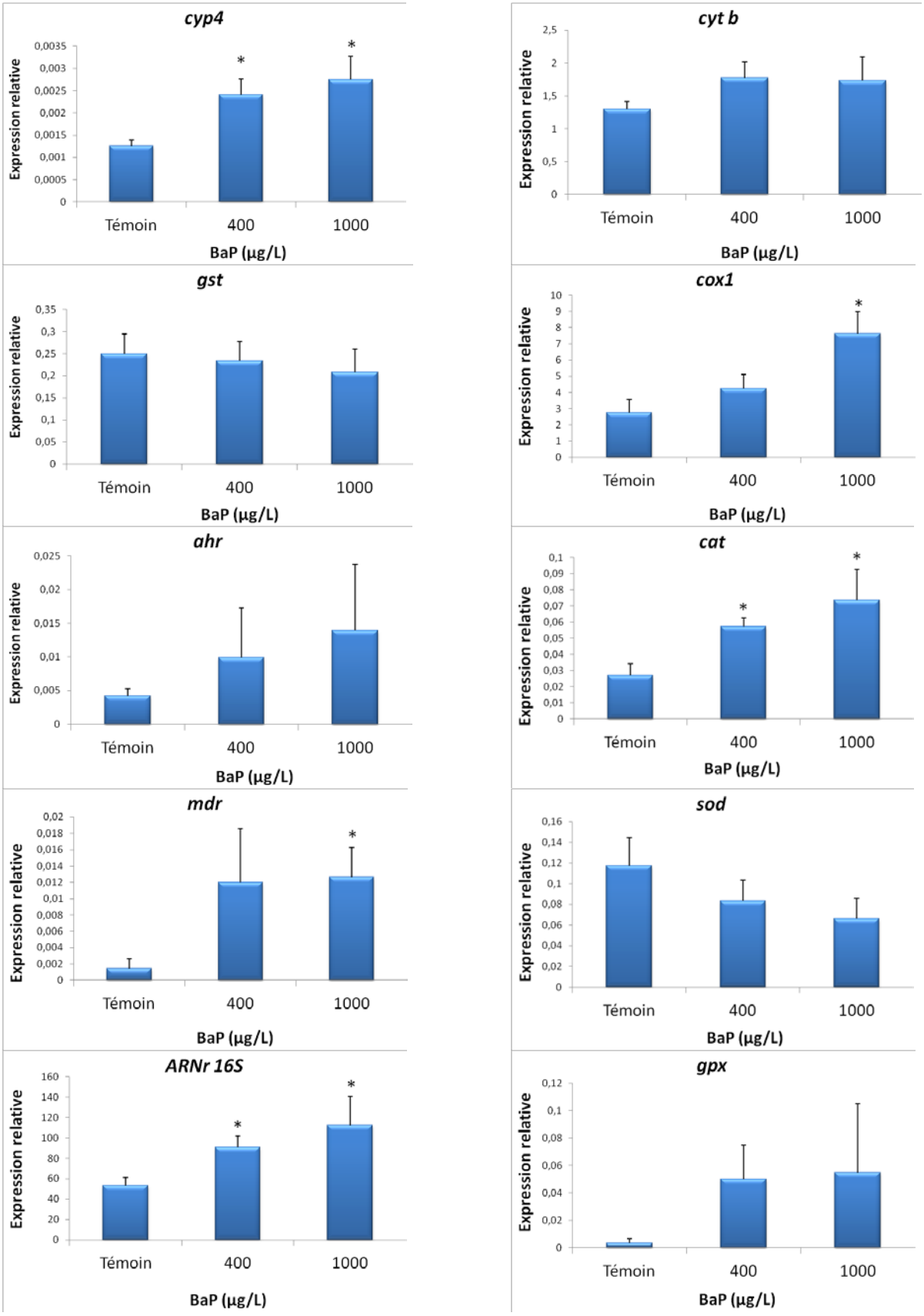


Figure 40 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau des branchies de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours au BaP par voie trophique. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

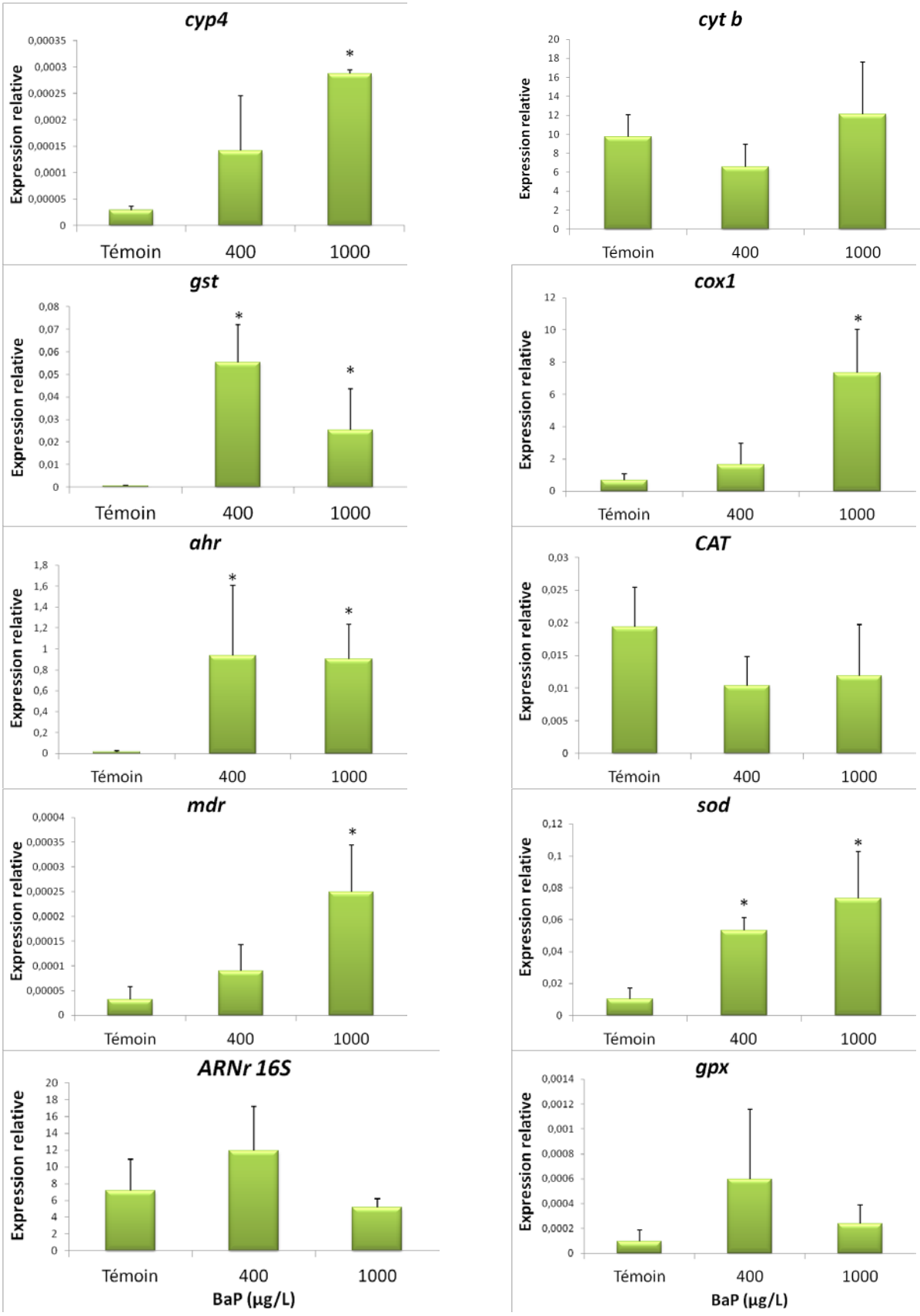


Figure 41 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau de la glande digestive de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours au BaP par voie trophique. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

3. REPONSE BIOLOGIQUE DE LA PALOURDE *R. PHILIPPINARUM* EXPOSEE A L'EAU DE MER CONTAMINEE PAR DES CONCENTRATIONS SUBAIGUËS DE BENZO(A)PYRENE

3.1. Effets du BaP sur la réponse biochimique

Les résultats relatifs aux variations des marqueurs biochimiques chez les palourdes exposées aux concentrations subaiguës de BaP pendant 7 jours sont présentés dans la figure 42. La mesure de l'activité CAT et du taux d'accumulation de MDA au niveau des branchies des palourdes exposées à 2 et 5 µg BaP/L montre une augmentation significative des niveaux de ces deux biomarqueurs par rapport au témoin. Une augmentation significative de l'activité GST de l'ordre de 1,9 fois a été notée au niveau des branchies des palourdes exposées à 2 µg BaP/L, alors que les palourdes exposées à la concentration la plus élevée de BaP ne montrent pas de différence par rapport au témoin. Une diminution significative de l'activité AChE a été enregistrée au niveau des branchies des palourdes exposées aux deux concentrations de BaP.

Concernant la glande digestive, une augmentation significative des activités GST et CAT a été enregistrée chez les palourdes exposées aux deux concentrations de BaP, alors que l'activité AChE est moins élevée chez les palourdes contaminées par rapport au témoin. Le taux d'accumulation de MDA ne montre pas de différence significative par rapport au témoin.

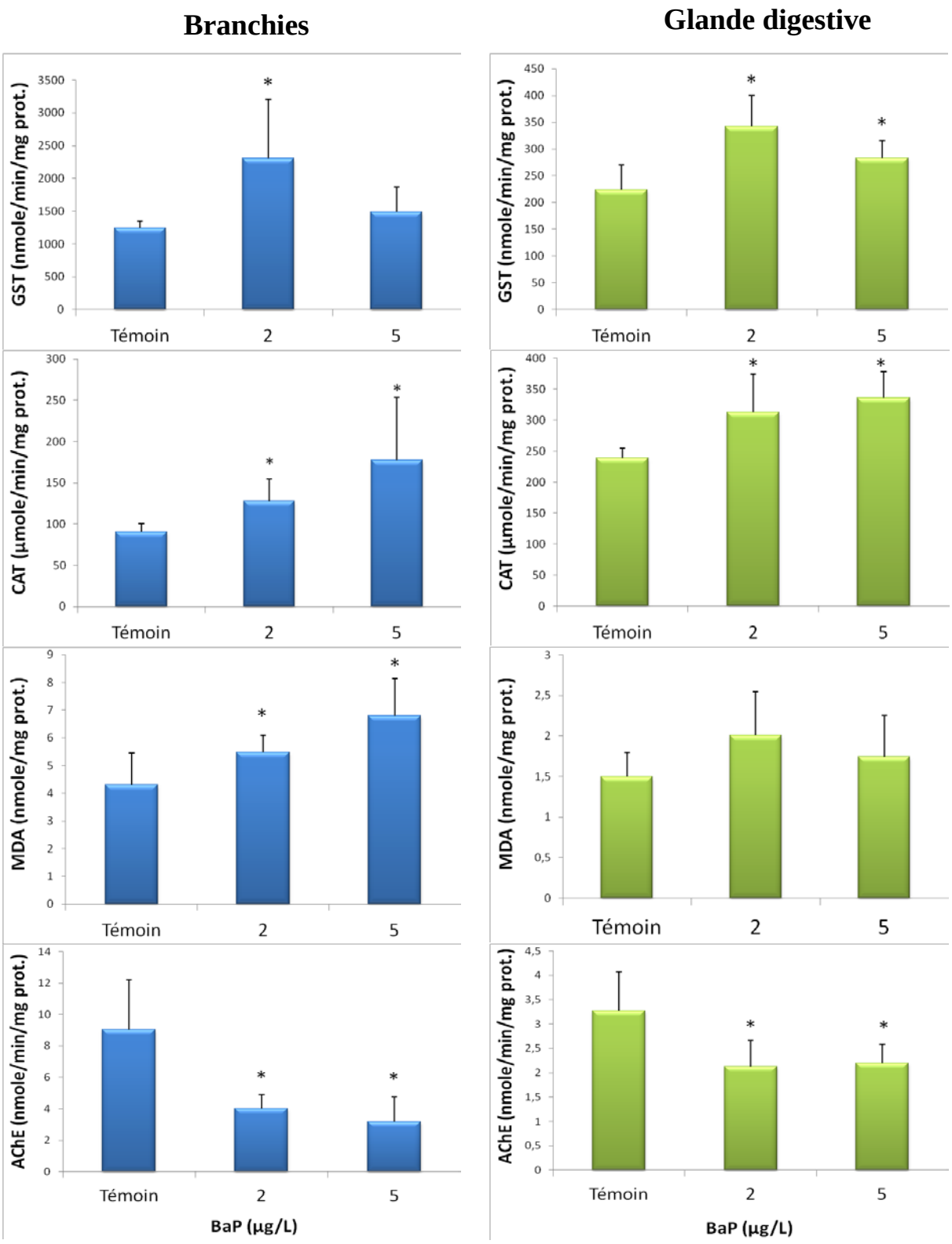


Figure 42 : Réponse des marqueurs biochimiques (GST, CAT, MDA et AChE) au niveau des branchies et de la glande digestive de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours à des concentrations subaiguës de BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 6). * indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

3.2. Effet génotoxique du BaP

Les résultats relatifs au nombre de sites d'hybridation des amorces OPB7 et OPB11 au niveau de l'ADN génomique extrait à partir des branchies et de la glande digestive des palourdes sont présentés dans le tableau XXVI. On remarque que le BaP provoque une diminution significative du nombre de sites d'hybridation pour l'amorce OPB11 au niveau des branchies des palourdes exposées à 2 et 5 µg BaP/L, avec des taux de régression respectifs de 2,1 et 3,8 fois par rapport au témoin.

Au niveau de la glande digestive, les amorces OPB7 et OPB11 n'ont pas révélé de différences significatives dans la composition de l'ADN entre le témoin et les palourdes exposées pendant 7 jours au BaP, ce qui peut être dû à un équilibre compensatoire entre la création et la perte de sites d'hybridation.

Tableau XXVI : Nombre des sites d'hybridation relatifs des amorces RAPD par génome au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Organes	Amorces RAPD	Témoin	2 µg/L	5 µg/L
Branchies	OPB7	$(4,86 \pm 0,74).10^{-4}$	$(3,21 \pm 0,86).10^{-4}$	$(4,05 \pm 0,75).10^{-4}$
	OPB11	$(3,62 \pm 0,70).10^{-4}$	$(1,72 \pm 0,42).10^{-4}$*	$(0,95 \pm 0,20).10^{-4}$*
Glande digestive	OPB7	$(10,2 \pm 3,6).10^{-5}$	$(5,84 \pm 3,46).10^{-5}$	$(20,4 \pm 5,9).10^{-5}$
	OPB11	$(9,3 \pm 2,7).10^{-5}$	$(3,38 \pm 1,29).10^{-5}$	$(9,5 \pm 3,2).10^{-5}$

Résultats exprimés en moyenne ± SEM (n = 10). * indique une différence significative comparée au témoin selon le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

L'analyse des fréquences d'apparition des produits de PCR pour les branchies, en utilisant les deux amorces RAPD OPB7 et OPB11, montre des différences significatives entre le témoin et les palourdes exposées aux deux concentrations de BaP (tableau XXVII). L'amorce OPB7 montre une diminution significative de la fréquence d'apparition des produits PCR, ayant une T*m* dans l'intervalle [81-82[, chez les palourdes contaminées par le BaP (de 0,4 chez le témoin à 0 chez les contaminées). De plus, une augmentation significative de la fréquence d'apparition des produits de PCR de T*m* appartenant à l'intervalle [80-81[a été observée pour la condition 5 µg BaP/L (de 0,3 chez le témoin à 0,7 chez les contaminées).

En utilisant l'amorce OPB11, une augmentation significative des fréquences d'apparition des produits de PCR dont les T*m* appartiennent aux intervalles [75-79[et [80-81[a été notée au niveau des branchies des palourdes exposées à 2 µg BaP/L. On observe aussi une augmentation significative de la fréquence des produits de T*m* appartenant à l'intervalle [83-84[pour les palourdes exposées à 5 µg BaP/L.

Concernant la glande digestive, les amorces OPB7 et OPB11 montrent des différences significatives dans la fréquence d'apparition des produits de PCR entre le témoin et les palourdes contaminées (tableau XXVIII). L'amorce OPB7 montre des différences significatives par rapport au témoin dans la fréquence d'apparition des produits de T*m* appartenant aux intervalles [75-79[, [82-83[et [85-86[et des produits de T*m* appartenant aux intervalles [80-81[et [86-87[chez les palourdes exposées respectivement à 2 et 5 µg BaP/L. Alors que l'amorce OPB11 montre une diminution significative de la fréquence des produits de T*m* appartenant à l'intervalle [75-79[au niveau de la glande digestive des palourdes exposées à 5 µg BaP/L (de 0,7 chez le témoin à 0,3 chez les contaminées).

Tableau XXVII : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs T*m* appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau des branchies des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Intervalles de température (°C)	**Amorce OPB7**			**Amorce OPB11**		
	Témoin	**2 µg/L**	**5 µg/L**	**Témoin**	**2 µg/L**	**5 µg/L**
[75-79[	0,1	0,2	0,3	0,4	0,8*	0,6
[79-80[	0	0,2	0,1	0,6	0,3	0,4
[80-81[	0,3	0,5	0,7*	0,1	0,5*	0,3
[81-82[	0,4	0*	0*	0,5	0,3	0,5
[82-83[	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,2
[83-84[	0,7	0,8	0,6	0	0,2	0,4*
[84-85[	0,1	0	0,1	0	0,1	0,1
[85-86[	0,6	0,8	0,3	0	0,1	0,3
[86-87[	0,1	0,2	0,5	0,3	0	0,1
[87-88[	0	0	0	0	0	0
[88-89[	0	0	0	0	0	0
[89-92[	0	0	0	0	0	0

* indique une différence significative comparée au témoin (n = 10). Données analysées avec le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Tableau XXVIII : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs T*m* appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau de la glande digestive des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Intervalles de température (°C)	Amorce OPB7			Amorce OPB11		
	Témoin	2 µg/L	5 µg/L	Témoin	2 µg/L	5 µg/L
[75-79[	0,1	0,5*	0,1	0,7	0,8	0,3*
[79-80[	0,2	0,2	0	0,3	0,5	0,5
[80-81[	0,4	0,6	0,8*	0,4	0,6	0,3
[81-82[	0,4	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
[82-83[	0,1	0,5*	0,2	0,4	0,2	0,2
[83-84[	0,6	0,6	0,5	0,1	0,3	0,4
[84-85[	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1
[85-86[	0,6	0,2*	0,4	0,2	0,2	0,1
[86-87[	0,1	0,2	0,5*	0	0,1	0,2
[87-88[	0	0	0	0,1	0	0
[88-89[	0,2	0	0	0	0	0
[89-92[	0,1	0	0	0	0	0

* indique une différence significative comparée au témoin (n = 10). Données analysées avec le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

3.3. Effets du BaP sur l'expression relative des gènes

Les résultats de la réponse transcriptionnelle au niveau des branchies des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours montrent une variation de l'expression relative des gènes (figure 43). Les gènes *cyp4*, *gst*, *ahr*, *cox1*, *cat*, *sod* et *gpx* sont surexprimés chez les palourdes exposées à 2 µg BaP/L. Les palourdes exposées à 5 µg BaP/L présentent une surexpression des gènes *mdr*, *cytb*, *cox1*, *cat*, *sod* et *gpx*.

De même, une modification de l'expression génétique relative a été notée au niveau de la glande digestive des palourdes contaminées par le BaP (figure 44). L'exposition à 2 µg BaP/L pendant 7 jours a provoqué une répression du gène *cyp4* et une induction des gènes *gst*, *cat* et *sod* au niveau de la glande digestive des palourdes. Concernant l'exposition à 5 µg BaP/L, on observe une sous-expression du gène *cyp4* et une surexpression des gènes *cat* et *sod*.

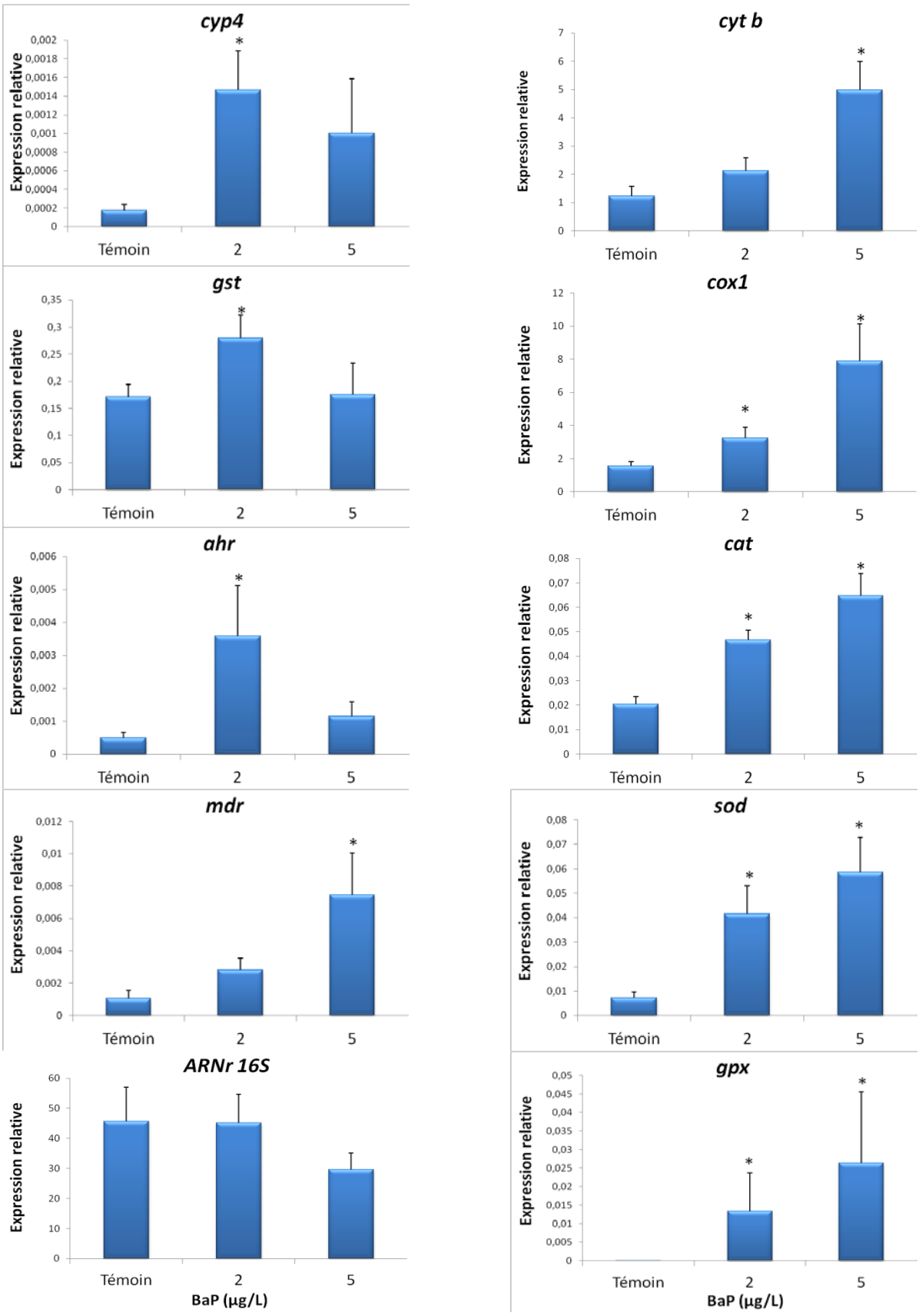


Figure 43 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau des branchies de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours à des concentrations subaiguës de BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

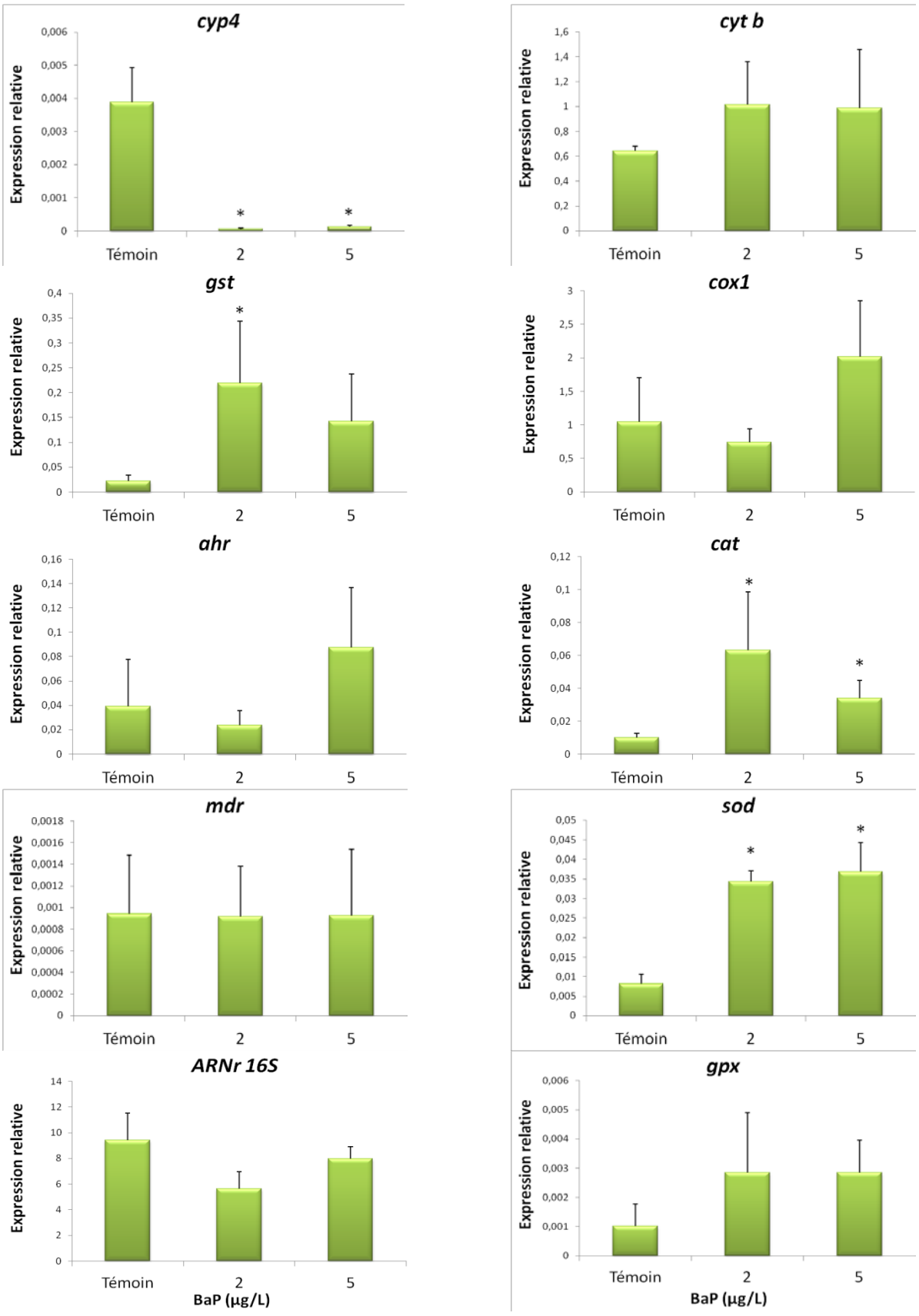


Figure 44 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau de la glande digestive de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours à des concentrations subaiguës de BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

4. REPONSE BIOLOGIQUE DE LA PALOURDE *R. PHILIPPINARUM* EXPOSEE A L'EAU DE MER CONTAMINEE PAR DES CONCENTRATIONS AIGUËS DE BENZO(A)PYRENE

4.1. Effet du BaP sur la réponse biochimique

La réponse des marqueurs biochimiques à une contamination par des concentrations aiguës de BaP (400, 700, 1000 et 1300 µg BaP/L) au niveau des branchies et de la glande digestive de *R. philippinarum* est illustrée dans la figure 45. Pour les branchies, une augmentation significative de l'ordre de 2 fois de l'activité GST a été enregistrée chez les palourdes exposées à 400 et 1300 µg BaP/L par rapport au témoin (DMSO). Les quatre conditions de contamination par le BaP montrent une augmentation significative du taux d'accumulation de MDA et une inhibition significative de l'activité AChE. Alors que l'activité CAT ne présente pas de différences entre le témoin (DMSO) et les palourdes contaminées.

Au niveau de la glande digestive, les palourdes exposées aux quatre concentrations de BaP présentent une augmentation significative du taux d'accumulation de MDA et une diminution significative de l'activité AChE. Ces variations sont plus marquées pour les deux conditions 1000 et 1300 µg BaP/L comparées aux conditions 400 et 700 µg BaP/L. L'analyse des activités GST et CAT ne montre pas de différences significatives entre le témoin (DMSO) et les palourdes contaminées. De plus, le groupe témoin ne présente aucune différence significative par rapport au groupe témoin (DMSO).

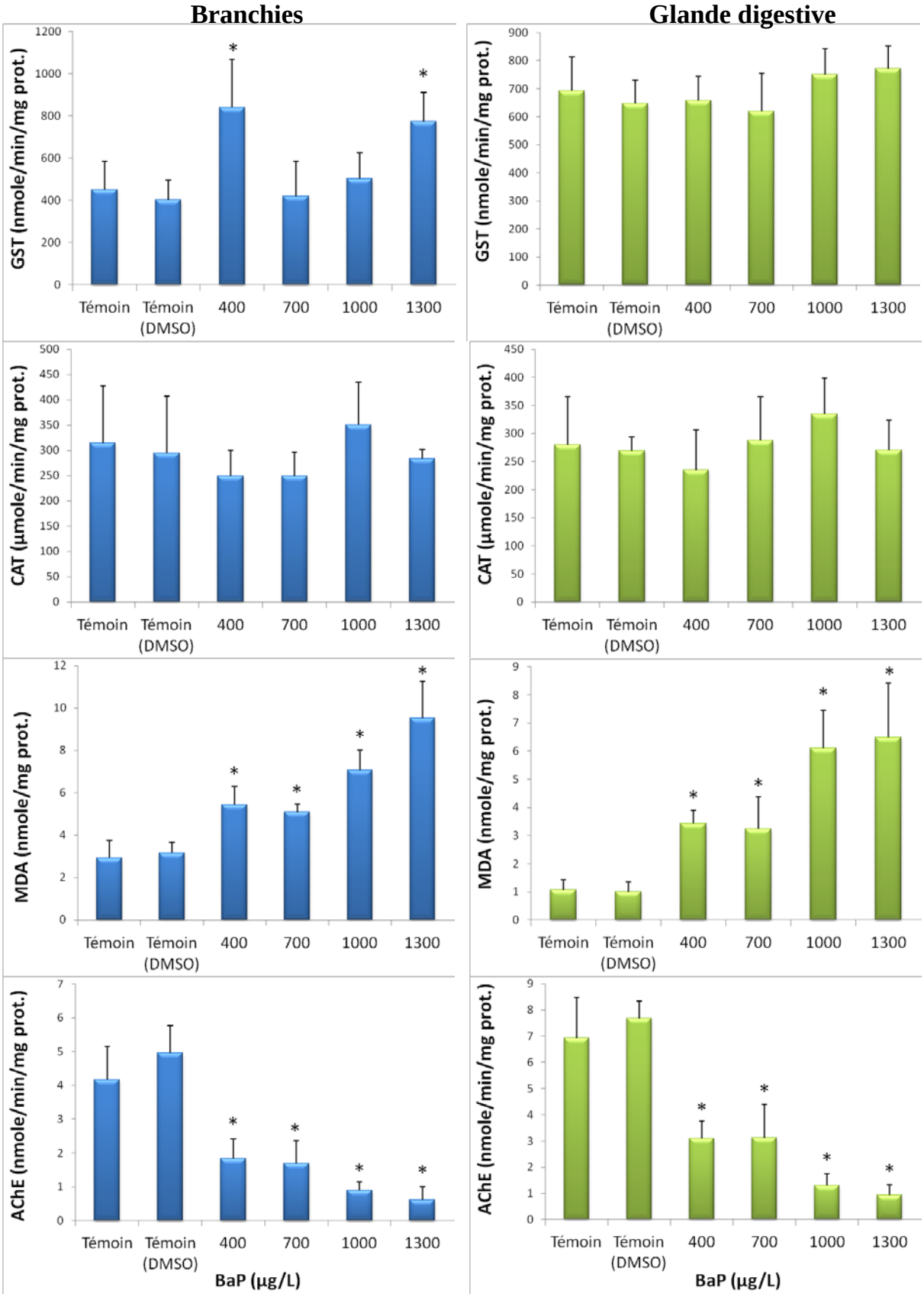


Figure 45 : Réponse des marqueurs biochimiques (GST, CAT, MDA et AChE) au niveau des branchies et de la glande digestive de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours à des concentrations aiguës de BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 6). * indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

4.2. Effet génotoxique du BaP

Les résultats relatifs au nombre de sites d'hybridation des amorces OPB7 et OPB11 au niveau des branchies et de la glande digestive montrent des différences dans la composition de l'ADN entre le témoin (DMSO) et les palourdes exposées aux différentes concentrations de BaP (tableau XXIX). Au niveau des branchies, l'amorce OPB7 montre une diminution significative de du nombre de sites d'hybridation de l'ordre de 8,7 ; 4,1 ; 12, 2 et 12,2 pour les conditions respectives 400, 700, 1000, et 1300 µg BaP/L. De même, l'amorce OPB11 montre une diminution du nombre de sites d'hybridation pour les conditions 700 et 1300 µg BaP/L.

Au niveau de la glande digestive, l'amorce OPB7 montre une augmentation significative du nombre de sites d'hybridation de l'ordre de 28 et 20 fois pour les conditions respectives 700 et 1000 µg BaP/L, alors que l'amorce OPB11 montre une augmentation significative du nombre du site d'hybridation de l'ordre de 2,1 ; 8,1 et 18,2 fois pour les conditions 400, 1000 et 1300 µg BaP/L. Les groupes de témoin et de témoin (DMSO) ne présentent pas de différences dans le nombre de sites d'hybridation en utilisant les deux amorces OPB7 et OPB11.

Tableau XXIX : Nombre des sites d'hybridation relatifs des amorces RAPD par génome au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Organes	Amorces RAPD	Témoin	Témoin (DMSO)	400 µg/L	700 µg/L	1000 µg/L	1300 µg/L
Branchies	OPB7	$(4,8 \pm 1,5).\ 10^{-3}$	$(6,1 \pm 1,8).\ 10^{-3}$	$(0,7 \pm 0,3).\ 10^{-3}$*	$(1,5 \pm 0,4).\ 10^{-3}$*	$(0,5 \pm 0,2).\ 10^{-3}$*	$(0,5 \pm 0,3).\ 10^{-3}$*
	OPB11	$(11,8 \pm 4,6).\ 10^{-4}$	$(6,1 \pm 3,6).\ 10^{-4}$	$(4,4 \pm 2,2).\ 10^{-4}$	$(0,4 \pm 0,1).\ 10^{-4}$*	$(11,8 \pm 6,7).\ 10^{-4}$	$(1,0 \pm 0,6).\ 10^{-4}$*
Glande digestive	OPB7	$(1,2 \pm 0,7).\ 10^{-4}$	$(0,6 \pm 0,3).\ 10^{-4}$	$(1,6 \pm 0,8).\ 10^{-4}$	$(17,1 \pm 6,3).\ 10^{-4}$*	$(12,2 \pm 7,6).\ 10^{-4}$*	$(31,9 \pm 13,3).\ 10^{-4}$
	OPB11	$(0,40 \pm 0,23).\ 10^{-4}$	$(0,34 \pm 0,29).\ 10^{-4}$	$(0,73 \pm 0,29).\ 10^{-4}$*	$(0,90 \pm 0,63).\ 10^{-4}$	$(2,76 \pm 1,26).\ 10^{-4}$*	$(6,19 \pm 2,02).\ 10^{-4}$*

Données représentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 10). * indique une différence significative comparée au témoin selon le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Les fréquences d'apparition des produits de PCR en utilisant l'ADN génomique des branchies des palourdes témoins et contaminées par le BaP sont présentées dans le tableau XXX. Pour les palourdes exposées à 400 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de PCR de T*m* appartenant aux intervalles [81-82[, [86-87[, [88-89[et [89-92[, alors que l'amorce OPB11 montre une augmentation

significative de la fréquence des produits de T*m* appartenant aux intervalles [80-81[, [81-82[et [85-86[par rapport au témoin (DMSO). Pour les palourdes exposées à 700 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence d'apparition des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [78-79[, [79-80[, [82-83[et [86-87[par rapport au témoin (DMSO), alors que l'amorce OPB11 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de T*m* appartenant aux intervalles [78-79[, [82-83[, [83-84[et [85-86[par rapport au témoin (DMSO). Concernant la condition 1000 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre une augmentation significative de la fréquence d'apparition des produits de PCR de T*m* appartenant aux intervalles [74-78[, [79-80[, [81-82[, [84-85[, [86-87[et [87-88[, alors que l'amorce OPB11 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de T*m* appartenant aux intervalles [80-81[, [82-83[, [83-84[, [86-87[par rapport au témoin (DMSO). Pour la condition 1300 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de PCR de T*m* appartenant aux intervalles [74-78[, [79-80[, [82-83[, [84-85[, [85-86[et l'amorce OPB11 montre des différences significatives dans la fréquence d'apparition des produits de T*m* appartenant aux intervalles [74-78[, [80-81[, [82-83[, [83-84[et [86-87[par rapport au témoin (DMSO).

La comparaison des deux groupes de témoin et témoin (DMSO) montre des différences significatives dans la fréquence des produits de PCR de T*m* appartenant aux intervalles [78-79[, [87-88[et [88-89[et des produits de T*m* appartenant aux intervalles [78-79[, [87-88[et [88-89[en utilisant les deux amorces respectives OPB7 et OPB11, ce qui signifie une différence dans la composition de l'ADN génomique en nucléotides entre ces deux groupes de témoins due à l'effet du DMSO.

Tableau XXX : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs T*m* appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau des branchies des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Amorces RAPD	Intervalles de température	Témoin	Témoin (DMSO)	400 µg/L	700 µg/L	1000 µg/L	1300 µg/L
	[74-78[	0,3	0,2	0,3	0,3	0,7*	0,8*
	[78-79[	0,1	0,5[a]	0,2	0,1*	0,2	0,2
	[79-80[	0,1	0	0,1	0,5*	0,6*	0,5*
	[80-81[	0,5	0,3	0,6	0,2	0,2	0,2
	[81-82[	0,3	0,3	0,7*	0,5	0,7*	0,1
	[82-83[	0,2	0,2	0,4	0,6*	0,5	0,7*
OPB7	[83-84[	0,3	0,3	0,6	0,4	0,2	0,2
	[84-85[	0,2	0,2	0,4	0,3	0,8*	0,6*
	[85-86[	0,3	0,6	0,8	0,6	0,4	0,2*
	[86-87[	0,1	0	0,6*	0,5*	0,6*	0,3
	[87-88[	0,7	0,2[a]	0,5	0,1	0,6*	0,4
	[88-89[	0,1	0,6[a]	0,2*	0,4	0,3	0,5
	[89-92[	0,5	0,3	0,7*	0,2	0,5	0,4
	[74-78[	0,1	0,2	0,2	0,1	0,4	0,8*
	[78-79[	0	0,1	0,3	0,5*	0,2	0,3
	[79-80[	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1
	[80-81[	0,5	0,1[a]	0,5*	0,4	0,6*	0,5*
	[81-82[	0,2	0	0,4*	0,3	0,3	0,2
	[82-83[	0,5	0,9[a]	0,7	0,5*	0,4*	0,4*
OPB11	[83-84[	0	0	0,2	0,6*	0,5*	0,7*
	[84-85[	0,6	1[a]	0,8	0,9	0,8	0,9
	[85-86[	0,1	0	0,5*	0,4*	0,2	0,2
	[86-87[	0,6	0,7	0,7	0,5	0,2*	0,1*
	[87-88[	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0
	[88-89[	0	0	0	0	0,1	0
	[89-92[	0,9	0,9	0,7	0,6	0,7	0,8

* indique une différence significative des fréquences d'apparition des pics comparée au témoin (DMSO). [a] indique une différence significative des fréquences d'apparition des pics comparée au témoin (n = 10). Données analysées avec le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Les fréquences d'apparition des produits de PCR en utilisant l'ADN génomique de la glande digestive des palourdes témoins et contaminées par le BaP sont présentées dans le tableau XXXI. Pour la condition 400 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [80-81[, [81-82[et [85-86[, alors que l'amorce OPB11 montre une diminution significative des produits de PCR ayant des T*m* appartenant à l'intervalle [82-83[par rapport au témoin (DMSO). Pour la condition 700 µg BaP/L, les amorces OPB7 et OPB11 montrent une augmentation significative de la fréquence des produits de PCR ayant des T*m* appartenant, respectivement, aux intervalles [74-78[, [82-83[et [85-86[et aux intervalles [74-78[et [83-84[par rapport au témoin (DMSO). En comparant les palourdes de la condition 1000 µg BaP/L avec le témoin (DMSO), l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence d'apparition des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [74-78[, [80-81[, [81-82[et [82-83[, alors que l'amorce OPB11 montre des différences significatives dans la fréquence des produits dont les T*m* appartiennent aux intervalles [74-78[, [81-82[, [83-84[et [88-89[. Concernant la condition 1300 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre une augmentation significative de la fréquence des produits ayant des T*m* appartenant aux intervalles [80-81[, [82-83[, [83-84[, [85-86[et [86-87[, alors que l'amorce OPB11 montre des différences significatives dans la fréquence des produits dont les T*m* appartiennent aux intervalles [74-78[, [79-80[, [82-83[et [83-84[par rapport au témoin (DMSO). Le groupe témoin (DMSO) montre une diminution significative de la fréquence des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [83-84[et [85-86[en utilisant l'amorce OPB7 et une augmentation de la fréquence des produits ayant des T*m* appartenant à l'intervalle [84-85[en utilisant l'amorce OPB11, par rapport au groupe témoin.

Tableau XXXI : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs T*m* appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau de la glande digestive des palourdes exposées au BaP pendant 7 jours et témoin.

Amorces RAPD	Intervalles de température	Témoin	Témoin (DMSO)	400 µg/L	700 µg/L	1000 µg/L	1300 µg/L
	[74-78[	0,2	0,2	0,3	0,6*	0,7*	0,3
	[78-79[	0,1	0,3	0,1	0,4	0,2	0,6
	[79-80[	0,4	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1
	[80-81[	0,3	0,1	0,5*	0,4	0,6*	0,5*
	[81-82[	0,5	0,5	0,1*	0,3	0,1*	0,2
	[82-83[	0,2	0	0,1	0,5*	0,4*	0,6*
OPB7	[83-84[	0,7	0,3[a]	0,2	0,3	0,1	0,8*
	[84-85[	0,3	0,4	0,4	0,1	0,2	0,4
	[85-86[	0,5	0,1[a]	0,6*	0,6*	0,4	0,5*
	[86-87[	0	0	0	0,1	0,2	0,4*
	[87-88[	0,2	0,1	0,3	0,1	0	0,2
	[88-89[	0	0	0,1	0	0,1	0,1
	[89-92[	0	0	0	0	0	0
	[74-78[	0,4	0,1	0,3	0,5*	0,6*	0,6*
	[78-79[	0,3	0,5	0,4	0,2	0,5	0,3
	[79-80[	0,2	0,3	0,2	0,4	0,6	0,8*
	[80-81[	0,6	0,4	0,3	0,3	0,1	0,2
	[81-82[	0,4	0,5	0,5	0,2	0,1*	0,3
	[82-83[	0,7	0,7	0,2*	0,5	0,4	0,1*
OPB11	[83-84[	0,2	0	0,1	0,4*	0,5*	0,4*
	[84-85[	0,1	0,5[a]	0,3	0,2	0,3	0,4
	[85-86[	0,4	0,2	0,4	0,5	0,5	0,1
	[86-87[	0,2	0,4	0,3	0,4	0,2	0,3
	[87-88[	0	0,3	0,1	0,2	0	0,2
	[88-89[	0,2	0,2	0,1	0,3	0,6*	0,4
	[89-92[	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3

* indique une différence significative des fréquences d'apparition des pics comparée au témoin (DMSO). [a] indique une différence significative des fréquences d'apparition des pics par rapport au témoin (n = 10). Données analysées avec le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

4.3. Effets du BaP sur l'expression relative des gènes

Les niveaux de l'expression relative des gènes analysés au niveau des branchies des palourdes témoins et contaminées sont présentés dans la figure 46. Les différentes conditions de contamination sont comparées au témoin (DMSO). Chez les palourdes exposées à 400 µg BaP/L, les gènes *cyp4*, *gst*, *ahr*, *mdr*, *cytb*, *cox1* et *gpx* sont surexprimés alors que les gènes *ARNr 16S* et *sod* sont sous exprimés. Cependant, les palourdes exposées à 700 µg BaP/L présentent une induction significative de l'expression des gènes *ahr*, *mdr* et *gpx* et une régression des gènes *cyp4*, *ARNr 16S*, *cytb*, *cox1*, *cat* et *sod*. Les branchies des palourdes exposées à 1000 µg BaP/L montrent une surexpression des gènes *ahr*, *gpx* et *cat* et une sous expression des gènes *cyp4*, *ARNr 16S*, *cytb*, *cox1* et *sod*. L'exposition des palourdes à 1300 µg BaP/L pendant 7 jours montre une diminution importante de l'expression des gènes *cyp4*, *gst*, *ahr*, *ARNr 16S*, *cytb*, *cox1*, *sod* et *gpx*. Une comparaison entre les quatre conditions de contamination montre une sous expression des gènes *cyp4*, *gst*, *ahr*, *mdr*, *ARNr 16S*, *cytb*, *cox1*, et *sod* pour les conditions 700, 1000 et 1300 µg BaP/L par rapport à la condition 400 µg BaP/L. De plus, la condition 700 µg BaP/L présente le niveau d'expression génétique le plus faible pour le gène *cat*. Le gène *gpx* présente une augmentation progressive du niveau de l'expression relative en allant de la condition 400 µg BaP/L à la condition 1000 µg BaP/L, alors que la condition 1300 µg BaP/L présente une régression importante de l'expression de ce gène. Le groupe de témoin (DMSO) montre une augmentation significative de l'expression du gène *ARNr 16S* par rapport au témoin, due à l'effet du solvant DMSO.

La réponse transcriptionelle au niveau de la glande digestive des palourdes témoins et contaminées est présentée dans la figure 47. Les gènes *ARNr 16S*, *cytb*, *cox1* et *sod* présentent une diminution significative de l'expression relative pour les conditions 400, 700, 1000 et 1300 µg BaP/L par rapport au témoin (DMSO). Tandis que, les gènes *ahr* et *gpx* présentent une augmentation significative de l'expression pour les quatre conditions de contamination par rapport au témoin (DMSO). Les gènes *cyp4* et *gst* sont surexprimés chez les palourdes exposées à 400 µg BaP/L. Le gène *mdr* est surexprimé chez les palourdes exposées à 400 et 700 µg BaP/L. La comparaison entre les quatre conditions de contamination montre une régression de l'expression des gènes *cyp4*, *gst*, *ARNr 16S*, *cytb* et *sod* pour les conditions 700, 1000 et 1300 µg BaP/L par rapport à la condition 400 µg BaP/L. L'expression du gène *mdr* diminue pour les conditions 1000 et 1300 µg BaP/L par rapport aux conditions 400 et 700 µg BaP/L. Le gène *gpx* présente une augmentation progressive du niveau d'expression en allant de la plus faible concentration à la plus forte concentration de BaP. Le gène *ahr* présente une

diminution du niveau d'expression pour la condition 1300 µg BaP/L par rapport aux autres conditions de contamination. Alors que le gène *cat* ne présente aucune différence significative. Le groupe de témoin (DMSO) montre une augmentation significative de l'expression du gène *ARNr 16S* avec une augmentation (non significative) de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial (*cytb* et *cox1*), par rapport au témoin.

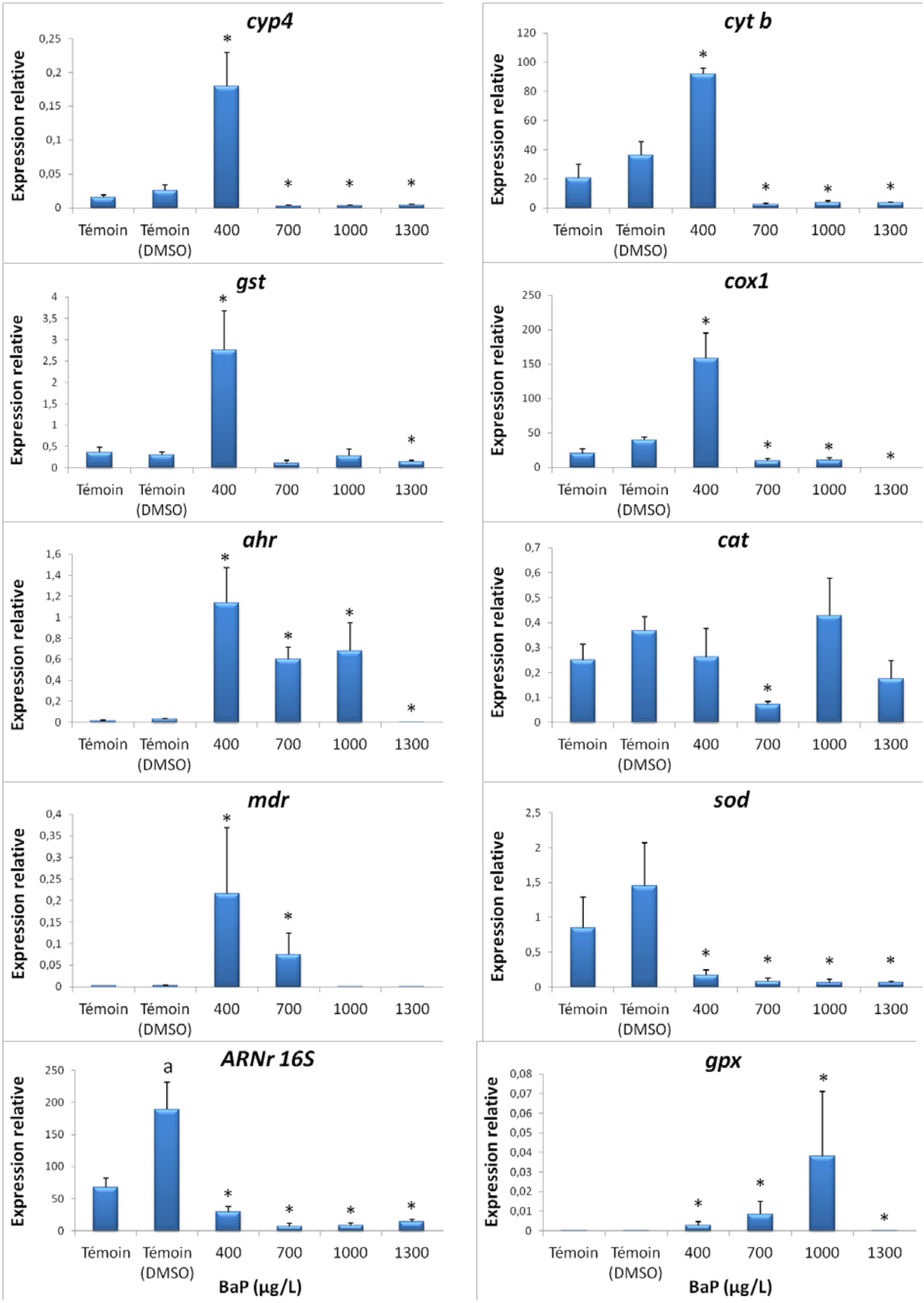


Figure 46 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau des branchies de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours à des concentrations aiguës de BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin (DMSO), [a] indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA sur rangs et les tests de Tukey et de Dunn, p<0,05.

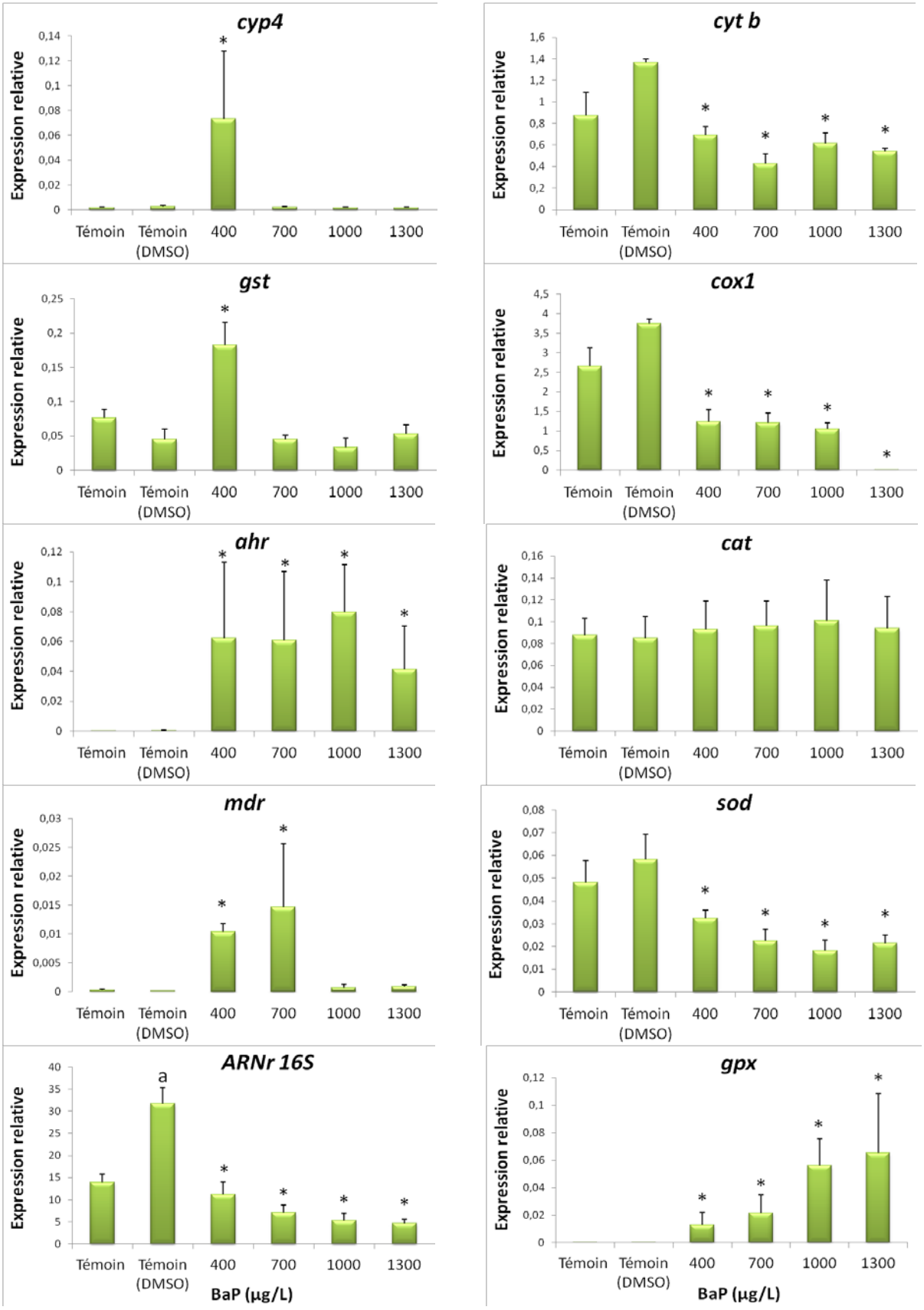


Figure 47 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau de la glande digestive de *R. philippinarum* exposée pendant 7 jours à des concentrations aiguës de BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin (DMSO), [a] indique une différence significative comparée au témoin selon ANOVA sur rangs et les tests de Tukey et de Dunn, p<0,05.

5. ETUDE CINETIQUE DE LA TOXICOLOGIE DU BENZO(A)PYRENE CHEZ LA PALOURDE *R. PHILIPPINARUM*

5.1. Cinétique des effets biochimiques du BaP chez la palourde *R. philippinarum*

Les variations des marqueurs biochimiques au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes exposées à 10 µg/L de BaP pendant 1, 3, 7 et 14 jours sont présentées dans la figure 48. Au niveau des branchies, une augmentation significative de l'activité GST a été notée après 1 et 14 jours d'exposition au BaP. L'activité CAT montre une augmentation significative après 1, 3 et 14 jours d'exposition au BaP. Les palourdes exposées au BaP pendant 1, 7 et 14 jours montrent une augmentation significative du taux d'accumulation de MDA. Les palourdes exposées au BaP pendant 1 et 3 jours montrent une diminution significative de l'activité AChE.

Au niveau de la glande digestive, les palourdes présentent une augmentation significative de l'activité GST après 7 jours d'exposition au BaP. L'activité CAT montre une augmentation significative chez les palourdes exposées au BaP pendant 1 et 7 jours. Après 3, 7 et 14 jours d'exposition, les palourdes présentent une augmentation significative du taux d'accumulation de MDA. Une inhibition significative de l'activité AChE chez les palourdes exposées au BaP pendant 1, 3, 7 et 14 jours.

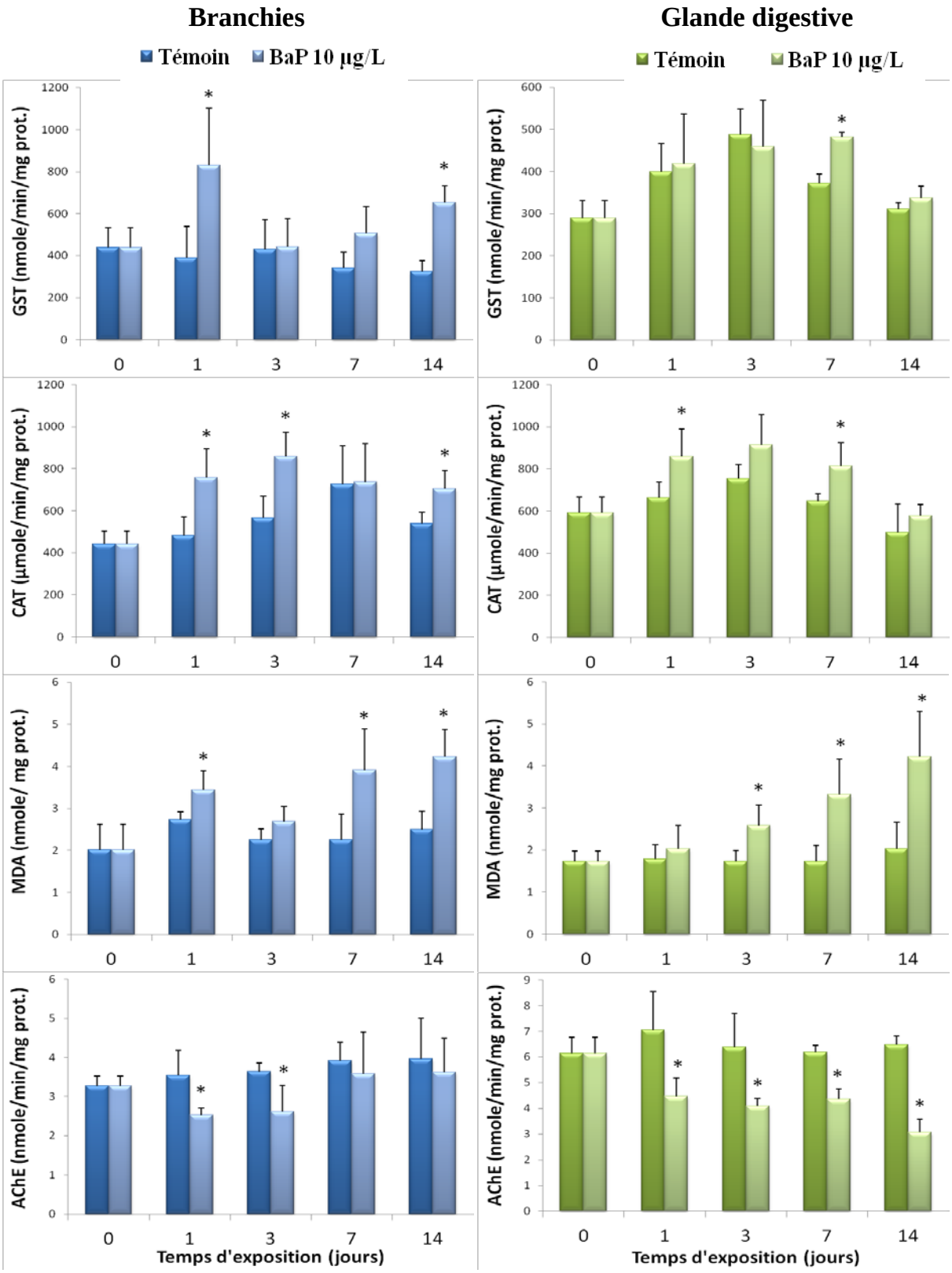


Figure 48 : Réponse des marqueurs biochimiques (GST, CAT, MDA et AChE) au niveau des branchies et de la glande digestive de *R. philippinarum* exposée pendant 1, 3, 7 et 14 jours au BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 6). * indique une différence significative comparée au témoin pour la même période d'exposition, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

5.2. Cinétique des effets génotoxiques du BaP chez la palourde *R. philippinarum*

Les résultats relatifs au nombre de sites d'hybridation pour les amorces OPB7 et OPB11 au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes exposées pendant différentes périodes à 10 µg BaP/L sont présentés dans le tableau XXXII.

Au niveau des branchies, l'amorce OPB7 montre une augmentation significative de 2 fois du nombre de sites d'hybridation chez les palourdes exposées à 10 µg BaP/L pendant 14 jours. L'amorce OPB11 ne montre aucune différence significative entre les palourdes contaminées et les témoins.

Au niveau de la glande digestive, l'amorce OPB7 montre une diminution significative de 4,6 fois du nombre de sites d'hybridation pour les palourdes exposées à 10 µg BaP/L pendant 14 jours. Pour l'amorce OPB11, on a enregistré une augmentation significative du nombre de site d'hybridation pour les palourdes exposées à 10 µg BaP/L pendant 3 et 7 jours et 14 jours.

Tableau XXXII : Nombre des sites d'hybridation relatifs des amorces RAPD par génome au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes exposées à 10 µg BaP/L pendant différentes périodes et témoin.

Organes	Amorces RAPD	Témoin 1j	BaP 1j	Témoin 3j	BaP 3j	Témoin 7j	BaP 7j	Témoin 14j	BaP 14j
Branchies	OPB7	$(8,5 \pm 2,2).10^{-4}$	$(21,6 \pm 8,9).10^{-4}$	$(12,1 \pm 1,8).10^{-4}$	$(8,4 \pm 2,0).10^{-4}$	$(17,9 \pm 5,8).10^{-4}$	$(5,8 \pm 2,0).10^{-4}$	$(10,1 \pm 2,7).10^{-4}$	$(20,1 \pm 3,3).10^{-4*}$
	OPB11	$(1,9 \pm 0,4).10^{-4}$	$(1,0 \pm 0,4).10^{-4}$	$(3,2 \pm 0,7).10^{-4}$	$(1,7 \pm 0,4).10^{-4}$	$(2,7 \pm 1,1).10^{-4}$	$(0,8 \pm 0,3).10^{-4}$	$(2,3 \pm 1,1).10^{-4}$	$(6,3 \pm 1,8).10^{-4}$
Glande digestive	OPB7	$(5,9 \pm 2,4).10^{-4}$	$(3,7 \pm 1,3).10^{-4}$	$(3,3 \pm 1,7).10^{-4}$	$(1,7 \pm 0,9).10^{-4}$	$(2,3 \pm 1,0).10^{-4}$	$(0,4 \pm 0,1).10^{-4}$	$(3,7 \pm 1,2).10^{-4}$	$(0,8 \pm 0,4).10^{-4*}$
	OPB11	$(6,3 \pm 3,1).10^{-4}$	$(24,2 \pm 12,7).10^{-4}$	$(3,0 \pm 1,2).10^{-4}$	$(10,1 \pm 0,05).10^{-4*}$	$(1,5 \pm 0,9).10^{-4}$	$(91,5 \pm 61,2).10^{-4*}$	$(4,2 \pm 1,9).10^{-4}$	$(2056 \pm 1994).10^{-4*}$

Résultats exprimés en moyenne ± SEM (n = 10). * indique une différence significative comparée au témoin durant la même période d'exposition selon le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

L'analyse qualitative, au niveau des branchies, des produits de PCR pour les deux amorces OPB7 et OPB11 montre des différences significatives dans la fréquence d'apparition des produits entre les palourdes contaminées et les témoins pour les quatre périodes d'exposition (tableau XXXIII). Après 1 jours d'exposition à 10 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre des différences dans la fréquence d'apparition des produits ayant des T*m* appartenant aux intervalles [74-78[, [86-87[et [89-92[, alors que l'amorce OPB11 montre des différences dans la fréquence des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [74-78[, [78-79[, [81-82[, [83-84[et [84-85[par rapport au témoin. Après 3 jours d'exposition, OPB7 montre une diminution de la fréquence des produits de T*m* appartenant à l'intervalle [74-78[, alors que l'OPB11 montre des différence significatives dans la fréquence des produits ayant des T*m* appartenant aux intervalles [78-79[, [79-80[, [82-83[, [83-84[et [84-85[par rapport au témoin. Pour les palourdes exposées au BaP pendant 7 jours, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [74-78[, [80-81[, [81-82[et [88-89[, alors que l'amorce OPB11 montre des différence significatives dans la fréquence des produits ayant des T*m* appartenant aux intervalles [74-78[, [79-80[, [80-81[et [84-85[par rapport au témoin. Concernant les palourdes contaminées pendant 14 jours, l'amorce OPB7 montre des différences dans la fréquence d'apparition des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [82-83[, [85-86[, [86-87[et [88-89[, alors que l'amorce OPB11 montre des différences dans la fréquence des produits de T*m* appartenant aux intervalles [74-78[, [79-80[, [80-81[et [84-85[par rapport au témoin.

Tableau XXXIII : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs T*m* appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau des branchies des palourdes exposées à 10 µg BaP/L pendant différentes périodes et témoin.

Amorces RAPD	Intervalles de température	Témoin 1j	BaP 1j	Témoin 3j	BaP 3j	Témoin 7j	BaP 7j	Témoin 14j	BaP 14j
	[74-78[	0	0,7*	0,4	0*	0	0,5*	0	0,3
	[78-79[	0	0,2	0,1	0,4	0	0,1	0	0,1
	[79-80[	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,5	0,2	0,1
	[80-81[	0,3	0,4	0,2	0,4	0,6	0,1*	0,4	0,3
	[81-82[	0,5	0,5	0,6	0,5	0,4	0,9*	0,2	0,4
	[82-83[	0,2	0,2	0	0,2	0,3	0,1	0,1	0,5*
OPB7	[83-84[	0,3	0,3	0,3	0,1	0,5	0,4	0,4	0,4
	[84-85[	0,4	0,4	0,6	0,9	0,4	0,6	0,5	0,3
	[85-86[	0,2	0,3	0	0	0,1	0,1	0,1	0,5*
	[86-87[	0,8	0,1*	0,9	0,8	0,7	0,6	0,8	0,3*
	[87-88[	0	0,3	0	0,1	0	0	0	0,1
	[88-89[	0,1	0,1	0	0	0,7	0*	0,4	0*
	[89-92[	0,7	0,1*	0,9	0,7	0,4	0,3	0,6	0,7
	[74-78[	0,1	0,8*	0,6	0,8	0,3	0,8*	0,4	0,9*
	[78-79[	0,6	0,2*	0,2	0,6*	0,3	0,3	0,2	0,4
	[79-80[	0,1	0,2	0,5	0,1*	0,7	0,2*	0,6	0,2*
	[80-81[	0,5	0,3	0,6	0,8	0,2	0,7*	0,3	0,8*
	[81-82[	0,1	0,5*	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	0
	[82-83[	0,4	0,3	0,1	0,5*	0,3	0,3	0,5	0,3
OPB11	[83-84[	0,5	0,1*	0,8	0,3*	0,4	0,4	0,6	0,3
	[84-85[	0,1	0,5*	0	0,4*	0,5	0,1*	0,2	0,6*
	[85-86[	0,2	0,2	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,1
	[86-87[	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0
	[87-88[	0,2	0,3	0,3	0,3	0,5	0,2	0,4	0,3
	[88-89[	0	0,2	0,1	0	0	0,1	0,1	0,1
	[89-92[	0,2	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0	0,2

* indique une différence significative des fréquences d'apparition des pics comparée au témoin durant la même période d'exposition (n = 10). Données analysées avec le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Les résultats de la fréquence d'apparition des produits de PCR en utilisant l'ADN génomique de la glande digestive des palourdes contaminées et témoins sont présentés dans le tableau XXXIV. Après 1 jours d'exposition à 10 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre une augmentation significative de la fréquence d'apparition des produits de PCR de T*m* appartenant à l'intervalle [78-79[, alors que l'amorce OPB11 montre une diminution de la fréquence des produits ayant des T*m* appartenant aux intervalles [74-78[et [86-87[par rapport au témoin. Après 3 jours d'exposition au BaP, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [74-78[et [87-88[, alors que l'amorce OPB11 montre une diminution significative de la fréquence des produits de T*m* appartenant à l'intervalle [86-87[par rapport au témoin. Pour les palourdes exposées au BaP pendant 7 jours, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [78-79[, [79-80[, [80-81[, [81-82[et [82-83[, alors que l'amorce OPB11 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de T*m* appartenant aux intervalles [74-78[, [80-81[, [83-84[et [84-85[par rapport au témoin. Concernant les palourdes exposées au BaP pendant 14 jours, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de PCR de T*m* appartenant aux intervalles [78-79[, [79-80[, [84-85[et [86-87[, alors que l'amorce OPB11 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [74-78[, [80-81[, [82-83[et [85-86[par rapport au témoin.

Tableau XXXIV : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs T*m* appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau de la glande digestive des palourdes exposées à 10 µg BaP/L pendant différentes périodes et témoin.

Amorces RAPD	Intervalles de température	Témoin 1j	BaP 1j	Témoin 3j	BaP 3j	Témoin 7j	BaP 7j	Témoin 14j	BaP 14j
	[74-78[	0	0	0	0,4*	0,1	0,1	0	0,1
	[78-79[	0,2	0,7*	0,1	0,1	0,1	0,5*	0,1	0,5*
	[79-80[	0,3	0,3	0,7	0,4	0,6	0,1*	0,6	0,1*
	[80-81[	0,5	0,2	0,1	0,3	0,1	0,5*	0,2	0,2
	[81-82[	0,2	0,4	0,7	0,4	0,2	0,6*	0,3	0,4
	[82-83[	0,5	0,4	0,2	0,1	0,6	0,2*	0,5	0,2
OPB7	[83-84[	0,2	0,2	0	0,2	0,2	0,3	0,3	0,5
	[84-85[	0,5	0,4	0,7	0,5	0,4	0,5	0,7	0,3*
	[85-86[	0,1	0,4	0,1	0	0,2	0,2	0,2	0
	[86-87[	0,2	0,2	0,3	0,4	0,2	0,4	0,3	0,7*
	[87-88[	0,2	0,4	0,6	0,2*	0,1	0	0,2	0,2
	[88-89[	0,1	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1
	[89-92[	0	0	0	0	0	0,1	0	0,1
	[74-78[	0,8	0,2*	0,9	0,7	0,8	0,1*	0,8	0,3*
	[78-79[	0	0	0,2	0,3	0,2	0	0,1	0
	[79-80[	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0	0,2	0
	[80-81[	0,6	0,5	0,5	0,7	0,5	1*	0,5	1*
	[81-82[	0,1	0	0,1	0,3	0,2	0	0,2	0
	[82-83[	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,5*
OPB11	[83-84[	0,7	0,4	0,2	0,2	0,2	0,8*	0,3	0,4
	[84-85[	0	0,1	0,4	0,4	0,4	0*	0,3	0
	[85-86[	0	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0	0,4*
	[86-87[	0,7	0,2*	0,6	0,1*	0,6	0,8	0,7	0,6
	[87-88[	0	0	0	0,2	0,1	0	0,1	0
	[88-89[	0	0	0	0	0	0	0	0
	[89-92[	0	0	0,1	0	0	0	0	0

* indique une différence significative des fréquences d'apparition des pics comparée au témoin durant la même période d'exposition (n = 10). Données analysées avec le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

5.3. Cinétique des effets du BaP sur l'expression relative des gènes chez la palourde *R. philippinarum*

L'expression relative des gènes au niveau des branchies des palourdes contaminées et témoins sont présentés dans la figure 49. Après une exposition à 10 µg BaP/L pendant 1 jour, les palourdes présentent une augmentation significative de l'expression des gènes *cyp4*, *gst*, *ahr*, *cox1*, *cat* et *sod* par rapport au témoin. Après 3 jours d'exposition, on observe une augmentation significative de l'expression des gènes *cyp4*, *ahr*, *cox1* et cat et une diminution significative du gène *ARNr 16S*. Les palourdes exposées pendant 7 jours au BaP présentent une régression significative des gènes *mdr*, *cytb* et *sod*. Alors que les palourdes exposées au BaP pendant 14 jours présentent seulement une augmentation significative de l'expression du gène *ARNr 16S*.

L'expression relative des gènes au niveau de la glande digestive des palourdes contaminées et témoins sont présentés dans la figure 50. Les palourdes exposées au BaP (10 µg/L) pendant 1 jour présentent une augmentation de l'expression des gènes *ahr* et *cox1* et une diminution de l'expression du gène *sod*. Après 3 jours d'exposition, les palourdes présentent une augmentation significative du gène *cytb*. Chez les palourdes exposées pendant 7 jours, le gène *cyp4* est sous exprimé alors que le gène *sod* est surexprimé. Après 14 jours d'exposition, les palourdes présentent une augmentation significative des gènes *ARNr 16S*, *cox1*, *sod* et *gpx*.

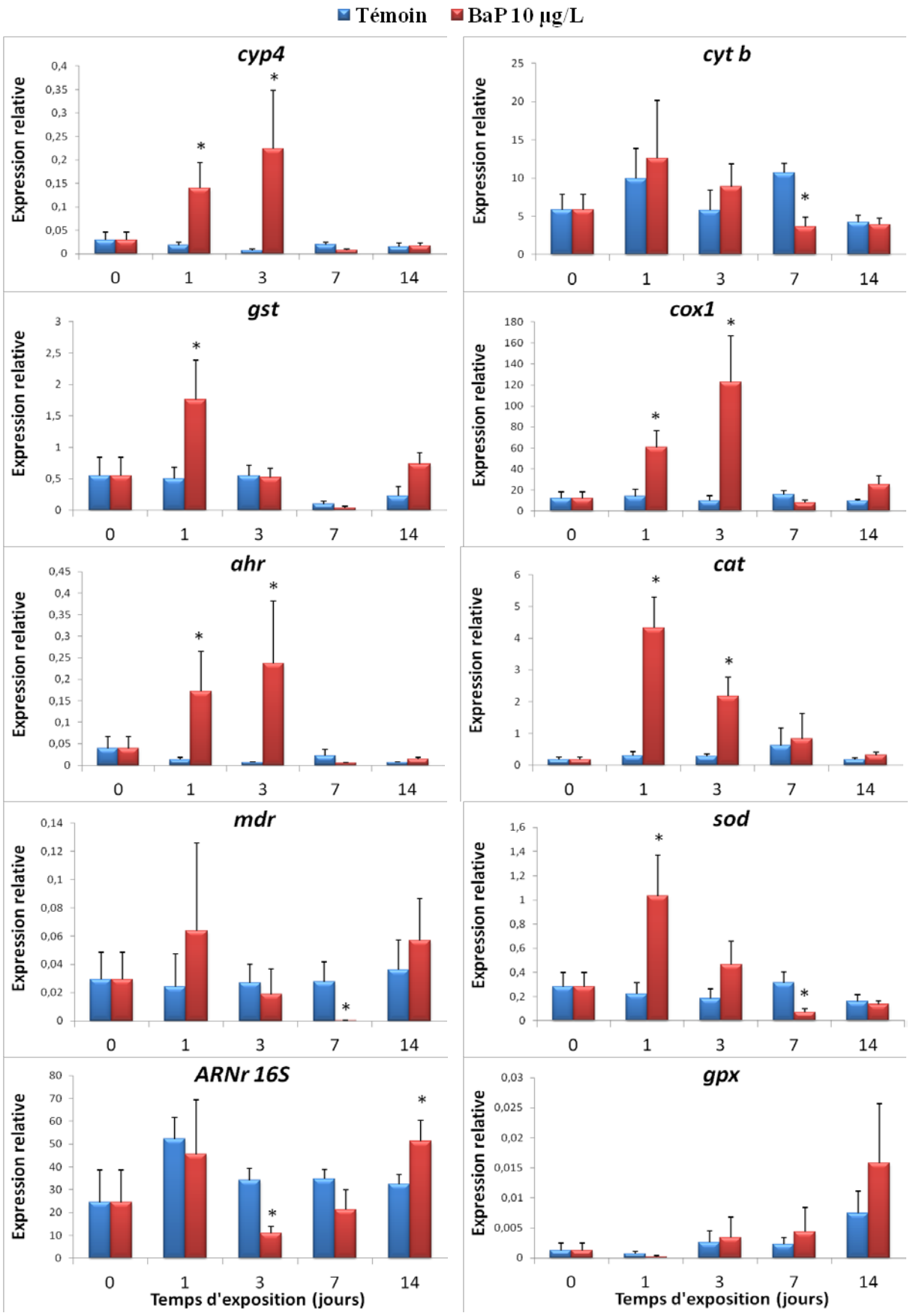


Figure 49 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau des branchies de *R. philippinarum* exposée pendant 1, 3, 7 et 14 jours à 10 µg BaP/L. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin pour la même période d'exposition, selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

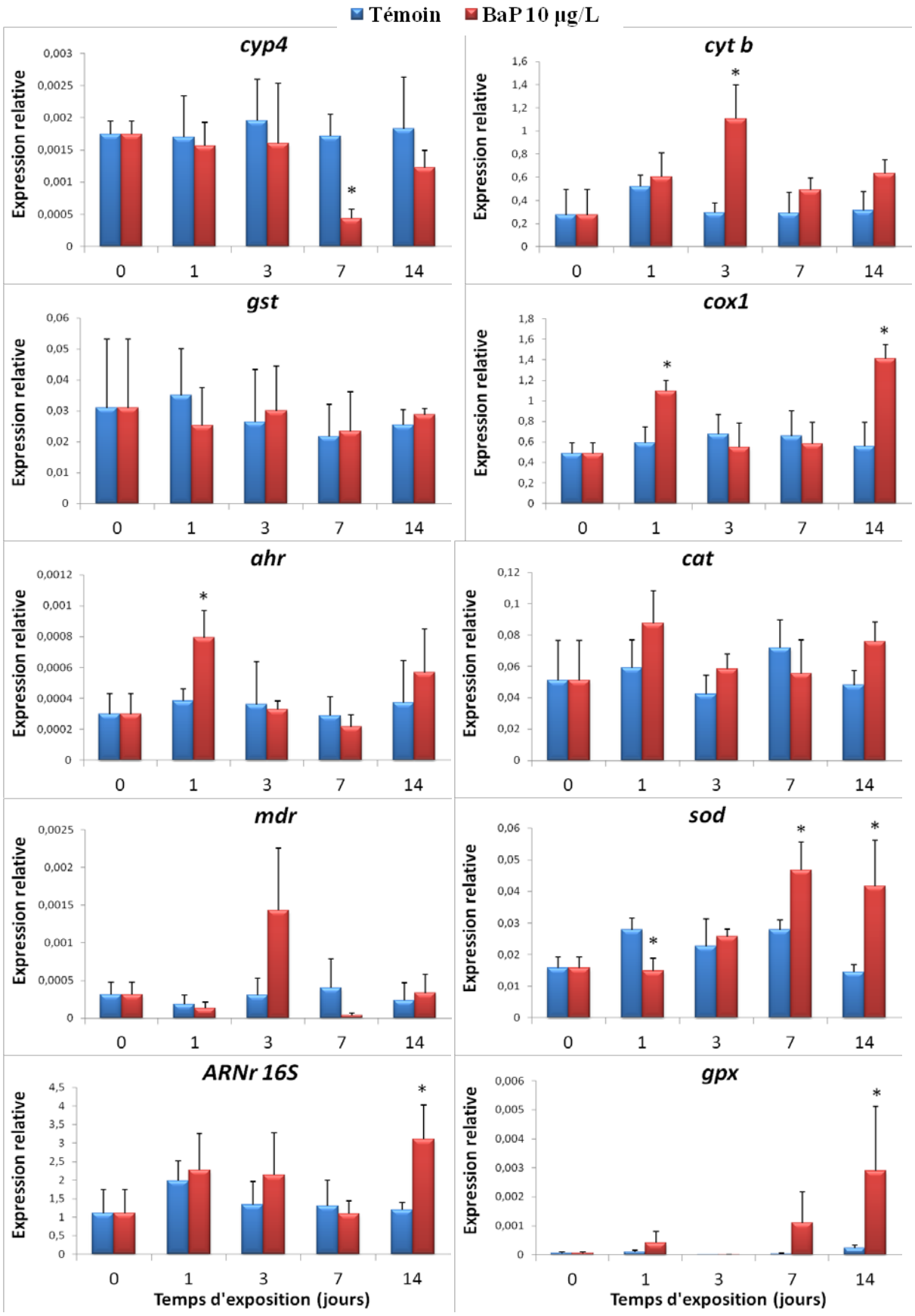


Figure 50 : Expressions génétiques relatives des 10 gènes étudiés au niveau de la glande digestive de *R. philippinarum* exposée pendant 1, 3, 7 et 14 jours à 10 µg BaP/L. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin pour la même période d'exposition, selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

6. REPONSE BIOLOGIQUE DE L'HUITRE *CRASSOSTREA GIGAS* EXPOSEE A DES CONCENTRATIONS SUBAIGUËS ET AIGUES DE BENZO(A)PYRENE

6.1. Effets du BaP sur la réponse biochimique chez l'huître *C. gigas*

Les variations des marqueurs biochimiques au niveau des branchies et de la glande digestive des huîtres sont présentées dans la figure 51.

Pour les branchies, une augmentation significative de l'activité GST et du taux d'accumulation de MDA a été enregistrée chez les huîtres exposée aux différentes concentrations de BaP (5, 20, 100, 400 et 1000 µg/L) pendant 7 jours par rapport au témoin (DMSO). Les huîtres des conditions 20, 100, 400 et 1000 µg BaP/L présentent une augmentation significative de l'axtivité CAT et une diminution significative de l'activité AChE. Une comparaison entre les différentes conditions de contamination montre une augmentation progressive du taux d'accumulation de MDA et une inhibition progressive de l'activité AChE en fonction de la concentration de BaP. L'activité CAT présente une augmentation progressive en fonction de la concentration de BaP avec une légère régression à la concentration 1000 µg/L.

Concernant la glande digestive, une augmentation significative de l'activité CAT et du taux d'accumulation de MDA a été notée chez les huîtres exposées aux différentes concentrations de BaP par rapport au témoin (DMSO). Les huîtres exposées à 5, 20 et 100 µg BaP/L présentent une augmentation significative de l'activité GST, alors que les huîtres exposées 400 et 1000 µg BaP/L présentent une inhibition de l'activité GST par rapport au témoin (DMSO). De plus, une diminution de l'activité AChE a été enregistrée chez les huîtres exposées à 20, 100, 400 et 1000 µg BaP/L. Une comparaison entre les différentes conditions de contamination montre une augmentation progressive du taux d'accumulation de MDA et une inhibition progressive de l'activité AChE en fonction de la concentration de BaP. Une diminution de l'activité GST a été enregistrée pour les conditions 400 et 1000 µg BaP/L par rapport aux conditions 5, 20 et 100 µg BaP/L. La plus forte activité CAT a été enregistrée chez les huîtres exposées à 1000 µg BaP/L.

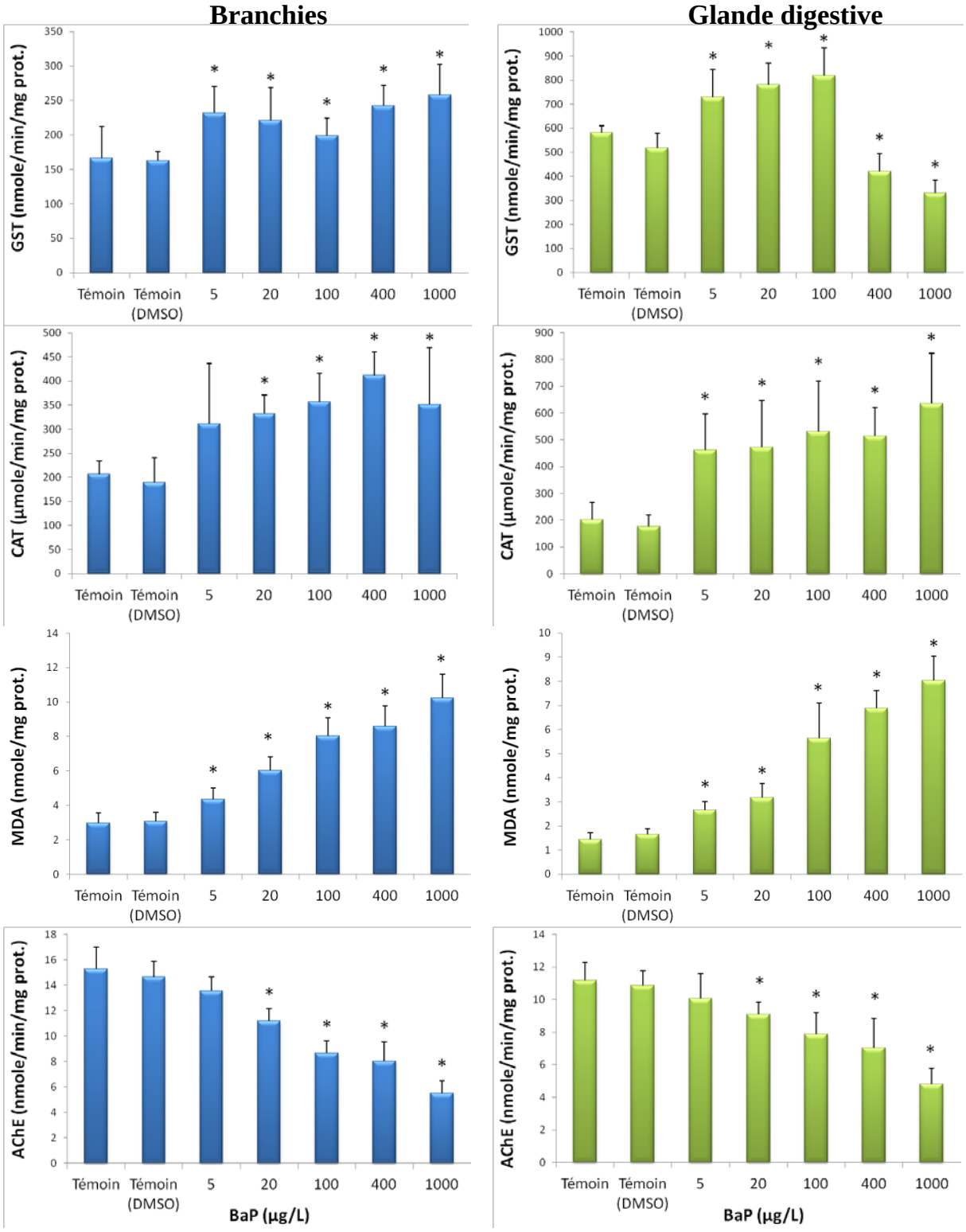


Figure 51 : Réponse des marqueurs biochimiques (GST, CAT, MDA et AChE) au niveau des branchies et de la glande digestive de *C. gigas* exposée pendant 7 jours au BaP (5, 20, 100, 400 et 1000 µg/L). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 6). * indique une différence significative comparée au témoin, selon ANOVA à sens unique et le test de Duncan, $p < 0,05$.

6.2. Effet génotoxique du BaP chez l'huître *C. gigas*

Les résultats relatifs au nombre de sites d'hybridation des amorces OPB7 et OPB11 au niveau des branchies et de la glande digestive des huîtres contaminées et témoins sont rapportés dans le tableau XXXV. Au niveau des branchies, l'OPB7 montre une augmentation significative (3 fois) du nombre de sites d'hybridation pour la condition 5 µg BaP/L et une diminution significative du nombre de sites d'hybridation de l'ordre de 2,4 ; 23 ; 15,4 et 138 fois pour les conditions respectives 20, 100, 400 et 1000 µg BaP/L par rapport au témoin (DMSO). L'amorce OPB11 montre une augmentation significative (31 fois) du nombre de sites d'hybridation pour la condition 5 µg BaP/L et une diminution significative du nombre de sites d'hybridation de l'ordre de 2,6 et 2,3 pour les conditions respectives 400 et 1000 µg BaP/L par rapport au témoin (DMSO).

Au niveau de la glande digestive, l'amorce OPB7 montre une augmentation significative du nombre de sites d'hybridation de l'ordre de 4 et 159 fois pour les conditions respectives 20 et 400 µg BaP/L. Alors que l'amorce OPB11 montre une diminution significative (45 fois) du nombre de sites d'hybridation pour la condition 400 µg BaP/L.

Tableau XXXV : Nombre de sites d'hybridation relatifs des amorces RAPD par génome au niveau des branchies et de la glande digestive des huîtres exposées à différentes concentrations de BaP (5, 20, 100, 400 et 1000 µg/L) pendant 7 jours et témoin.

Organes	Amorces RAPD	Témoin	Témoin (DMSO)	5 µg/L	20 µg/L	100 µg/L	400 µg/L	1000 µg/L
Branchies	OPB7	$(18,9 \pm 3,0).10^{-3}$	$(27,7 \pm 5,6).10^{-3}$	$(80,9 \pm 9,5).10^{-3}$*	$(11,6 \pm 2,5).10^{-3}$*	$(1,2 \pm 0,4).10^{-3}$*	$(1,8 \pm 1,0).10^{-3}$*	$(0,2 \pm 0,1).10^{-3}$*
	OPB11	$(5,0 \pm 1,2).10^{-4}$	$(5,4 \pm 1,5).10^{-4}$	$(165,8 \pm 25,1).10^{-4}$*	$(6,4 \pm 2,6).10^{-4}$	$(4,0 \pm 1,7).10^{-4}$	$(2,1 \pm 1,4).10^{-4}$*	$(2,3 \pm 1,3).10^{-4}$*
Glande digestive	OPB7	$(17,1 \pm 5,0).10^{-3}$	$(47,8 \pm 16,7).10^{-3}$	$(52,3 \pm 10,0).10^{-3}$	$(11,9 \pm 4,1).10^{-3}$*	$(49,8 \pm 12,0).10^{-3}$	$(0,3 \pm 0,2).10^{-3}$*	$(18,8\pm 5,3).10^{-3}$
	OPB11	$(2,8 \pm 0,6).10^{-3}$	$(49,7 \pm 13,0).10^{-3}$	$(55,4 \pm 4,4).10^{-3}$	$(11,5 \pm 3,7).10^{-3}$	$(61,3 \pm 17,7).10^{-3}$	$(1,1 \pm 0,4).10^{-3}$*	$(19,3 \pm 8,5).10^{-3}$

Résultats exprimées en moyenne ± SEM (n = 10). * indique une différence significative comparée au témoin, selon le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Le tableau XXXVI présente la distribution des fréquences des T*m* des produits de PCR obtenus avec les amorces OPB7 et OPB11 en utilisant l'ADN génomique des branchies chez les huîtres contaminées et témoins. Pour les huîtres exposées à 5 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence d'apparition des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [79-80[, [83-84[, [84-85[et [85-86[, alors que l'amorce OPB11 montre une augmentation significative des produits de T*m* appartenant à l'intervalle [80-81[par rapport au témoin (DMSO). Pour la condition 20 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre une augmentation significative de la fréquence des produits de PCR ayant des T*m* appartenant à l'intervalle [86-87[, alors que l'amorce OPB11 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de T*m* appartenant aux intervalles [74-78[et [86-87[par rapport au témoin (DMSO). Concernant la condition 100 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de PCR de T*m* appartenant aux intervalles [74-78[, [79-80[, [81-82[et [88-89[, alors que l'amorce OPB11 montre des différences significatives dans la fréquence des produits ayant des T*m* appartenant aux intervalles [74-78[, [82-83[, [83-84[, [85-86[et [86-87[par rapport au témoin (DMSO). Pour la condition 400 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence d'apparition des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [81-82[, [83-84[, [84-85[, [86-87[et [88-89[, alors que l'amorce OPB11 montre des différences significatives dans la fréquence des produits ayant des T*m* appartenant aux intervalles [79-80[, [80-81[, [82-83[, [83-84[et [86-87[par rapport au témoin (DMSO). Pour la condition 1000 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence d'apparition des produits de PCR de T*m* appartenant aux intervalles [79-80[, [81-82[, [82-83[et [88-89[, alors que l'amorce OPB11 montre des différences significatives dans la fréquence des produits ayant des T*m* appartenant aux intervalles [78-79[, [82-83[et [83-84[par rapport au témoin.

Tableau XXXVI : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs T*m* appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau des branchies des huîtres exposées à différentes concentrations de BaP pendant 7 jours et témoin.

Amorces RAPD	Intervalles de température	Témoin	Témoin (DMSO)	5 µg/L	20 µg/L	100 µg/L	400 µg/L	1000 µg/L
	[74-78[	0	0	0	0	0,5*	0	0,3
	[78-79[	0,2	0,1	1	0,1	0,2	0,2	0,1
	[79-80[	0,7	0,9	0*	0,8	0,5*	0,7	0,5*
	[80-81[	0,1	0	0	0	0,1	0	0,1
	[81-82[	0,7	0,9	0,8	0,7	0,5*	0,5*	0,3*
	[82-83[	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,5*
OPB7	[83-84[	0,1	0	0,6*	0,2	0,1	0,4*	0,1
	[84-85[	0,8	0,9	0,2*	0,8	0,6	0,2*	0,6
	[85-86[	0,1	0,2	0,9*	0	0,3	0	0,2
	[86-87[	0,2	0	0	0,4*	0,1	0,4*	0,3
	[87-88[	0,2	0,2	0	0,3	0,2	0	0,1
	[88-89[	0,8	0,8	1*	0,7	0,4*	0,4*	0,1*
	[89-92[	0,3	0	0	0	0	0	0
	[74-78[	0,2	0,1	0	0,7*	0;9*	0,4	0,1
	[78-79[	0,1	0	0	0	0	0,3	0,7*
	[79-80[	0,2	0,1	0	0,4	0,4	0,6*	0
	[80-81[	0,5	0,6	1*	0,4	0,5	0,1*	0,8
	[81-82[	0,3	0,3	0	0,5	0,2	0,3	0,2
	[82-83[	0	0	0	0	0,6*	0,4*	0,7*
OPB11	[83-84[	0,8	1	1	0,9	0,4*	0,5*	0,2*
	[84-85[	0,2	0	0	0,1	0,1	0,2	0
	[85-86[	0,1	0	0,1	0,1	0,4*	0,1	0,3
	[86-87[	0,6	0,9	0,9	0,5*	0,4*	0,3*	0,6
	[87-88[	0,3	0	0	0,3	0	0,1	0
	[88-89[	0	0	0	0	0	0	0
	[89-92[	0	0	0	0	0	0	0

* indique une différence significative des fréquences d'apparition des pics par rapport au témoin (DMSO) (n = 10). Données analysées avec le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Les résultats de la fréquence d'apparition des produits de PCR pour la glande digestive des huîtres contaminées et témoins sont présentés dans le tableau XXXVII. Pour les huîtres exposées à 5 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre une diminution significative de la fréquence des produits de PCR ayant des T*m* appartenant à l'intervalle [79-80[par rapport au témoin (DMSO). Pour les huîtres 20 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence des produits ayant des T*m* appartenant [83-84[, [85-86[et [86-87[, alors que l'amorce OPB11 montre une diminution de la fréquence des produits de T*m* appartenant à l'intervalle [86-87[par rapport au témoin (DMSO). Pour la condition 100 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de PCR de T*m* appartenant aux intervalles [74-78[et [85-86[, alors que l'amorce OPB11 montre une augmentation de la fréquence des produits ayant des T*m* appartenant à l'intervalle [88-89[par rapport au témoin (DMSO). Pour la condition 400 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre des différences significatives dans la fréquence d'apparition des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [79-80[, [82-83[, [88-89[et [89-92[, alors que l'amorce OPB11 montre des différences significatives dans la fréquence des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [74-78[, [83-84[et [89-92[par rapport au témoin (DMSO). Concernant la condition 1000 µg BaP/L, l'amorce OPB7 montre une diminution significative de la fréquence d'apparition des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [79-80[et [85-86[par rapport au témoin (DMSO). La comparaison entre le témoin (DMSO) et le témoin montre des différences significatives dans la fréquence d'apparition des produits de PCR ayant des T*m* appartenant aux intervalles [82-83[et [85-86[pour l'amorce OPB7 et des produits ayant des T*m* appartenant à l'intervalles [74-78[pour l'amorce OPB11.

Tableau XXXVII : Fréquence d'apparition, selon les intervalles de température auxquelles leurs T*m* appartiennent, des produits de la RAPD-PCR au niveau de la glande digestive des huîtres exposées à différentes concentrations de BaP pendant 7 jours et témoin.

Amorces RAPD	Intervalles de température	Témoin	Témoin (DMSO)	5 µg/L	20 µg/L	100 µg/L	400 µg/L	1000 µg/L
	[74-78[	0	0	0	0	0,6*	0,1	0,1
	[78-79[	0	0	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2
	[79-80[	1	1	0,6*	0,8	0,8	0,1*	0,6*
	[80-81[	0	0	0,1	0	0	0	0,2
	[81-82[	0,1	0,4	0,1	0,4	0,3	0,5	0,6
	[82-83[	0,6	0,2[a]	0,2	0	0,3	0,6*	0,3
OPB7	[83-84[	0,3	0,2	0,4	0,6*	0,4	0,1	0,4
	[84-85[	0,4	0,2	0,2	0,4	0,3	0,2	0,4
	[85-86[	0,2	0,6[a]	0,5	0*	0,1*	0,8	0,2*
	[86-87[	0,2	0	0,3	0,5*	0,3	0	0,3
	[87-88[	0,2	0	0,1	0,2	0,2	0,3	0,1
	[88-89[	0,1	0	0,3	0	0	0,5*	0,3
	[89-92[	0	0	0	0,2	0	0,5*	0
	[74-78[	0,9	0[a]	0	0	0,1	0,6*	0
	[78-79[	0	0	0	0	0	0,3	0,1
	[79-80[	0,4	0,3	0,1	0	0	0,1	0,1
	[80-81[	0,6	0,7	0,9	0,9	1	0,7	0,8
	[81-82[	0,1	0	0	0,1	0	0,2	0,1
	[82-83[	0,2	0	0	0	0	0,3	0
OPB11	[83-84[	0,6	0,9	1	1	1	0,3*	0,9
	[84-85[	0,3	0,1	0	0	0	0,1	0,1
	[85-86[	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0
	[86-87[	0,7	0,8	0,7	0,4*	1	0,7	0,8
	[87-88[	0	0,1	0,2	0	0	0,2	0,2
	[88-89[	0,1	0	0	0	0,4*	0,1	0
	[89-92[	0,1	0	0,2	0,2	0	0,4*	0

* indique une différence significative des fréquences d'apparition des pics comparée au témoin (DMSO). [a] indique une différence significative des fréquences d'apparition des pics comparée au témoin (n = 10). Données analysées avec le test de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

6.3. Effets du BaP sur l'expression relative des gènes chez l'huître *C. gigas*

L'expression de différents gènes a été étudiée suite à l'exposition des huîtres à différentes concentrations de BaP. Ces gènes sont *cyp1a1*, *gst*, *mdr*, impliqués dans la métabolisation des contaminants ; *ARNr 16S*, *cytb* et *cox1*, impliqués dans la respiration mitochondriale ; *cat*, *sod* et *gpx*, impliqués dans la défense antioxydante ; *vtg*, impliqué dans la reproduction et *ilk* impliqué dans la défense immunitaire.

La réponse transcriptionelle au BaP au niveau des branchies de l'huître *C. gigas* est illustrée dans la figure 52. Les résultats montrent une induction significative des gènes *cyp1a1*, *gst*, *mdr*, *vtg*, *ilk*, *cytb* et *sod* chez les huîtres exposées au cinq concentrations de BaP par rapport au témoin (DMSO). Une diminution significative de l'expression relative du gène *ARNr 16S* a été notée chez les huîtres exposées à 100, 400 et 1000 µg BaP/L. Le gène *cox1* est surexprimé chez les huîtres exposées à 5, 20 et 1000 µg BaP/L. Les huîtres exposées à 5, 100, 400 et 1000 µg BaP/L présentent une augmentation significative de l'expression du gène *cat*. Les huîtres exposées à 5, 20, 100 et 400 µg BaP/L présentent une augmentation significative de l'expression du gène *gpx*. Une comparaison entre les cinq conditions de contamination montre une variation de l'expression relative des gènes selon la concentration de BaP. Les gènes *gst*, *mdr*, *vtg*, *ilk* et *gpx* présentent des taux d'expression plus élevés pour les conditions 100 et 400 µg BaP/L par rapport aux conditions 5, 20 et 1000 µg BaP/L. Les gènes *cyp1a1*, *cat* et *sod* montrent une augmentation du taux d'expression pour les conditions 400 et 1000 µg BaP/L par rapport aux autres conditions, avec des valeurs maximales pour la condition 1000 µg BaP/L. Les conditions 100 et 400 µg BaP/L présentent une diminution de l'expression du gène *cox1* par rapport aux autres conditions. Pour le gène *ARNr 16S*, le taux d'expression est plus faible pour les conditions 100, 400 et 1000 µg BaP/L que pour les conditions 5 et 20 µg BaP/L.

La réponse transcriptionelle au BaP au niveau de la glande digestive de l'huître *C. gigas* est illustrée dans la figure 53. Les huîtres exposées à 5 µg BaP/L présentent une augmentation significative de l'expression relative des gènes *cytb*, *sod* et *gpx* par rapport au témoin (DMSO). Les huîtres exposées à 20 µg BaP/L présentent une augmentation significative de l'expression des gènes *cyp1a1*, *mdr*, *vtg*, *cytb*, *cat*, *sod* et *gpx*. Pour les huîtres exposées à 100 µg BaP/L, les gènes *cyp1a1*, *mdr*, *vtg*, *ilk*, *cytb*, *cat* et *sod* sont surexprimés par rapport au témoin (DMSO). Concernant les huîtres exposées à 400 et 1000 µg BaP/L, une augmentation significative de l'expression relative de tous les gènes étudiés (*cyp1a1*, *gst*, *mdr*,

vtg, ilk, ARNr 16S, cytb, cox1, cat, sod et *gpx*) a été enregistrée par rapport au témoin (DMSO). Une comparaison entre les différentes conditions montre une augmentation du taux d'expression des gènes *cyp1a1, gst, mdr, ARNr 16S, cox1, cat, sod* et *gpx* chez les huîtres exposées à 400 et 1000 µg BaP/L par rapport au autres conditions. La valeur la plus élevée du taux d'expression du gène *vtg* a été enregistré chez les huîtres exposées à 20 µg BaP/L. Les conditions 100, 400 et 1000 µg BaP/L présentent une augmentation de l'expression du gène *ilk* par rapport aux conditions 5 et 20 µg BaP/L.

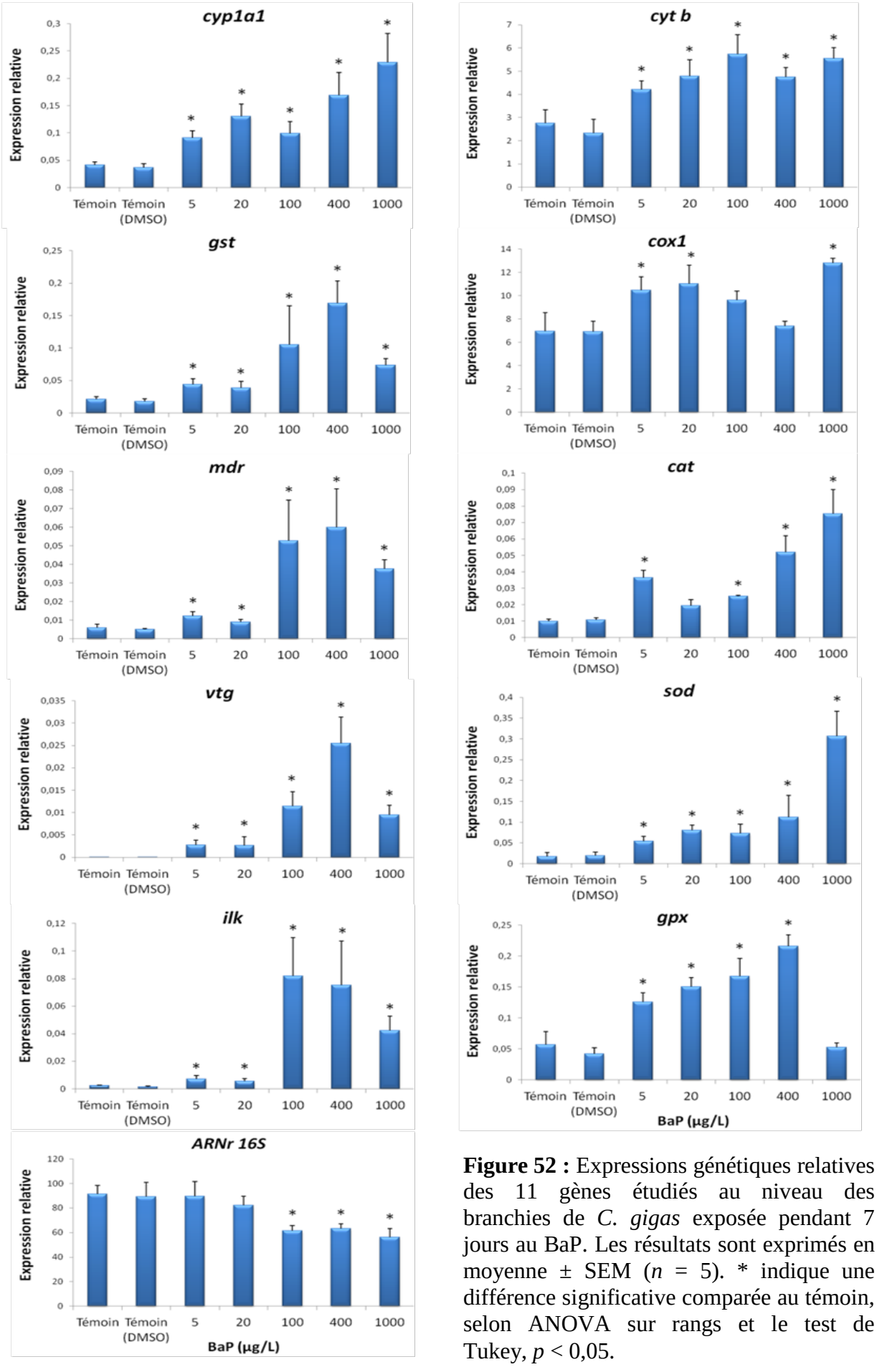


Figure 52 : Expressions génétiques relatives des 11 gènes étudiés au niveau des branchies de *C. gigas* exposée pendant 7 jours au BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin, selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

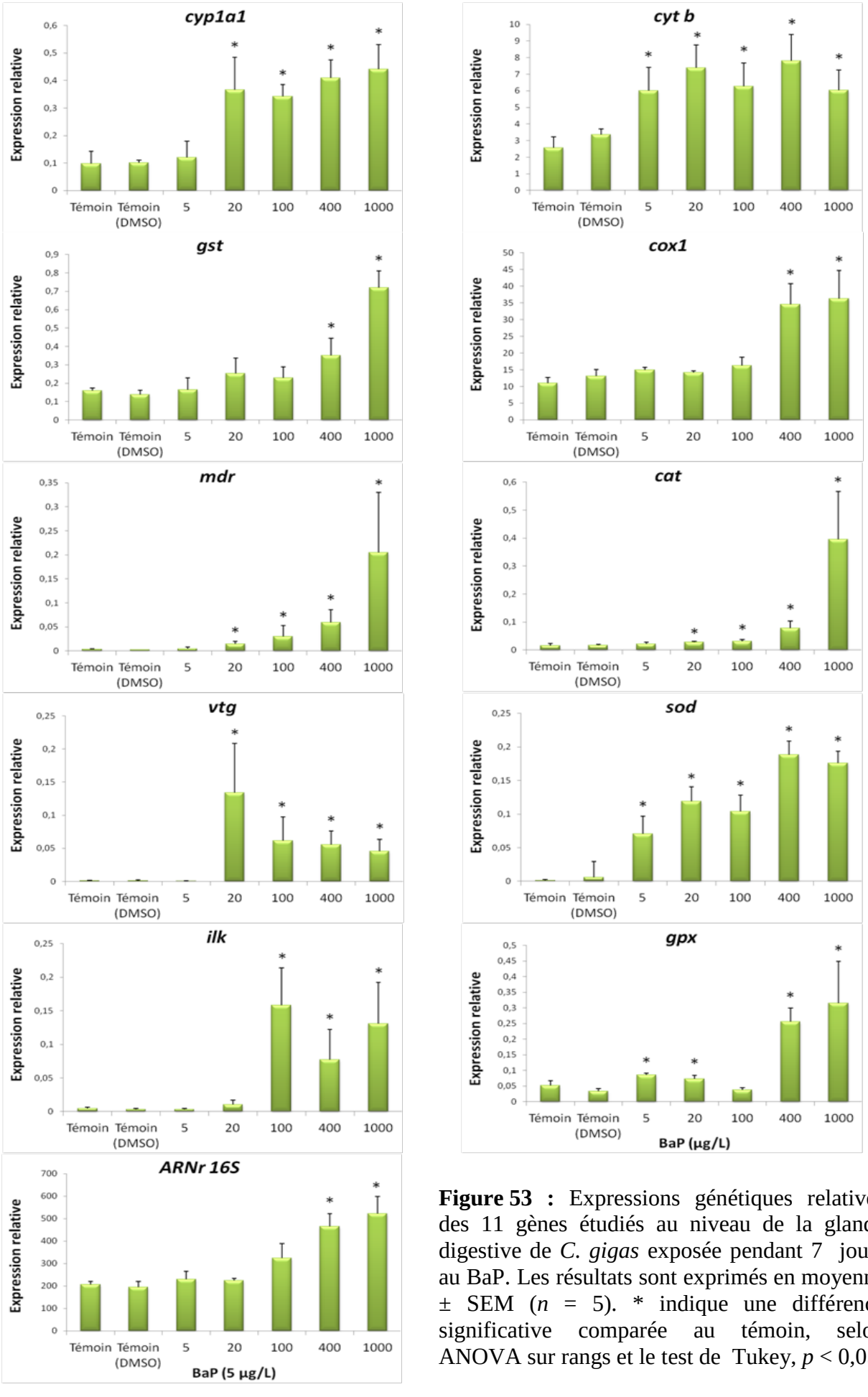


Figure 53 : Expressions génétiques relatives des 11 gènes étudiés au niveau de la glande digestive de *C. gigas* exposée pendant 7 jours au BaP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). * indique une différence significative comparée au témoin, selon ANOVA sur rangs et le test de Tukey, $p < 0,05$.

7. DISCUSSION

7.1. Accumulation du BaP dans les cellules de la microalgue *I. galbana* et dans les tissus de la palourde *R. philippinarum* nourrie avec la microalgue

Les organismes aquatiques peuvent accumuler les contaminants organiques à partir de l'eau et/ou de la nourriture ingérée. L'importance relative de ces voies de bioaccumulation a été étudiée chez différentes espèces (Okay et al., 2000 ; Wang et Chow, 2002). Dans la première expérience, la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* a été alimentée en utilisant la microalgue *Isochrysis galbana* pré-exposée à 400 et 1000 µg BaP/L. Nos résultats ont montré une accumulation du BaP dans les masses d'algue contaminées, avec une concentration plus élevée au niveau de la masse d'algue exposée à 1000 µg BaP/L. Croxton et al. (2012) ont montré aussi une accumulation du BaP chez les diatomées après une exposition à 100 et 1000 µg BaP/L. Le BaP a tendance à s'accumuler dans la microalgue *I. galbana* principalement en s'adsorbant sur les membranes lipidiques des cellules. Wang et Chow (2002) ont rapporté que la bioconcentration du BaP chez les phytoplanctons semble être dominée par l'adsorption des molécules sur la surface des cellules, avec un faible pourcentage de BaP atteignant le cytoplasme des cellules (< 16% après 12 heures d'exposition). Coelho et al. (2002) ont montré que la microalgue *I. galbana* accumule 80% de tributylétain (TBT) après 10 min d'exposition et que le principal mode d'accumulation semble être par adsorption du TBT sur la surface externe des cellules. La rapidité de bioconcentration des contaminants à aspect organique chez le plancton est liée à la grande surface des cellules par rapport au volume (Fowler et al., 1985). La bioconcentration des contaminants organiques chez les phytoplanctons dépend des propriétés physico-chimiques de contaminant lui-même, tel que le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}), et des conditions biologiques tel que les teneurs des cellules en lipide (Stange et Swachamer, 1994).

Dans notre étude, le BaP présent dans le tissu mou de *R. philippinarum* contaminée n'est pas détectable. Ceci peut être expliqué par le choix du tissu pour l'analyse chimique. De même, Croxton et al., (2012) ont montré que la concentration de BaP est au dessous de la limite de détection chez l'huître *Crassostrea virginica* nourrie par des diatomées pré-exposées à 100 µg BaP/L. Ces auteurs ont montré que les diatomées contaminées ont été filtrées et digérées en analysant les fèces des huîtres, bien que les concentrations tissulaires en BaP soient faibles. Dans notre expérience, une ouverture optimale des valves et une augmentation

de la filtration ont été observées chez toutes les palourdes après environ 30 min du commencement de la phase d'alimentation.

7.2. Réponse biochimique au BaP chez les bivalves

Nos résultats visant à évaluer l'effet *in vivo* du BaP obtenus sur certains paramètres biochimiques ont montré une variation de la réponse biochimique chez les bivalves selon la concentration de BaP, le mode de contamination et l'espèce étudiée. La GST est une enzyme de biotransformation de phase II, impliquée dans la détoxication et l'excrétion de plusieurs xénobiotiques tels que les HAPs, les PCBs et le DDE (Hoarau et al., 2001, 2004), mais il a été démontré qu'elle joue aussi le rôle d'une enzyme de la défense antioxydante principalement dans les branchies (Bebianno et Barreira, 2009). L'activité GST a été modifiée chez *R. philippinarum* exposée à des concentrations subaiguës de BaP (2 et 5 µg/L) (figure 42). L'augmentation de l'activité GST, au niveau de la glande digestive, est peut être due à la formation des métabolites réactifs de BaP issues de la phase I de biotransformation et qui vont être pris en charge par l'enzyme GST pour les transformer en composés hydrophiles par conjugaison au glutathion. Nos résultats sont similaires à ceux de Hoarau et al., (2001) qui ont montré une augmentation de l'activité GST chez *R. decussatus* exposée à des concentrations subaiguës de BaP (1,5 et 3 µg/L). Dans la troisième expérience, l'exposition de *R. philippinarum* à des concentrations aiguës de BaP montre une augmentation de l'activité GST au niveau des branchies pour les concentrations 400 et 1300 µg BaP/L, alors que la glande digestive ne présente aucune différence de l'activité entre les palourdes contaminées et le témoin (figures 45). Par ailleurs, l'exposition de l'huître *C. gigas* à des concentrations aiguës et subaiguës de BaP a montré une augmentation de l'activité GST au niveau des branchies pour toutes les conditions de contaminations par rapport au témoin, alors que la glande digestive montre une induction de l'activité GST pour les concentrations 2, 5 et 100 µg BaP/L et une inhibition de l'activité pour les fortes concentrations de BaP (400 et 1000 µg/L) (figure 51). Ces résultats montrent que l'activité métabolique de la GST au niveau de la glande digestive des bivalves est induite par des concentrations moyennement élevées de BaP, alors que les concentrations très fortes de BaP (à partir de 400 µg/L) altèrent cette activité métabolique. En effet, l'exposition à de fortes concentrations de BaP va engendrer une forte accumulation des métabolites réactifs issus de la phase I de métabolisation qui pourrait perturber la réaction de conjugaison par la GST. Gravato et Santos (2003) ont rapporté que l'accumulation des métabolites époxydes chez le *Dicentrarchus labrax* suite à une exposition de BaP altère la fonction de conjugaison des enzymes de phase II, tel que la GST, au niveau

du foie. Des résultats similaires, caractérisés par une inhibition de l'activité GST hépatique, ont été trouvés chez la daurade *S. aurata* après une injection par le BaP (Jebali, 2006). L'activité GST mesurée dans le tissu entier de la moule *M. galloprovincialis* exposée à des concentrations de BaP allant de 0,04 à 3 µmol/L/individu pendant 48 heures a été inhibée (Michel et al., 1993). Cependant, Kamel et al. (2012) ont rapporté une augmentation de l'activité GST au niveau de la glande digestive de *M. galloprovincialis* exposée à 19 µg BaP/L.

Contrairement à la glande digestive, l'activité GST au niveau des branchies de la palourde *R. philippinarum* et de l'huître *C. gigas* augmente même après exposition à des fortes concentrations de BaP. Ces résultats montrent que l'activité GST au niveau des branchies n'est pas altérée par les fortes concentrations de BaP (400 et 1300 µg/L pour les palourdes et 400 et 1000 µg/L pour les huîtres) comme celle au niveau de la glande digestive (figures 45 et 51). Cette différence dans la réponse de l'activité GST à des concentrations aiguës de BaP semble être liée à la différence dans la fonction de cette enzyme entre les deux organes. En effet, la GST dans la glande digestive agit en tant qu'une enzyme de biotransformation des xénobiotiques, alors que celle dans les branchies agit en tant qu'une peroxydase impliquée dans le défense antioxydant (Bebianno et Barreira, 2009). Akcha et al. (2000a) ont montré que l'activité GST dans les branchies est plus sensible au BaP par rapport à celle de la glande digestive chez *M. galloprovincialis.* L'exposition de la palourde *R. philippinarum* à 10 µg BaP/L montre une induction de l'activité GST au niveau des branchies après 1 et 14 jours (figure 48). Ces changements temporels de la réponse de la GST peuvent être expliqués par le phénomène d'acclimatation chez l'animal aux conditions de contamination par le BaP. L'induction de l'activité GST dans la glande digestive après 7 jours d'exposition est peut être due à l'accumulation des métabolites de BaP pendant cette période, suivie d'une récupération d'une activité comparable à celle du témoin après 14 jours. Il a été montré que l'activité GST hépatique chez *Dicentrarchus labrax* augmente par rapport au témoin après exposition à 0,1 µM de BaP pendant 4, 8 et 96 heures, alors qu'il n'y pas de différence par rapport au témoin après 16, 24 et 48 heures d'exposition (Gravato et Santos, 2003). Banni et al. (2010b) ont montré une augmentation de l'activité GST chez *M. galloprovincialis* exposée à 19 µg BaP/L pendant 2 et 3 jours, alors qu'il n y a pas de variation de l'activité après 1 jours d'exposition.

Il a été rapporté que les HAPs tel que le BaP sont capables de provoquer un état de stress oxydant dans la cellule par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) tel

que le peroxyde d'hydrogène (Kamel et al., 2012). L'activité CAT est l'une des activités enzymatiques antioxydantes de la cellule qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau. Dans ce travail, l'expérience d'exposition de la palourde *R. philippinarum* à des concentrations subaiguës de BaP pendant 7 jours montre une induction de l'activité CAT, avec une similarité de la réponse entre les branchies et la glande digestive (figure 42). De même, l'huître *C. gigas* exposée à 5, 20 et 100 µg BaP/L pendant 7 jours présente une augmentation de l'activité CAT au niveau des deux organes étudiés. Cette augmentation de l'activité CAT indique que les bivalves sont confrontés à un stress oxydant associé à la présence de contaminants (BaP) dans le milieu (Banni et al., 2009b). L'accumulation et la biotransformation du BaP en quinones semble contribuer à la production des ERO tel que H_2O_2 (Cheung et al., 2004). Une étude *in vitro* a montré la stimulation de la production des radicaux libres d'oxygènes dans les microsomes de la glande digestive chez la moule *M. edulis* par les métabolites quinones du BaP (Martinez et Livingstone, 1995). Cheung et al. (2001) ont trouvé une corrélation positive entre l'activité CAT dans les branchies de la moule *P. viridis* et la teneur tissulaire en BaP, indiquant que l'activité CAT chez les bivalves est un bon biomarqueur dans le cas d'une exposition au BaP. Des études in situ ont montré des corrélations positives entre l'activité CAT au niveau de la glande digestive des moules et l'exposition aux HAPs (Porte et al., 1991; Krishnakumar et al., 1995). L'activité CAT, mesurée chez *R. philippinarum* exposée à des concentrations aiguës de BaP, ne présente pas de variations par rapport au témoin (figure 45). Ces résultats montrent que les très fortes concentrations de BaP (à partir de 400 µg/L) altèrent l'activité CAT chez la palourde *R. philippinarum*. Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par Banni et al. (2009b), qui ont montré une augmentation de l'activité CAT chez l'annélide *Hediste diversicolor* exposé pendant 48 heures à 0,2 et 0,4 µM de BaP, alors que les individus exposés à 1 µM de BaP présentent le même niveau de l'activité CAT que le témoin. Cependant, nos résltats ont montré que l'huitre *C. gigas* exposée à des concentrations très élevées de BaP (400 et 1000 µg/L) présente une augmentation de l'activité CAT (figure 51). Ces résultats indique que l'activité CAT reste intact et que l'enzyme fonctionne normalement même après exposition à de très fortes concentrations de BaP, ce qui n'est pas le cas pour la palourde *R. philippinarum*. L'exposition de *R. philippinarum* à 10 µg BaP/L pendant différentes périodes montre une augmentation de l'activité CAT au niveau des branchies après 1, 3 et 14 jours d'exposition. Au niveau de la glande digestive, l'activité CAT montre une augmentation significative après 1 et 7 jours. Ceci prouve que l'animal essaye de s'acclimater à la contamination en éliminant les ERO générées par Le BaP. En outre, l'augmentation de

l'activité CAT après 1 jour d'exposition montre une action rapide du BaP dans la génération des ERO. Toutefois, l'annélide *H. diversicolor* ne présente pas de variation de l'activité CAT après 24 et 48 heures d'exposition à 1 µM de BaP (Bouraoui et al., 2009). Pan et al. (2006) montre une augmentation de la réponse antioxydante chez le bivalve *Chlamys ferrari* exposée à 10 µg BaP/L pendant 12 heures, 1 et 3 jours par rapport au témoin, alors qu'une réponse antioxydante similaire au témoin a été enregistrée après 9, 15 et 30 jours d'exposition.

Le taux d'accumulation de MDA est largement utilisé comme un indicateur de la peroxidation lipidique. Ce biomarqueur a l'avantage de révéler des dommages induits par le stress oxydant et non seulement l'exposition aux contaminants. Nos résultats montrent une augmentation du niveau de la peroxidation lipidique chez *R. philippinarum* et *C. gigas* exposées au BaP. De plus, le niveau de la peroxydation lipidique chez les deux bivalves semble être associé à la concentration de BaP dans le milieu. Ces résultats confirment l'idée que les bivalves sont soumis à un stress oxydant dû à l'exposition au BaP qui stimule la génération des ERO chez l'organisme et perturbe ainsi l'équilibre de la balance ERO/défense antioxydant en faveur des radicaux libres. Il a été rapporté que les tissues endommagés par le stress oxydant présentent une augmentation de la production des protéines carbonylées et du malondialdéhyde par élimination d'un atome d'hydrogène à partir des acides gras insaturés causant la formation des radicaux libres et des aldéhydes conduisant ainsi à une altération des couches lipidiques et des protéines membranaires (Almeida et al., 2007). De ce fait, la peroxydation lipidique perturbe le métabolisme cellulaire normal en altérant les propriétés structurelles et fonctionnelles de la cellule conduisant finalement à des réactions d'adaptation et/ou causant la mort de la cellule (Girotti, 1998). Une augmentation du taux d'accumulation de MDA a été observée chez la moule *M. galloprovincialis* exposée pendant 7 jours à 19 µg BaP/L en présence d'un gradient de température (Kamel et al., 2012). L'augmentation du niveau de la peroxydation lipidique chez *R. philippinarum* exposée à de très fortes concentrations de BaP (de 400 à 1300 µg BaP/L) semble être liée à l'altération du fonctionnement normal de l'activité CAT. Cependant, les bivalves présentant une induction de la défense antioxydante suite à l'exposition au BaP montrent aussi des dommages des membranes lipidiques. Des résultats similaires ont été observés chez *P. viridis* (branchies et hépatopancréas), où les enzymes antioxydantes ont été incapables de neutraliser la surproduction des ERO (Cheung et al., 2004). De même, une augmentation du niveau de la peroxidation lipidique a été observée chez *M. galloprovincialis* (branchies) exposée au BaP pendant 7 jours, malgré l'induction de du système de défense antioxydant (Maria et Bebianno,

2011). La palourde *R. philippinarum* exposée à 2 et 5 µg BaP/L présente une augmentation de l'activité CAT avec des teneurs en MDA similaires à celles du témoin (figure 42), montrant ainsi une efficacité de la défense antioxydante au niveau de la glande digestive dans la neutralisation des ERO et la protection contre les dommages membranaires. Par contre, l'augmentation de l'activité CAT au niveau des branchies est accompagnée d'une augmentation du niveau de la peroxydation lipidique montrant l'inefficacité des enzymes antioxydantes dans la protection contre les dommages membranaires. Ces résultats peuvent être dues au fait que les branchies sont continuellement en contact direct avec le BaP présent dans l'eau de mer. Les palourdes contaminées par le BaP par voie trophique présentent une augmentation marquée du niveau de la peroxydation lipidique dans la glande digestive (figure 39), alors que les palourdes exposées à l'eau de mer contaminée par des concentrations subaigües de BaP présentent une augmentation du niveau de la peroxydation lipidique seulement dans les branchies (figure 42). Cette différence entre les résultats des deux expériences semble être due à la variation du mode de contamination, où le BaP libre dans l'eau de mer a un effet plus marqué sur les branchies, alors que le BaP associé aux microalgues a un effet plus important sur la glande digestive. L'analyse des branchies des palourdes contaminées par voie trophique montre une augmentation du taux d'accumulation du MDA chez le groupe exposé à la concentration la plus faible de BaP (400 µg/L), alors que les palourdes exposées à la forte concentration (1000 µg/L) ne présentent pas de différence par rapport au témoin. Ces résultats peuvent être expliqués par une altération de l'état de santé des palourdes exposées à la plus forte concentration. Les palourdes exposées à 10 µg BaP/L pendant différentes périodes montre une augmentation de la peroxydation lipidique en fonction du temps. Les dommages membranaires apparaissent dans les branchies à un temps d'exposition plus précoce (1 jours) que dans la glande digestive (3 jours) (figure 48). Ceci peut être dû au mode de contamination (eau de mer), qui implique que les branchies sont les premiers à être en contact au BaP. La moule *M. galloprovincialis* exposée à la même concentration de BaP (10 µg/L) pendant 7 jours en utilisant le même mode de contamination (eau de mer) présentent une augmentation de la peroxydation lipidique dans les branchies alors que la glande digestive ne présente pas de différence par rapport au témoin (Maria et Bebianno, 2011). Le bivalve *Chlamys ferrari* exposé à différentes concentrations de BaP (0,5, 1, 10 et 50 µg/L) et prélevées à différent temps pendant une période allant de 12 heures à 30 jours d'exposition présente un augmentation du taux d'accumulation de MDA en fonction du temps et de la concentration de BaP (Pan et al., 2006). Nos résultats montrent que la

peroxydation lipidique est dépendante du temps d'exposition et de la concentration du contaminant (figures 42, 45, 48 et 51).

Il a été constaté que l'activité AChE chez les différents espèces marines peut être influencée par des contaminants environnementaux autres que les carbamates et les organophosphorés, tels que les hydrocarbures et les métaux (Bouraoui et al., 2009 ; Palanikumar et al.,2012). D'après les résultats obtenus dans ce travail, nous constatons que le BaP inhibe l'activité AChE des branchies et de la glande digestive chez *R. philippinaurum* et *C. gigas*. De plus, l'activité AChE chez *R. philippinarum* semble être plus sensible au BaP que celle chez *C. gigas* (figures 42 et 51). En effet, cette activité est inhibée chez la palourde à partir d'une concentration de 2 µg BaP/L, alors que chez l'huître, elle est inhibée à partir d'une concentration de 20 µg BaP/L. L'inhibition observée de l'activité AChE par le BaP peut être attribuée à un effet négatif général des HAPs (Banni et al., 2010b). La toxicité du BaP vis-à-vis de l'enzyme AChE peut être à travers l'induction d'un stress oxydant qui modifie la structure de l'AChE par l'oxydation des groupements thiols. En effet, la biotransformation des contaminants organiques environnementaux par le système cytochrome P450 génère les ERO et peut induire un stress oxydant chez l'organisme (Stegeman et Hahn, 1994). Des résultats similaires aux nôtres ont été observés chez *M. galloprovincialis* exposée pendant 7 jours à 19 µg BaP/L à différentes températures (Kamel et al., 2012). Une contamination de la moule *M. galloprovincialis* par une concentration individuelle de 50 mg BaP/kg poids sec via la voie trophique montre une inhibition de l'activité AChE (Akcha et al., 2000a). Vieira et al. (2008) ont trouvé une inhibition de l'activité AChE chez le poisson *Pomatoschistus microps* exposé à différentes concentrations de BaP (2, 4, 8 et 16 µg/L). Il a été rapporté que les HAPs et les produits pétroliers ont un effet inhibiteur sur l'activité AChE et provoque ainsi une perturbation de la neurotransmission cholinergique. Cet effet peut avoir de graves répercussions sur les fonctions déterminantes pour la survie et la performance de l'organisme (Vieira et al., 2008). L'étude de la cinétique d'action du BaP chez la palourde *R. philippinarum* montre une perturbation (inhibition) rapide de l'activité AChE dans les branchies et la glande digestive de l'animal après 1 jour d'exposition, ce qui indique une sensibilité de l'activité vis-à-vis d'une exposition au BaP. Les branchies des palourdes montrent un retour de l'activité AChE au niveau de base (activité chez le témoin) après 7 et 14 jours d'exposition, ce qui peut indiquer que l'inhibition de l'activité pendant les 3 premiers jours d'exposition correspond à une réaction d'acclimatation chez l'animal. Au niveau de la glande digestive des palourdes contaminées, l'inhibition de l'activité AChE est stable après 1,

3 et 7 jours d'exposition ensuite l'activité diminue après 14 jours (figure 48). Ceci prouve que le temps de contact entre l'organisme et le contaminant (BaP) influence le niveau de perturbation de l'activité AChE. Ainsi, nos résultats montrent que l'activité AChE est dépendante de la concentration du BaP et du temps d'exposition. D'autres résultats observés chez la moule *M. galloprovincialis* exposée à 19 µg BaP/L montrent que l'activité AChE est inhibé après 48 et 72 heures alors qu'elle n'est pas inhibée après 24 heures d'exposition (Banni et al., 2010b). Bouraoui et al. (2009) ont observés une inhibition de l'activité AChE après 12, 24, 36 et 48 heures d'exposition à 1 µM de BaP. Par contre, Jebali (2006) a montré que le BaP n'a aucun effet sur l'activité AChE chez le poisson *S. aurata* après 2, 5 et 7 jours de contamination.

Les résulats des biomarqueurs biochimiques au niveau de la glande digestive et des branchies des palourdes *R. philippinarum* exposées aux concentrations subaiguës et aiguës de BaP via l'eau de mer pendant 7 jours sont regroupés dans la figure 54.

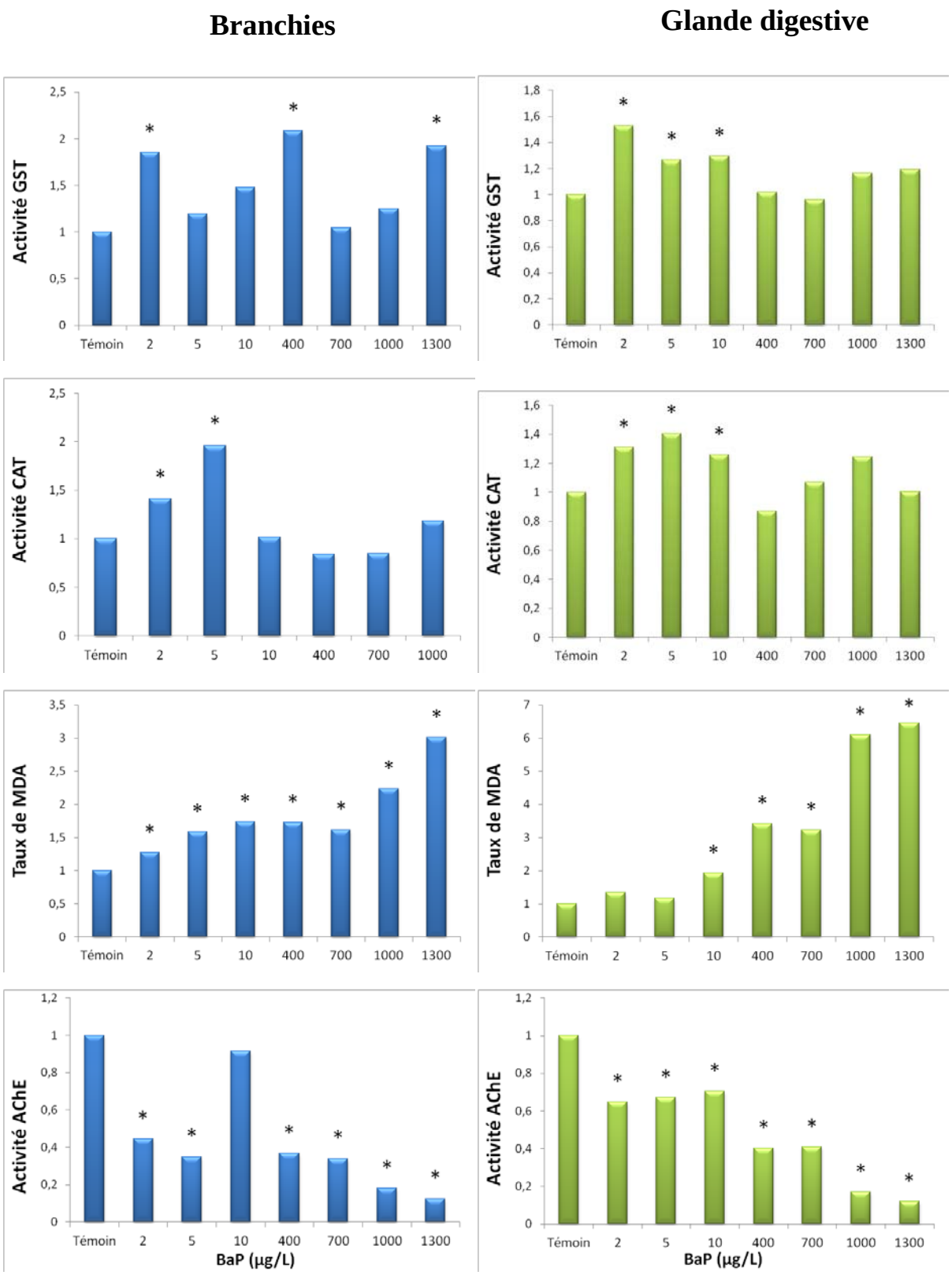


Figure 54 : Réponse biochimique étudiée au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes *R. philippinarum* exposées aux différentes concentrations de BaP via l'eau de mer pendant 7 jours. Pour chaque condition, les biomarqueurs ont été calculés par rapport à leurs témoins relatifs. *différence significative par rapport au témoin ($p < 0,05$).

7.3. Effets génotoxiques du BaP chez les bivalves

Dans ce travail, la génotoxicité du BaP a été étudiée en utilisant la technique RAPD qui a été récemment adaptée et améliorée pour l'étude des effets génotoxiques des contaminants environnementaux chez les organismes aquatiques en combinant les techniques de RAPD et de PCR en temps réel (Cambier et al., 2010). En utilisant cette technique, on cherche à quantifier le nombre de sites d'hybridation pour les amorces RAPD au niveau de l'ADN génomique qui permet de quantifier même des mutations. L'efficacité d'hybridation relative résulte à la fois d'une création et d'une perte de sites d'hybridation puisqu'une substitution d'une paire de base peut faire soit apparaître, soit disparaître ces sites. En considérant ce paramètre, l'absence de différences entre les organismes témoin et contaminé ne veut pas pour autant dire qu'il n'y a pas de génotoxicité. Donc pour être plus résolutif, en plus du nombre se sites d'hybridation, la répartition de chaque produit d'amplification selon sa température de fusion (Tm) a été déterminée (Cambier et al., 2010). Cette analyse quantitative est donc complétée par une analyse qualitative faite à la fois sur les branchies et la glande digestive. Les 2 approches que procure la RAPD-PCR en temps réel (ou RAPD-qPCR) ont permis de détecter des atteintes génotoxiques chez *R. philippinarum* et *C. gigas* causées par l'exposition au BaP dans les deux tissus utilisés. La palourde *R. philippinarum,* exposée à des concentrations aiguës et subaiguës de BaP et en utilisant deux modes de contamination (microalgues et eau de mer), présentent des atteintes génotoxiques présentés sous forme de modifications de la composition de l'ADN (tableaux XXIII, XXIV, XXV, XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX, XXX, XXXI XXXII, XXXIII, XXXIV). Les mêmes résultats ont été observés chez l'huître *C. gigas* exposée à des concentrations aiguës et subaiguës de BaP pendant 7 jours (tableaux XXXV, XXXVI, XXXVII). La technique RAPD-qPCR a permis de détecter des altérations génomiques chez le poisson zèbre *D. rerio* exposé à 0,1 et 1 µM de BaP à travers une analyse quantitative et qualitative (Šrut et al., 2015). L'effet génotoxique du BaP a été aussi déterminé par le test de micronoyaux chez la moule *M. galloprovincialis* exposée à 19 µg BaP/L pendant 7 jours (Kamel et al., 2012). Les altérations génotoxiques causés par le BaP et détectées par la technique RAPD-qPCR peuvent être la conséquence de différents facteurs et peuvent être expliquées par plusieurs mécanismes (Šrut et al., 2015a). Ces altérations peuvent être la conséquence de la formation des adduits à l'ADN ou de l'apparition des mutations (mutations ponctuelles ou réarrangements) au niveau des sites d'hybridation des amorces RAPD, elles peuvent être dues aussi à des modifications structurales de l'ADN résultantes des mutations apparus à l'extérieur des sites d'hybridation

de l'amorce (Atienzar et Jha 2004, 2006 ; Qi et al. 2006). Les contaminants carcinogènes comme le BaP peuvent altérer aussi les processus de méthylation de l'ADN en modifiant l'ADN cible ou en inactivant l'enzyme ADN méthyltransférase (Atienzar et Jha 2004). Spécifiquement, le BaP peut induire une hypométhylation globale ou spécifique des gènes qui peut altérer l'expression des gènes, induire les taux de mutations et déclencher une instabilité génomique (Kisseljova et Kisseljov 2005 ; Fang et al., 2013). Atienzar et Jha (2004) ont rapporté que la formation des adduits à l'ADN, les cassures des brins d'ADN, les mutations ponctuelles et les réarrangements génomiques sont les altérations génotoxiques les plus importantes qui apparaissent suite à une exposition au BaP. Il a été rapporté que l'induction de la formation des adduits à l'ADN est plus rapide chez les bivalves exposés au BaP via l'eau de mer que chez les bivalves contaminés à travers la voie trophique. Cependant, le transfert du BaP à partir du tissue vers l'ADN semble être plus efficace lorsqu'il est accumulé à travers la voie trophique (Akcha el al., 2000). Dans ce travail, l'activité GST semble être inefficace dans la protection de l'ADN des altérations. Des résultats similaires ont été observés chez *M. galloprovincialis* exposée au BaP (Banni et al., 2010b). Ceci est peut être dû à la métabolisation du BaP par le système de biotransformation de phase I conduisant à la formation de métabolites intermédiaires électrophiles suivie d'une fixation des métabolites sur les sites nucléophiles de l'ADN (Banni et al., 2010b). L'époxyde diol (BPDE), le principal métabolite intermédiaire réactif du BaP, réagit fortement avec la position N-2 de la guanine dans l'ADN aboutissant à la formation des adduits anti-BPDE (Newbold et Brookes, 1976 ; Osborne et al., 1981). L'étude de la cinétique de contamination de la palourde *R. philippinarum* par 10 µg BaP/L montre un effet génotoxique du BaP après 1 jour d'exposition (tableaux XXXIII et XXXIV). On constate que l'effet génotoxique du BaP est persistant tout au long de la période d'exposition jusqu'à 14 jours. Ces résultats suggèrent que le BaP possède un effet génotoxique précoce sur les palourdes, ainsi ce contaminant et/ou ses métabolites réactifs atteignent rapidement le génome de l'organisme et réagissent avec la molécule d'ADN en provoquant des altérations génotoxiques après un temps court. L'exposition, *in vitro*, d'une lignée cellulaire de poisson (RTG-2) à 0,1 et 0,5 µg BaP/mL a montré des altérations génotoxiques après 1 jour d'exposition en utilisant la technique de RAPD (Castaño et Becerril, 2004). Šrut et al. (2015b) ont observés des altérations de l'ADN dans des cellules de poisson (PAC2) exposée, *in vitro*, à 0,1 µM de BaP pendant 2 heures. Les altérations de l'ADN, chez la moule *M. galloprovincialis* exposée à 19 µg BaP/L, n'ont pu être détectées qu'après 48 heures d'exposition en utilisant deux techniques, le test de comète et le test des micronoyaux (Banni et al., 2010b). Une comparaison entre nos résultats et ceux

de Banni et al. (2010b) montre que la technique RAPD-qPCR est plus sensible dans la détection des effets génotoxiques du BaP par rapport aux autres techniques. De plus, nous avons pu déterminer des effets génotoxiques du BaP à des faibles concentrations (2 µg/L et 5 µg/L) chez les bivalves, ce qui confirme la forte sensibilité de la RAPD-qPCR. Cette technique, vu sa grande sensibilité, nous a permis aussi de détecter des altérations de l'ADN chez les palourdes et les huîtres exposée à 0,01% de DMSO par l'analyse qualitative de la fréquence des produits de PCR selon leurs Tm. Cependant, des travaux antérieurs n'ont pas pu révéler d'effets toxiques sur l'intégrité de l'ADN suite à une exposition à des concentrations atteignant 1% de DMSO en appliquant le test de comète chez des modèles *in vitro* et *in vivo*. D'autres travaux ont montré que la RAPD-qPCR est plus sensible que le test de comète dans la détection des altérations de l'ADN causées par le BaP chez une lignée cellulaire de poisson et chez les larves et les adultes du poisson zèbre *D. rerio* (Šrut et al., 2015a,b). Il a été rapporté que cette technique est le plus sensible dans la détection des effets génotoxiques des contaminants autres que le BaP. Orieux et al. (2011) ont démontré que la technique RAPD-qPCR est plus sensible dans la détection de la génotoxicité des métaux par rapport au test de comète et le dosage de 8-oxo-7,8-dihydro-20-déoxyguanosine (8-oxodG). Les études de génotoxicité sont généralement basées sur le test des micronoyaux et le test de comète. Cependant, ces deux tests ont échoué à plusieurs reprises dans la détection de la génotoxicité induite par les polluants en raison de leur faible sensibilité. En effet, le rongeur *Microtus pennsylvanicus* exposés à un environnement pollué par les pesticides organochlorés et les métaux n'a pas présenté ni une augmentation du nombre des micronoyaux ni une augmentation de la taille de la queue de comète de l'ADN (Knopper et Mineau, 2004). De plus, le test de comète n'a montré aucun effet génotoxique du Cd chez la moule *M. edulis* exposée à une concentration de 200 µg Cd/L pendant 4 semaines (Pruski et Dixon, 2002). Cependant, plusieurs études ont pu valider la technique RAPD-qPCR comme une méthode très sensible dans la détection des altérations de l'ADN chez différentes espèces aquatiques et pour différents contaminants environnementaux (Cambier et al., 2010 ; Geffroy et al., 2011 ; Orieux et al., 2011 ; Dedeh et al., 2014a ; Šrut et al., 2015a). Cette différence dans la sensibilité vis-à-vis des altérations de l'ADN entre ces méthodes revient au fait que les tests de micronoyaux et de comète détectent les effets clastogènes des xénobiotiques alors que la RAPD-qPCR permet la détection des changements spécifiques causés par des mutations : réarrangements ou des substitutions de paires de bases conduisant à des modifications du nombre total de sites d'hybridation (Cambier et al., 2010).

La figure 55 illustre les résultats concernant la variation du nombre des sites d'hybridation au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes *R. philippinarum* exposées aux différentes concentrations de BaP (subaiguës et aiguës) via l'eau de mer pendant 7 jours.

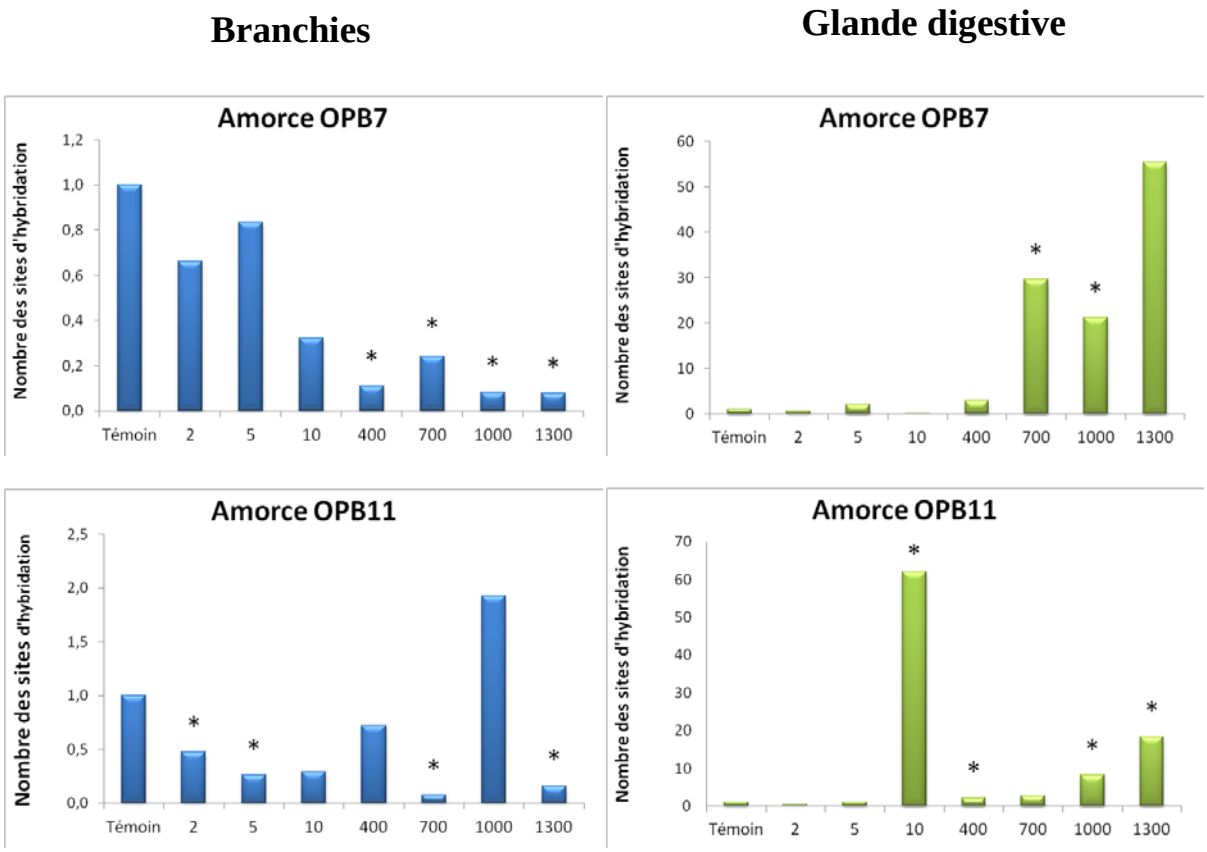


Figure 55 : Variation des sites d'hybridation dans l'ADN génomique au niveau des branchies et de la glande digestive des palourdes *R. philippinarum* exposées aux différentes concentrations de BaP via l'eau de mer pendant 7 jours. Pour chaque condition, le nombre des sites d'hybridation a été calculé par rapport à son témoin relatif. *différence significative par rapport au témoin ($p < 0,05$).

7.4. Effets du BaP sur la réponse transcriptionelle chez *R. philippinarum* et *C. gigas*

7.4.1. Expression des gènes de détoxication

Chez les mammifères, il a été démontré que la détoxication du BaP se produit à travers l'activation du récepteur d'aryl hydrocarbure (aryl hydrocarbon receptor, AHR). La protéine AHR inactive est présente dans le cytoplasme lié à deux molécules de HSP90. La

liaison du ligand à l'AHR cause la dissociation des HSP90 et l'association de l'ARNt (AHR de translocation nucléaire). Ce complexe formé va agir comme un facteur de transcription de nombreux gènes tels que la famille des CYP450 et d'autres enzymes de détoxication (Whitlock, 1999). Dans ce travail, nous avons observé une surexpression du gène *ahr* chez *R. philippinarum* nourris par la microalgue *I. galbana* contaminée par le BaP. Au niveau des branchies, l'expression du gène *ahr* augmente chez les palourdes contaminées mais cette augmentation n'est pas statistiquement significative (figure 40). Alors qu'au niveau de la glande digestive l'augmentation de l'expression du gène *ahr* chez les palourdes contaminées au BaP est significative (figure 41). La contamination des palourdes par des concentrations subaiguës (2 et 5 µg/L) de BaP montre une surexpression du gène *ahr* plus marquées dans les branchies que dans la glande digestive (figures 43 et 44). Ces résultats suggèrent que le mode de contamination influence différemment les deux organes (branchies et glande digestive). En effet, l'impact du BaP libre dans l'eau de mer est plus important dans les branchies alors que l'impact du BaP associé aux cellules d'algue est plus important dansr la glande digestive. Liu et al. (2010) ont montré que l'ARNm de l'*ahr* est présent au niveau de différents organes (muscle adducteur, manteau, branchies et glande digestive) chez *R. philippinarum* et que les branchies présentent la quantité d'ARNm la plus élevée. D'autres auteurs ont rapporté que le BaP pénètre dans les cellules des bivalves par deux voies : la liaison au récepteur AHR et la diffusion directe à travers la membrane cellulaire (Châtel et al., 2012). Nos résultats montrent aussi que les fortes concentrations de BaP (400, 700 et 1000 µg/L) induit l'expression du gène *ahr*, alors qu'une concentration égale à 1300 µg BaP/L inhibe l'expression du gène dans les branchies et l'induit dans la glande digestive mais à un niveau moins élevée par rapport aux autres concentrations (figures 46 et 47). Ceci confirme que les branchies sont plus sensibles au BaP présent dans l'eau de mer, puisque les branchies sont en contact direct avec l'eau de mer contrairement à la glande digestive. Des études antérieurs ont montré que la présence de BaP dans l'eau induit l'expression du gène *ahr* (Liu et al., 2010 ; Châtel et al., 2012). L'exposition de la palourde *R. philippinarum* à 10 µg BaP/L pendant différentes périodes montre une surexpression du gène *ahr* après 1 et 3 jours d'exposition au niveau des branchies et après 1 jour d'exposition au niveau de la glande digestive, alors qu'il n' y a pas de variation du taux d'expression après 7 et 14 jours d'exposition par rapport au témoin (figures 49 et 50). Ceci suggère l'apparition d'une réaction d'acclimatation chez la palourde pendant les premiers jours de contamination. Liu et al., (2010) ont montré une augmentation de l'expression du gène *ahr* chez *R. philippinarum* après exposition à des concentrations chroniques (0,01 et 0,2 µg/L) de BaP pendant 3 et 10 jours. Ces auteurs ont rapporté aussi que

le niveau d'expression du gène *ahr* est lié à la concentration de BaP et à la période d'exposition. L'étude du gène *ahr* chez le bivalve *Chlamys farreri* exposé à 10 µg BaP/L a montré une sous-expression du gène après 3 jours d'exposition, alors qu'une exposition pendant 10 jours ne montre pas de différence dans l'expression génétique par rapport au témoin (Tian et al., 2013).

Une fois pénétré dans l'organisme, le BaP va subir des processus d'oxydation réalisés par le système du cytochrome P450 (phase I). Ensuite, les métabolites issus de la phase I peuvent subir une autre métabolisation par les enzymes de conjugaison (phase II), tel que la GST, ce qui les rendra facilement excrétable. Nos résultats montrent une augmentation de l'expression des gènes *cyp4* et *gst* chez les palourdes exposées au BaP dans les deux premières expériences, à l'exception du gène *cyp4*, mesuré dans la glande digestive des palourdes exposées à 2 et 5 µg BaP/L, qui présente une diminution du niveau de l'expression par rapport au témoin (figures 40, 41, 43 et 44). Ceci montre que la transcription de ces deux gènes est modulée par le BaP. Il existe plusieurs familles de gène *cyp450*, parmi lesquelles les gènes *cyp1*, *cyp2*, *cyp3* et *cyp4* sont impliqués dans la métabolisation des xénobiotiques (Nebert and Nelson, 1991). Pan et al. (2011) ont cloné le gène *cyp4* chez *R. philippinarum* et ils ont rapporté qu'il n'y a pas da variation dans l'expression de ce gène dans les branchies de *R. philippinarum* exposée au BaP, alors que l'expression du gène *cyp4* a été induite dans la glande digestive de la palourde après 10 jours d'exposition à 0,2 µg BaP /L. Des travaux antérieurs ont montré que les HAPs ont des effets inducteurs sur l'expression des gènes de la famille *cyp4* chez les polychètes *Nereis virens* et *Perinereis nuntia* (Rewitz et al., 2004 ; Zheng et al., 2013). Liu et al. (2014) ont montré une induction de l'expression des gènes *cyp4* et *cyp414a1* par 0,03, 0,3 et 3 µg BaP/L et ils ont rapporté que le gène *cyp4* est plus sensible aux faibles concentrations de BaP que le gène *cyp414a1*. Par contre, Papo et al. (2014) n'ont pas trouvé de modification de l'expression du gène *cyp4* dans la glande digestive de *R. philippinarum* exposée à 0,03, 0,5 et 1 mg BaP/L pendant 24h. Ces derniers auteurs ont rapporté aussi que le gène *gst-rho* n'est induit que chez les palourdes exposées à 1 mg BaP/L. Une induction dose-dépendante du gène *gst-pi* a été rapporté au niveau des branchies et de la glande digestive de *Chlamys farreri* exposée à 0,01 et 0,2 µg BaP/L (Miao et al., 2011). L'exposition des palourdes à des concentrations aiguës de BaP (de 400 µg/L à 1300 µg/L) montre une surexpression des gènes *cyp4* et *gst* pour la condition 400 µg BaP/L, une sous-expression du gène *cyp4* au niveau des branchies pour les conditions 700, 1000 et 1300 µg BaP/L et une sous-expression du gène *gst* au niveau des branchies pour la condition 1300 µg

BaP/L. Pour les conditions 700 et 1000 µg BaP/L, la transcription du gène *gst* ne présente pas de variation par rapport au témoin (figure 46). Ces résultats montre que les gènes *cyp4* et *gst* sont réprimés à partir d'une concentration de 700 µg/L de BaP. Des études antérieures ont rapporté que l'activité du CYP1A peut entraîner la production des ERO, qui peuvent provoquer la répression des gènes *cyp1a1* et *ahr* (Barouki et Morel, 2001 ; Benedetti et al., 2007 ; Tian et al., 2013). Ainsi, nous supposons que le stress oxydant élevé et la génotoxicité significative causés par les concentrations aiguës de BaP peuvent être parmi les facteurs responsables de la répression de l'expression des gènes *cyp4* et *gst*. Cette répression de la transcription des deux gènes peut être aussi due à l'altération des fonctions biologiques et la dégradation de l'état de santé global de la palourde contaminée. Les résultats de l'étude cinétique du BaP montrent une surexpression du gène *cyp4* après 1 et 3 jours d'exposition et du gène *gst* après 1 jour d'exposition au niveau des branchies, alors que dans la glande digestive on a observé une sous-expression du gène *cyp4* après 7 jours d'exposition (figures 49 et 50). Ceci montre une réponse transcriptionelle précoce pour les gènes de détoxication du BaP chez la palourde essentiellement au niveau des branchies qui présentent le premier organe qui entre en contact avec le contaminant. La palourde *R. philippinarum* exposée à des concentrations subaiguës de BaP présente une surexpression progressive des gènes *cyp4* et *gst-pi* à partir d'un jour et jusqu'à 21 jours d'exposition (Liu et al., 2014). La même espèce exposée à des faibles concentrations (0,01 et 0,2 µg/L) de BaP présente une induction de la transcription du gène *gst-pi* après 3 et 10 jours d'exposition (Xu et al., 2010). Nos résultats sont similaires à ceux de Wang et al. (2011) qui ont montré une augmentation de l'expression du gène *gst-pi* chez *R. philippinarum* (branchies et glande digestive) après 1 et 3 jours d'exposition à 0,01 µg BaP/L, alors que les périodes d'exposition de 6, 12 et 21 jours ne montrent pas de variation du niveau d'expression par rapport au témoin. Tian et al. (2013) ont observé une surexpression du gène *cyp4* chez le bivalve *C. farreri* exposé à 10 µg BaP/L pendant 3 et 10 jours. L'expression du gène *cyp4* semble être associée à l'expression du gène *ahr* chez les palourdes exposées à des concentrations de BaP inférieures à 700 µg/L. Cette expression associée des deux gènes est plus marquée au niveau des branchies. Ceci implique que l'action du AHR peut être impliqué dans la régulation des gènes *cyp* chez les invertébrés (Tian et al., 2013).

Dans ce travail, l'exposition de l'huître *C. gigas* à des concentrations aiguës et subaiguës de BaP montre une augmentation de l'expression des gènes *cyp1a1* et *gst* au niveau des branchies (figure 52). Au niveau de la glande digestive, le gène *cyp1a1* est surexprimé à

partir de la concentration 20 µg BaP/L et le gène *gst* est surexprimé à partir de la concentration 400 µg BaP/L (figure 53). Ces résultats montrent que les gènes de métabolisation de *C. gigas* supportent mieux les fortes concentrations de BaP que ceux de *R. philippinarum* et ils sont induits même après exposition à une concentration de 1000 µg BaP/L. Ces résultats suggèrent que l'huître *C. gigas* a plus l'aptitude de supporter et de survivre à une exposition par des concentrations très élevées de contaminants environnementaux que la palourde *R. philippinarum*. Ces résultats montrent aussi que la réponse transcriptionelle des gènes de métabolisation dans les branchies est plus sensible au BaP libre dans l'eau de mer que la réponse transcriptionelle dans la glande digestive. L'huitre C. gigas exposée à un mélange d'hydrocarbures a montré une induction de l'expression des gènes de métabolisation au niveau de la glande digestive, avec un niveau d'expression le plus élevé du gène *cyp1a1* observé entre les jours d'exposition 7 et 15. Le gène *gst-omega* présente un niveau d'expression maximal entre les jours d'exposition 3 et 11 (Boutet et al., 2004). Tian et al. (2013a,b) a rapporté une induction de l'expression du gène *cyp1a1* par 0,025 µg BaP/L et une inhibition de l'expression du même gène par 10 µg BaP/L chez *C. farreri*.

Les protéines de résistance multi-drogues (Multi-Drug Resistance, MDR) ont été largement décrite dans les cellules cancéreuses en tant que transporteurs membranaires impliquées dans la résistance à la chimiothérapie (Sarkadi et al., 2006). Ils sont présents dans pratiquement tous les organismes vivants des procaryotes aux eucaryotes. Les protéines MDR sont des pompes membranaires de détoxication qui provoquent un efflux transportant les xénobiotiques en dehors des cellules. Ils réagissent avec différentes molécules, y compris les composés hydrophobes (HAPs, pesticides et insecticides), les métaux lourds et la majorité des drogues pharmaceutiques (Sarkadi et al., 2006 ; Vache et al., 2007 ; Marquez, 2011). Nos résultats montrent que l'expression du gène *mdr* chez les deux bivalves *R. philippinarum* et *C. gigas* est généralement induite par le BaP. La transcription du gène semble être dépendante de différents paramètres : l'espèce, le type de tissu, le mode de contamination, la concentration du contaminant et la période de contamination. En effet, la contamination des palourdes à travers la nourriture (première expérience) provoque une induction de l'expression du gène *mdr* au niveau des branchies et de la glande digestive (figures 40 et 41), alors que la contamination des palourdes via l'eau de mer (deuxième expérience) cause une induction de l'expression du gène dans les branchies seulement (figures 43 et 44). De plus, les concentrations de BaP atteignant 700 µg/L provoquent une augmentation de l'expression du gène *mdr* chez les palourdes, alors que les concentrations supérieures à 700 µg BaP/L

empêchent l'augmentation de la transcription du *mdr* (figures 46 et 47). L'exposition à 1000 µg BaP/L induit l'expression du gène *mdr* chez *C. gigas* (figures 52 et 53), alors qu'elle empêche son induction chez *R. philippinarum*. L'exposition des palourdes à 10 µg BaP/L provoque une induction (statistiquement non significative) de l'expression du gène *mdr* après 1 jour au niveau des branchies et après 3 jours au niveau de la glande digestive, ces augmentations de l'expression génétique sont suivies d'une sous-expression du gène *mdr* au niveau des deux organes après 7 jours d'exposition puis d'un retour du niveau d'expression à la normale (niveau d'expression chez le témoin) après 14 jours d'exposition (figures 49 et 50). Ces variations temporelles de la réponse transcriptionelle du gène *mdr* semblent être dues à une réaction d'acclimatation chez la palourde *R. philippinarum*. Les cinq expériences montrent que la variation de l'expression du gène *mdr*, codant pour des protéines de phase III, est peut être associée à l'expression des gènes *cyp* et *gst* respectivement codants pour des enzymes de phase I et de phase II. Ceci suggère que le BaP induit des réactions de métabolisation complémentaires chez les bivalves impliquant les systèmes protéiques des trois phases I, II et III destinés à éliminer les contaminants lipophiles tels que les HAPs (Medeiros et al., 2008). Une augmentation de l'expression de la phospho-glycoprotéine (produit du gène *mdr*) a été enregistrée chez la truite *Salmo trutta* exposée à différentes concentrations de BaP (Valton et al., 2013). Une exposition de *C. gigas* à une eau usée domestique non traitée pendant 48 heures a provoqué une induction du gène *mdr* (Medeiros et al., 2008). Feldstein et al. (2006) ont montré que l'exposition du bivalve *Brachidontes pharaonis* à 100 et 200 ppb de diesel induit l'expression du gène *mdr*. Le gène *mdr* au niveau de la glande digestive de *Dreissena polymorpha* est induit après 24 heurs d'exposition au BaP, alors qu'au niveau des branchies, il est induit après 12 heures d'exposition (Châtel et al., 2012).

7.4.2. Expression des gènes de la défense antioxydante

Les processus de biotransformation entrainent une bio-activation des xénobiotiques qui peut causer une génération des ERO et une induction des dommages oxydatifs (Regoli et Giuliani, 2013). Les effets délétères du stress oxydatif sont éliminés par le système antioxydant. La catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase sont les trois principaux composantes de défenses antioxydantes, chaque enzyme catalyse une réaction spécifique avec les ERO (Regoli et Giuliani, 2013). Nos résultats montrent que le BaP module l'expression des gènes *cat*, *sod*, et *gpx* au niveau des branchies et de la glande digestive des bivalves. Cette variation transcriptionelle est caractérisée dans la plupart des cas

par une augmentation du niveau d'expression des gènes. La contamination de la *palourde R. philippinarum* par le BaP à travers la nourriture a montré une induction de l'expression du gène cat dans les branchies et du gène *sod* dans la glande digestive. Une induction (non significative) de l'expression du gène *gpx* a été observée aussi dans les deux organes (figures 40 et 41). Ces résultats suggèrent qu'une partie du BaP liée à la surface membranaire de la microalgue ont été libérés et elle a pu pénétrer dans les cellules des branchies causant ainsi une génération des ERO. La partie de BaP qui reste liée à la surface membranaire des cellules de microalgue et la partie de BaP se trouvant dans le cytoplasme de ces cellules atteignent et pénètrent dans les cellules de la glande digestive et induisent ainsi un stress oxydant. Les palourdes exposées à des concentrations subaiguës de BaP présentent une induction des trois gènes *cat, sod* et *gpx* au niveau des deux organes (figures 43 et 44). Comparés avec les résultats de la première expérience (contamination par la nourriture), ces résultats montrent que la réponse transcriptionelle du système antioxydant est plus importante chez les palourdes contaminées par l'eau de mer malgré que les concentrations de BaP utilisées dans cette expérience (2 et 5 µg/L) sont nettement plus faibles que celles utilisées pour contaminer les cultures de microalgue (400 et 1000 µg/L), ce qui implique que le BaP présent sous forme libre dans l'eau est plus toxique pour l'organisme par rapport au BaP associé à la nourriture. La surexpression des gènes *cat, sod* et *gpx* implique un niveau élevé des ERO. Zheng et al. (2011) ont montré une induction de l'expression des gènes de la défense antioxydante (*cat, sod* et *gpx*) chez le ver *Perinereis nuntia* exposé à 10 µg BaP/L. L'expression du gène sod est induite aussi chez la moule *Mytilus spp.* collectée dans un port dans la baie de Brest (France) (Lacroix et al., 2014).

Les palourdes exposées à des concentrations aiguës de BaP présentent une surexpression du gène *gpx*, une sous-expression du gène *sod* et un niveau d'expression du gène cat similaire au témoin (figures 46 et 47). Nos résultats montrent que le gène *sod* est le plus sensible à une contamination par le BaP puis le gène *cat* et ensuite le gène *gpx*. Les travaux de Liu et al. (2015) ont montré aussi que le gène *sod* est plus sensible que le gène *gpx* lors d'une contamination par 1 et 4 µg BaP/L. En raison de cette différence de sensibilité entre les trois gènes, on remarque que l'expression du gène *sod* est inhibée par des concentrations aiguës de BaP (400 à 1300 µg/L), alors que l'expression du gène *gpx* est induite par ces concentrations. Concernant le gène *cat*, les concentrations aiguës de BaP empêchent l'induction de sa transcription. Ceci montre que d'autres voies alternatives pour la réduction du peroxyde d'hydrogène peuvent compenser le faible niveau d'expression du gène

cat chez les palourdes exposées à des concentrations aiguës de BaP. Ces voies alternatives sont représentées par une induction de l'expression du gène *gpx* puisque l'enzyme GPx permet aussi la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, avec une efficacité plus faible que la CAT mais avec une affinité élevée (Pamplona et Costantini, 2011). Chen et al. (2011) ont rapporté une induction de l'expression des gènes *cat* et *sod* chez le ver *Eisenia fetida* exposé à des faibles doses de muscs synthétiques (tonalide et galaxolide) et une inhibition de l'expression de ces gènes chez la même espèce exposée à des doses élevées de muscs.

Contrairement aux palourdes, les concentrations aiguës (400 et 1000 µg/L) de BaP provoquent une induction de l'expression des gènes *cat*, *sod* et *gpx* chez *C. gigas* (figures 52 et 53), ce qui implique que l'huître est apte à supporter et réagir à des concentrations très fortes de BaP causant chez la palourde *R. philippinarum* des altérations des systèmes biologiques (défense antioxydante et détoxication). Les résultats montrent aussi que l'activité enzymatique de la CAT est associée au niveau d'expression du gène *cat*. La forte inhibition de la transcription du gène *sod* et l'absence d'induction de la transcription du gène *cat* provoquées par les concentrations aiguës de BaP peuvent avoir une importante conséquence sur les palourdes. Ceci est en accord avec les niveaux élevés de la peroxydation lipidique et l'absence d'induction de l'activité CAT observés au niveau des branchies et de la glande digestive de *R. philippinarum*. Une diminution de l'activité CAT a été observée chez des crabes collectés dans des sites pollués, accompagnée d'une réduction de la capacité à neutraliser les ERO et d'une sensibilité accrue au stress oxydant (Montes-Nieto et al., 2007 ; 2010). L'exposition de l'huître *C. gigas* à un mélange d'hydrocarbures pendant 3 semaines entraine une induction de l'expression du gène *sod* (Boutet et al., 2004).

Les palourdes exposées à 10 µg BaP/L montrent que les gènes *cat* et *sod* sont surexprimés après 1 et 3 jours d'exposition au niveau des branchies, alors que les gènes *sod* et *gpx* sont surexprimés après 7 et 14 jours d'exposition au niveau de la glande digestive (figures 49 et 50). Ceci est due au fait que les branchies présentent le premier organe qui entre en contact et accumule temporairement le BaP à travers la filtration de l'eau de mer, ensuite il le diffuse vers les autres organes, essentiellement la glande digestive. L'étude de la cinétique de la contamination par le BaP confirme que les gènes *cat* et *sod* sont plus sensibles à la génération des ERO par le contaminant par rapport au gène *gpx*, puisque nous avons observé une induction précoce de l'expression des gènes *cat* et *sod* après 1 et 3 jours d'exposition alors que l'expression du gène *gpx* n'a été induit (d'une manière non significative) qu'après 7 et 14 jours d'exposition. Des études antérieurs ont rapporté que l'expression des gènes *cat* et

sod, chez la moule *Dreissena polymorpha* exposée à 10 et 100 µg BaP/L, est induite au niveau des branchies avant qu'elle soit induite au niveau de la glande digestive (Châtel et al., 2012). La palourde *R. philippinarum* exposée à 0,01 µg BaP/L présente une augmentation de l'expression du gène *sod* après 1 jour au niveau des branchies et après 3 jours d'exposition au niveau de la glande digestive (Wang et al., 2011).

7.4.3. Expression des gènes du métabolisme mitochondrial

La mitochondrie représente la principale source de production du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène dans la cellule (Turrens 1997). Certaines études se sont intéressées à l'effet des xénobiotiques sur le métabolisme mitochondrial (Wang et al., 2004 ; Achard et al., 2006 ; Dedeh et al., 2014a et b). Dans ce travail, nous avons évalué l'effet du BaP sur le métabolisme mitochondrial en suivant l'expression de certains gènes impliqués dans la chaine de transfert d'électrons de la mitochondrie. Le cytochrome c oxydase-sous unité 1 (COX1) fait partie du complexe VI de la chaine respiratoire mitochondriale qui transfère les électrons à partir du cytochrome c réduit vers l'oxygène et qui contribue à la production d'un gradient électrochimique de protons à travers la membrane mitochondriale interne qui entraine la synthèse de l'ATP (Capaldi, 1990). Il a été rapporté que l'activité COX chez une souche de cellules HeLa tolérante à l'oxygène est deux fois supérieure à celle mesurée chez une souche de cellules HeLa non tolérante et qu'une inhibition de l'activité COX conduit à une augmentation de la production des ERO (Campian et al., 2004), ainsi l'étude de la composante COX peut être d'un grand intérêt dans le domaine de l'écotoxicologie. De plus, parmi les avantages de l'utilisation du COX dans l'étude de l'impact des xénobiotiques sur le métabolisme mitochondrial est le fait que la séquence du gène *cox1* est très conservé entre les eucaryotes inférieurs et supérieurs (Capaldi, 1990). Nos résultats ont montré un impact du BaP sur l'expression du gène *cox1* avec une surexpression du gène au niveau des branchies et de la glande digestive de *R. philippinarum* exposée à des concentrations subaiguës de BaP (figures 43 et 44). Une corrélation a été démontrée entre l'augmentation de l'expression du gène *cox1* et le phénomène d'intersexe chez la palourde *Scrobicularia plana* collectée dans des sites pollués (Ciocan et al., 2015). Une surexpression du gène *cox1* a été rapporté chez des poissons et des moules exposés aux métaux et chez un escargot exposé aux perturbateurs endocriniens (Gonzalez et al., 2006 ; Giusti et al., 2013 ; Varotto et al., 2013). Vu que la COX1 est considéré comme une composante très importante dans la respiration mitochondriale (Villani et Attardi, 2000), la surexpression du gène *cox1* peut être un mécanisme compensatoire pour restaurer la diminution de l'activité mitochondriale et

augmenter l'efficacité de consommation de l'oxygène, limitant ainsi les altérations cellulaires du BaP. La protéine cytochrome b (CYTB) est une composante du complexe III impliqué dans la chaine respiratoire de la mitochondrie (Howell, 1989). Nos résultats montrent que les faibles concentrations de BaP peuvent induire l'expression du gène *cytb*, mais avec une efficacité plus faible que pour le gène *cox1* (figure 43). Le mécanisme adaptatif proposé pour *cox1* est renforcé par la surexpression du gène *cytb*, impliquant ainsi un besoin cellulaire en énergie due à l'effort déployé dans la défense contre le contaminant. Des travaux antérieurs ont montré une surexpression du gène *cytb* chez des palourdes exposées *in vivo* aux métaux et *in situ* aux perturbateurs endocriniens (Dedeh et al., 2014b ; Ciocan et al., 2015). L'exposition de *R. philippinarum* à des concentrations aiguës de BaP a entrainé une forte inhibition de l'expression des gènes *cox1* et *cytb* au niveau des deux organes, à l'exception des branchies pour la condition 400 µg BaP/L qui ont montré une augmentation de la transcription (figures 46 et 47). Cette inhibition a été maximale pour la plus forte concentration de BaP (1300 µg/L) avec un taux d'inhibition de la transcription du gène *cox1* de 378 fois au niveau de la glande digestive par rapport au témoin (DMSO) et un blocage absolu de la transcription du même gène (expression relative égale à 0) au niveau des branchies, suggérant un dysfonctionnement de la chaine respiratoire mitochondriale. Ceci est en accord avec d'autres résultats qui ont montré qu'une exposition prolongée aux HAPs (4 semaines) par voie dissous (50 et 200 µg/L) peut altérer la gestion de l'énergie des huîtres (Jeong et Cho, 2007). Une sous-expression du gène *cox1* a été observée chez *C. gigas* contaminée par les HAPs par voie trophique après 7 jours d'exposition (Bijoux, 2014). L'inhibition de la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial est associée à l'inhibition de la transcription des gènes de détoxication (*cyp4*, *gst* et *mdr*) et de la défense antioxydante (*sod*), ce qui montre une altération des fonctions vitales de la cellule qui peut causer sa mort. Nos résultats suggèrent que la les mécanismes de défense antioxydante et de métabolisation sont fortement liés au métabolisme mitochondrial qui fourni de l'énergie (production de l'ATP) pour la cellule lui permettant de lutter contre un stress chimique. Il a été démontré qu'une réduction de l'activité COX provoque une réduction de l'activité Na^+/K^+-ATPase, un facteur important responsable de la mort des neurones dans le cerveau des mammifères (Greenamyre et al., 1999). La contamination *in vivo* du bar *Dicentrarchus labrax* par la BaP pendant une courte période provoque une augmentation de l'activité Na^+/K^+-ATPase au niveau des branchies (Lemaire-Gony et al., 1995). Il a été rapporté aussi que l'inhibition du complexe IV provoque une réduction rapide et sévère de la teneur cellulaire en ATP entrainant la mort de la cellule (Zhang et al., 2001). Une diminution de l'expression du gène *cytb* a été rapportée dans les

branchies et la glande digestive des mollusques marins (Manelis et al., 1993 ; Varotto et al., 2013). L'huître *C. gigas* exposée au BaP montre une surexpression des gènes *cox1* et *cytb*, même en utilisant des concentrations très élevées de l'ordre de 400 et 1000 µg BaP/L (figures 52 et 53). Cette réponse transcriptionelle chez l'huitre creuse montre qu'elle est plus résistante aux fortes concentrations de HAPs par rapport à la palourde *R. philippinarum.* L'augmentation de l'expression des gènes *cox1* et *cytb* chez C. gigas est associée à la surexpression des gènes impliqués dans les processus de détoxication et dans la défense antioxydante ce qui confirme que l'efficacité de la résistance cellulaire à un stress chimique est basée sur l'activité mitochondriale. Les résultats de l'exposition de *R. philippinarum* à 10 µg BaP/L pendant différentes périodes montrent une induction précoce (1 jours) de l'expression du gène *cox1* alors que la surexpression du gène *cytb* a été observée après 3 jours d'exposition. De plus, le gène *cox1* semble être plus sensible que le gène *cytb* dans le cas d'une exposition à un HAP (figures 49 et 50).

Afin de quantifier le nombre des mitochondries dans les cellules, nous avons mesurés l'expression du gène *ARNr 16S*. Les résultats montrent une surexpression du gène au niveau des branchies des palourdes contaminées par voie trophique, suggérant une augmentation du nombre de mitochondries pour répondre à un besoin cellulaire en énergie due aux mécanismes de détoxication (figures 40 et 41). Alors que les palourdes exposées à des concentrations subaiguës de BaP par voie directe n'ont pas montré une modification de l'expression de ce gène (figures 43 et 44). Dedeh et al. (2014b) ont rapporté une induction de l'expression du gène *ARNr 16S* chez *R. philippinarum* exposée aux métaux lourds. D'autres auteurs ont utilisé le gène *ARNr 12S* pour quantifier le nombre de mitochondrie. Arini et al. (2014b) ont rapporté une induction de l'expression du gène *ARNr 12S* chez le bivalve *Corbicula fluminea* exposé *in situ* aux métaux. Paul-Pont et al. (2010) ont rapporté une surexpression du gène *ARNr 12S* chez le bivalve *Cerastoderma edule* exposé au mercure pendant 7 jours. Les palourdes exposées à des concentrations aiguës de BaP présentent une inhibition de l'expression du gène *ARNr 16S*, ce qui indique une diminution du nombre de mitochondrie (figures 46 et 47). Ceci suggère que les fortes concentrations de BaP altèrent les mitochondries ainsi que leur activité. L'huître *C. gigas* présente une sous-expression du gène *ARNr 16S* au niveau des branchies pour les conditions 100, 400 et 1000 µg BaP/L indiquant une diminution du nombre de mitochondries, alors qu'au niveau de la glande digestive le gène est surexprimé pour les mêmes conditions (figures 52 et 53). La diminution du nombre de mitochondries semble être compenser par l'augmentation du métabolisme mitochondriale (induction des gènes *cox1* et

cytb). Parmi les mécanismes de détoxication des xénobiotiques chez les bivalves celui qui est basée sur les efflux actifs provoqués à travers des pompes appartenant à la famille des transporteurs ABC (ATP binding-cassette). Ces protéines membranaires utilisent l'ATP comme une source d'énergie pour éliminer les xénobiotiques en dehors de la cellule par un efflux actif (Achard et al., 2004). Ceci est en accord avec nos résultats qui montrent une certaine corrélation entre l'expression du gène mdr codant pour les protéines forant les transporteurs membranaires et les gènes *cox1* et *cytb* codant pour les protéines impliquées dans la synthèse de l'ATP au niveau de la mitochondrie. Ainsi, l'augmentation de l'expression des gènes *ARNr 16S, cox1* et *cytb* peut avoir comme objectif la production de l'énergie nécessaire pour éliminer le BaP et/ou ses métabolites par ce mécanisme de détoxication de phase III. Les palourdes exposées à 10 µg BaP/L présente une surexpression du gène *ARNr 16S* après 14 jours d'exposition, ceci implique que la réponse transcriptionelle de ce gène est tardive par rapport aux *cox1* et *cytb*.

Les figures 56 et 57 illustrent les résultats des expressions génétiques au niveau des branchies et de la glande digestive obtenus suite à l'exposition des palourdes *R. philippinarum* aux différentes concentrations de BaP (subaiguës et aiguës) via l'eau de mer pendant 7 jours.

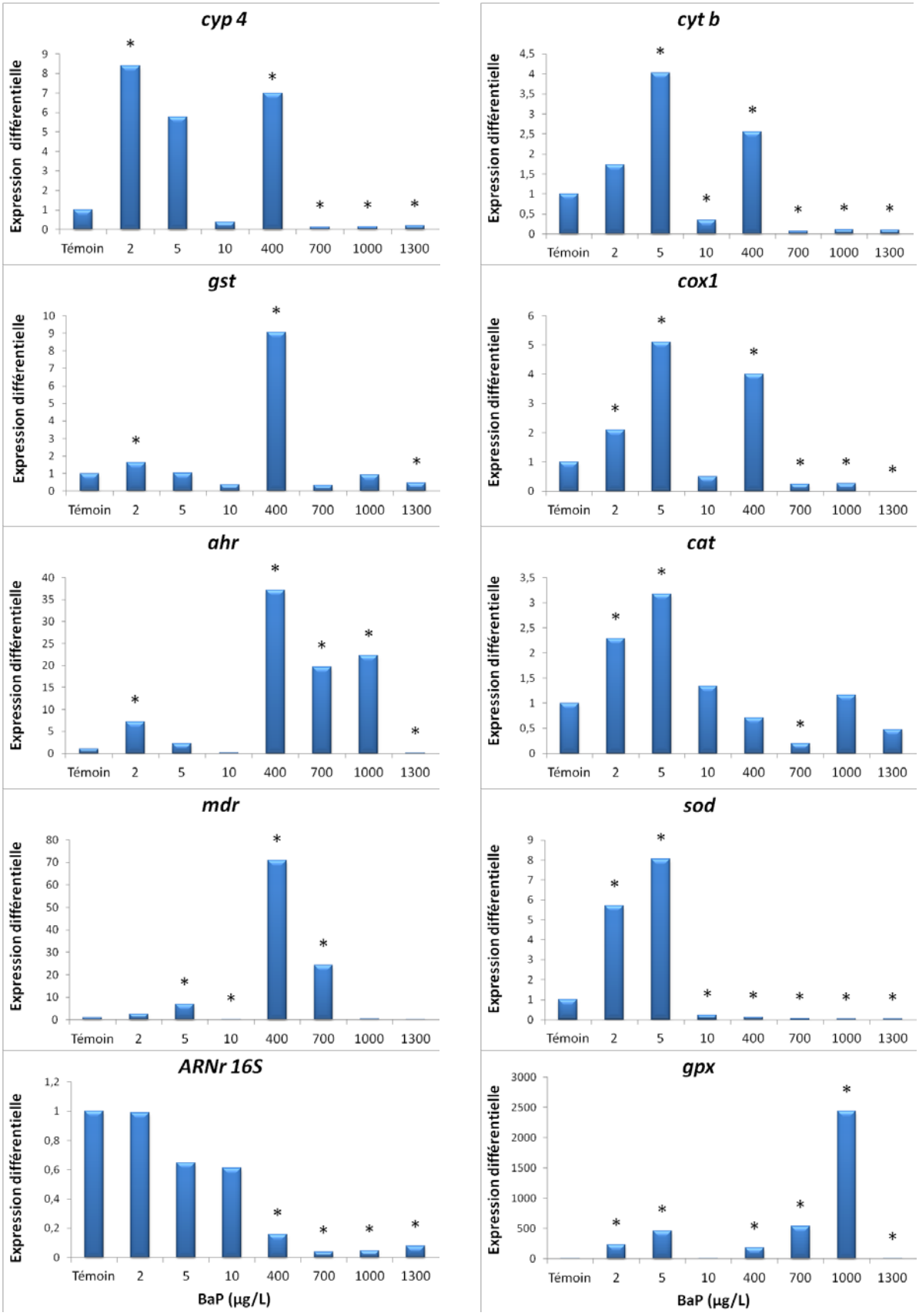


Figure 56 : Expressions différentielles des gènes sélectionnés dans les branchies des palourdes *R. philippinarum* après 7 jours d'exposition à différentes concentrations de BaP via l'eau de mer. Pour chaque condition, les expressions des gènes ont été calculées par rapport à leurs témoins relatifs. *différence significative par rapport au témoin ($p < 0,05$).

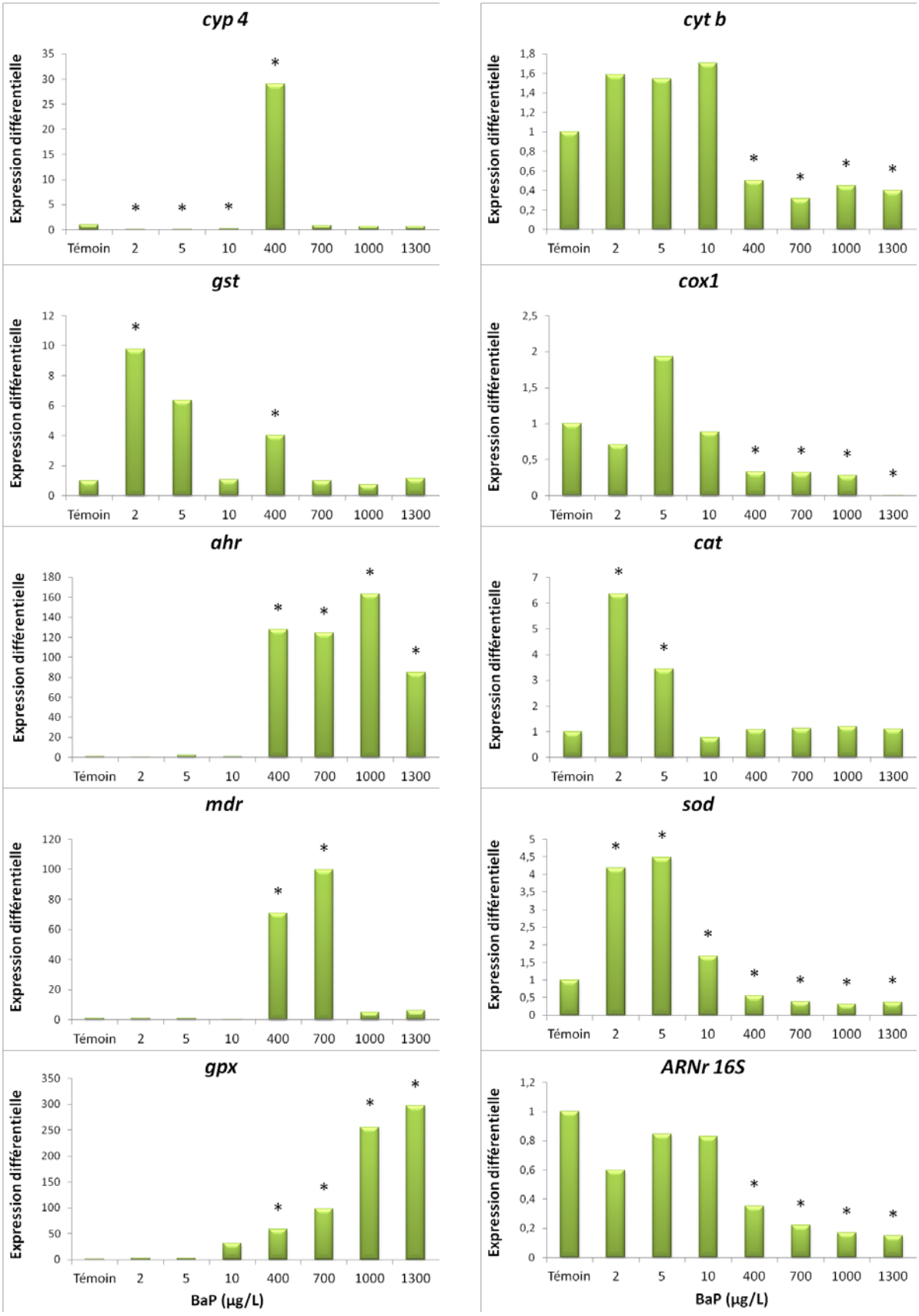


Figure 57 : Expressions différentielles des gènes sélectionnés dans la glande digestive des palourdes *R. philippinarum* après 7 jours d'exposition à différentes concentrations de BaP via l'eau de mer. Pour chaque condition, les expressions des gènes ont été calculées par rapport à leurs témoins relatifs. *différence significative par rapport au témoin ($p < 0,05$).

7.4.4. Expression des gènes de la défense immunitaire et de la reproduction chez *C. gigas*

La réponse inflammatoire est un réseau biologique de régulation complexe employé chez les organismes pour se protéger des agents pathogènes, des allergènes, des lésions tissulaires et des composés irritants (Ferrero-Miliani et al., 2007). Ce processus est coordonné par des effecteurs solubles, principalement les cytokines et les chémokines, qui peuvent provoquer une migration des cellules immunitaires vers le site de l'infection ou de la blessure (Baggiolini, 1998). L'interleukine 17 (ILK), initialement identifié comme des lymphocytes T cytolytiques associés à l'antigène 8, est une cytokine produite par les lymphocytes T caractérisée par une activité pro-inflammatoire (Rouvier et al., 1993). En tant que cytokine pro-inflammatoire, ILK joue un rôle important dans l'élimination des bactéries extracellulaires et contribue à la pathologie de nombreuses maladies auto-immunes et allergiques. En plus, ILK peut interférer avec d'autres cytokines et activer les facteurs de transcriptions impliquées dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire tels que NF-kB (nuclear factor-kappa B) et la protéine activatrice 1 (AP-1) en les plaçant au centre du réseau inflammatoire (Iwakura et al., 2011). Chez *C. gigas*, le taux d'expression du gène *ilk* le plus élevée a été localisé au niveau des branchies, alors que la glande digestive présente un taux d'expression inférieur à celui des branchies et supérieur au reste des organes (manteau, muscle adducteur, gonades, cœur et hémocytes). Dans ce travail, l'exposition de l'huître *C. gigas* au BaP a entrainé une augmentation de l'expression du gène *ilk* au niveau des branchies et de la glande digestive, ce qui suggère l'induction du système immunitaire à travers une réponse inflammatoire chez le bivalve (figures 52 et 53). Cette réponse inflammatoire est probablement due à des lésions tissulaires causées par le BaP. Il a été démontré que les transcrits du gène *ilk* augmentent dans les hémocytes de *C. gigas* injectée par des bactéries, ce qui est conforme avec la fonction immunitaire des protéines ILK (Roberts et al., 2008). Il a été rapporté que la contamination de la souris par une faible dose de mercure provoque une augmentation de la concentration des protéines ILK au niveau du cœur avec l'apparition de fibrose chronique (Nyland et al., 2012). Une corrélation entre la concentration de PCB et le niveau d'expression du gène *ilk* a été rapporté chez la phoque Pusa hispida (Brown et al., 2014). Hur et al. (2013) ont rapporté une induction de l'expression des gènes *ilk* chez le poisson plat *Paralichthys olivaceus* exposé au BaP. Une étude *in vitro* a montré que l'induction de l'expression du gène *ilk* par le BaP est liée à l'activation du récepteur AHR et elle contribue aux effets inflammatoires des voies respiratoires (Podechard et al., 2008). Dans notre travail, la surexpression du gène *ilk* au niveau des branchies a été

observée à partir de la concentration de 5 µg BaP/L, alors qu'elle a été observée à partir de 100 µg BaP/L au niveau de la glande digestive (figures 52 et 53). Ces résultats suggèrent que le gène *ilk* dans les branchies est plus sensible à des faibles concentrations de BaP dans l'eau de mer par rapport à la glande digestive.

Chez les mollusques la maturation des gonades est un processus qui nécessite de l'énergie et qui est caractérisé par l'accumulation d'une grande quantité de vitellus dans les ovaires durant leur maturation. Le vitellus est une lipoglycocaroténo-protéine, considéré comme la principale protéine formant le jaune d'œuf dans l'ovocyte. La vitellogénine (VTG) est le précurseur du vitellus et elle est synthétisée par l'ovaire et/ou des tissus extra-ovariens (Hayward et al., 2010). La VTG est présente chez toutes les espèces animales ovipares des nématodes jusqu'à les vertébrés (Chen et al., 1997). La protéine VTG a été isolée à partir l'huître *C. gigas* (Suzuki et al., 1992) et la séquence de l'ADNc de la *vtg* a été déterminée chez cette espèce (Matsumoto et al., 2003). Les résultats ont montré que le niveau d'expression du gène *vtg* est plus élevé dans la glande digestive que dans les branchies montrant ainsi que les quantités de VTG synthétisée dans la glande digestive sont plus élevées que celles synthétisées dans les branchies (figures 52 et 53). Barre et al. (1991) et Bride et al. (1992) ont démontré que la VTG de *Helix aspersa* est synthétisée dans la glande digestive, suggérant que la vitellogenèse se produit à travers un processus d'hétérosynthèse, dans lequel les précurseurs extra-ovariens sont incorporés dans les ovocytes par une endocytose à partir de l'hémolymphe. Une surexpression du gène *vtg* a été observée chez *C. gigas* exposée à des concentrations subaiguës et aiguës de BaP. Tian et al. (2013) ont montré une surexpression du gène *vtg* chez *C. farreri* exposée à 0,025 µg BaP/L et une sous-expression du gène chez la même espèce exposée à 10 µg BaP/L. Une induction du gène *vtg* a été enregistrée chez le poisson zèbre *D. rerio* après exposition à 3,35 µg BaP/L (Hoffmann et al, 2006). Il a été rapporté que le niveau de l'ARNm et de la protéine de la vitellogénine augmente après exposition à des œstrogènes environnementaux (Zhang et al., 2005). L'augmentation de l'expression du gène *vtg* dans cette étude indique que le BaP et/ou ses métabolites ont un effet œstrogénique *in vivo*. Ces résultats montrent que la perturbation de l'expression du gène *vtg*, qui est critique pour la reproduction, peut représenter l'un des mécanismes de toxicité des HAPs pour la reproduction. Cette étude montre l'intérêt de la réponse transcriptionelle des gènes *ilk* et *vtg* comme des biomarqueurs précoces et sensibles dans la biosurveillance des milieux marins contaminés par les HAPs.

CHAPITRE IV:
DISCUSSION GENERALE

La lagune de Tunis est l'un des écosystèmes marins importants de la Tunisie, présentant une richesse écologique prépondérante. Malgré sa valeur écologique et halieutique, la lagune est soumise à une pression anthropique élevée due à la présence de différentes sources de contamination urbaines et industrielles sur ses bords, en plus des ports installés et du trafic maritime dans cette lagune. De ce fait, la lagune a toujours constitué l'exutoire naturel des eaux usées urbaines et industrielles ainsi que les eaux pluviales de la ville de Tunis. Cette situation, combinée à un faible taux de renouvellement des eaux du lac, a conduit à la dégradation progressive et continue de la qualité des eaux de ce milieu à tel point que son état a atteint des degrés d'eutrophisation extrêmes. Ces conditions ont provoqué un déséquilibre dans le fonctionnement écologique de l'écosystème conduisant à une mortalité massive de poissons (Rezgui, 2005 *dans* Rezgui et al., 2008). Le besoin pressant d'une intervention rapide face à l'état critique atteint par la lagune a conduit au lancement des programmes d'aménagement qui ont été réalisés entre 1985 et 1988 pour la partie nord de la lagune et entre 1998 et 2001 pour la partie sud de la lagune, dans le but d'améliorer, de contrôler et de gérer la qualité de l'eau dans cet écosystème (Jouini et al., 2005 ; Rezgui et al., 2008). La mise en place d'un programme de surveillance des contaminants chimiques (HAPs et métaux traces) et de leurs effets biologiques sur la palourde commune *Ruditapes decussatus* dans la lagune de Tunis après des années de son assainissement représente l'enjeu majeur de la réalisation de cette thèse. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'état de contamination de la lagune de Tunis et de déterminer son impact sur la palourde commune en utilisant des biomarqueurs localisés à différents niveaux de l'organisation cellulaire, du moléculaire au tissulaire, en prenant en considération l'interaction entre les paramètres chimiques et biologiques analysés et les facteurs physico-chimiques dans le milieu lagunaire. Les résultats de cette étude sur terrain nous ont mené à réaliser des expériences au laboratoire afin de caractériser et d'essayer de mieux comprendre les effets biochimiques et moléculaires des HAPs, en utilisant le benzo(a)pyrène comme modèle chimique, chez les bivalves.

L'approche *in situ* menée pendant douze mois a pour but d'intégrer l'influence combinée des contaminants chimiques et des paramètres physico-chimiques sur les biomarqueurs chez la palourde *R .decussatus*. Les différents sites étudiés ont été choisis stratégiquement par rapport à leur position dans la lagune et leur proximité de sources potentielles de contamination. L'étude des paramètres physico-chimiques de l'eau de mer consiste à l'analyse de la température, la salinité et le pH. L'évolution de ces paramètres physico-chimiques s'avère être dépendante des conditions météorologiques avec un impact

marqué des saisons (tableau X). En fait, la température de l'eau varie mensuellement et atteint des valeurs élevées en été et en automne correspondant aux saisons les plus chauds de l'année, alors que les valeurs de température minimales ont été observées durant la saison la plus froide qui est l'hiver. La température de l'eau est directement liée à la température de l'air, à l'ensoleillement et aux vents. L'évolution de la salinité est similaire à celle de la température avec des valeurs élevées en été et en automne et des valeurs minimales en hiver. Cette évolution semble être liée à l'évaporation, aux précipitations, aux apports d'eau douce et aux échanges avec la mer. La variation du pH est moins marquée par rapport aux autres paramètres avec des valeurs minimales en septembre et des valeurs maximales en février. Il a été rapporté que le pH est lié à la croissance des macroalgues. En période de croissance végétale, il y dégagement du dioxyde de carbone qui a tendance à augmenter le pH, alors qu'en période de mortalité algale, la décomposition bactériologique des algues induit un milieu acide à pH relativement bas (Jouini et al., 2005).

L'évaluation de la contamination des sédiments marins par les HAPs et les métaux traces a montré des concentrations plus élevées dans la lagune de Tunis par rapport au site de référence (Louza) due à la présence de différentes sources de pollution telles que les effluents domestiques, les rejets industriels, les activités portuaires et le trafic maritime (tableaux XII et XVI). De même, nous avons enregistré des concentrations de HAPs et de métaux plus élevées dans les tissus des palourdes collectées dans la lagune de Tunis par rapport aux témoins (tableaux XIV et XVII).

Nos résultats concernant les hydrocarbures ont montré une variation spatiale des concentrations sédimentaires des HAPs entre les six sites de la lagune de Tunis (tableaux XII). D'après ces résultats, le site S4 représente le site le plus contaminé par les HAPs alors que les sites S1, S3 et S6 présentent les niveaux de contamination organique les plus faibles. La fluctuation saisonnière des concentrations des HAPs dans les sédiments semble être due à la variation des charges de HAPs atteignant le milieu lagunaire prouvant ainsi la dominance de l'impact anthropique. Les palourdes collectées dans le site Z1 (correspond au site S2 pour les sédiments) présentent les teneurs en HAPs les plus élevée (tableau XIV). L'absence de relations entre les concentrations des HAPs dans les sédiments et dans les tissus des palourdes suggère l'absence d'une contribution directe des sédiments dans la contamination des palourdes. La fluctuation saisonnière des teneurs tissulaires en HAPs observée dans la lagune de Tunis peut être liée aux facteurs physico-chimiques dans le milieu. Il a été rapporté que la température et la salinité influencent la solubilité des HAPs (Neff, 1979 ; Tremblay et al.,

2005). Ainsi l'augmentation des concentrations des HAPs chez les palourdes en hiver semble être due à une baisse de la salinité de l'eau de mer qui cause une augmentation de la solubilité des HAPs en les rendant ainsi plus biodisponibles pour les organismes marins (Tremblay et al., 2005). Les apports en HAPs dans le milieu marin peuvent être d'origine pétrogénique (déversement de pétrole et de ses dérivés) ou pyrolytique liée à la combustion. Dans notre étude, la présence du naphtalène et les fortes concentrations de chrysène impliquent une origine pétrogénique des HAPs présents dans la lagune de Tunis. Parallèlement, la prédominance des HAPs de haut poids moléculaire (4-6 cycles) par rapport aux HAPs de bas poids moléculaire (2-3 cycles) dans tous les échantillons de sédiments et de palourdes indique une source pyrolytique des HAPs (tableaux XII et XIV). Par conséquent, les HAPs présents dans la lagune de Tunis ont une origine mixte à la fois pétrogénique et pyrolytique. Les rapports de diagnostique employés dans cette étude suggèrent la prédominance de la source pyrolytique des HAPs par rapport à la source pétrogénique (tableaux XIII et XV). En plus, ces rapports suggèrent que les HAPs ayant une origine pyrolytique proviennent de la combustion des fiouls (essence, kérosène, diesel) et de pétrole brut.

L'analyse des métaux a montré une variation spatiale des teneurs sédimentaires (tableau XVI). Le site S4 est considéré comme le plus contaminé par les éléments métalliques Cd, Cu, Pb, Zn et V ; alors que le site S2 est le plus contaminé par les éléments As et Hg. L'analyse temporelle des métaux dans les sédiments a montré une légère fluctuation des teneurs mais sans pouvoir déceler une évolution saisonnière claire ce qui indique une dominance de l'impact anthropique. Les palourdes collectées dans les trois sites de la lagune présentent des concentrations en métaux plus élevées que celles des témoins dues à la contamination de la lagune par ces polluants (tableau XVII). Les palourdes accumulent les métaux essentiels (Zn, Mn, Ni et Cu), indispensables pour les activités métaboliques de l'organisme, à des teneurs plus élevées que les métaux non essentiels (Ag, Cd, Hg et Pb) et qui sont toxiques à des faibles teneurs. Contrairement aux sédiments, les concentrations des métaux dans les tissus des palourdes ne montrent pas une évolution spatiale claire malgré qu'il y a des variations entre les sites, alors qu'elles présentent une évolution saisonnière bien déterminée avec une augmentation des teneurs en hiver et une diminution en été. Cette évolution semble être influencée par la variation des paramètres physico-chimiques de l'eau, essentiellement la température et la salinité, et les facteurs biologiques de l'animal (la reproduction) (Maanan, 2008). La majorité des métaux analysés (Cd, Cu, Mn, Ni, Pb, V, Zn et Hg) présentent des concentrations plus élevées au niveau des sédiments marins qu'au niveau

des tissus des palourdes, ce qui indique qu'une grande partie des métaux associés aux sédiments n'est pas biodisponible pour les palourdes. Chez les bivalves, l'efficacité de l'assimilation des métaux ingérés et qui sont liés aux particules sédimentaires est dépendante de : type des sédiments, l'espèce et la physiologie de l'organisme et le métal lui-même. Cependant, il a été rapporté que les métaux incorporés dans les grains de sédiments ne sont pas assimilés et donc ne sont pas biodisponibles pour les organismes benthiques (Griscom et al. 2002).

L'étude des corrélations entre les concentrations des HAPs et des métaux dans les sédiments et leur accumulation dans les tissus des palourdes a montré l'absence de corrélations, sauf pour le Cu. Ces résultats suggèrent l'absence d'une contribution directe des sédiments dans la contamination des palourdes par les HAPs et les métaux.

Tout au long de ce travail, que ce soit pour l'approche *in situ* ou l'approche expérimentale, l'analyse des biomarqueurs chez les bivalves a été réalisée au niveau de deux organes qui sont les branchies et la glande digestive. Ce choix de ces deux tissus revient à leurs rôles importants dans l'absorption et l'accumulation des contaminants. En effet, les branchies représentent l'organe clé dans l'absorption des xénobiotiques présents dans l'eau de mer pendant le processus de filtration et il accumule temporairement des concentrations élevée des contaminants avant de les transférer à la glande digestive et à d'autres tissus (Bustamante et al., 2012). Concernant la glande digestive, elle représente le site majeur de bioaccumulation des polluants hydrophiles (exemple: métaux) et hydrophobes (Porte et al., 2001).

Les marqueurs biochimiques ont été largement utilisés dans l'évaluation des risques environnementaux d'une contamination chimique dans les milieux marins (Matozzo et al., 2010 ; Kamel et al., 2014). Dans notre étude *in situ*, nous avons observé une augmentation des activités enzymatiques de biotransformation des phases I et II (BPH et GST) au niveau des glandes digestives des palourdes collectées dans la lagune de Tunis (figure 33), ce qui indique une forte activité de détoxication chez ces bivalves liée à une exposition dans le milieu aux contaminants organiques tels que les HAPs (Bebianno et Barreira, 2009). Les palourdes de la lagune présentaient aussi une augmentation des niveaux des biomarqueurs de stress oxydant (CAT et peroxydation lipidique) prouvant ainsi l'existence d'un état de stress oxydant dû à la génération des ERO par les contaminants métalliques et organiques accumulés par les palourdes (figure 34). Des résultats similaires ont été observés au niveau des branchies des

palourdes collectées dans la lagune de Tunis avec une augmentation des biomarqueurs de stress oxydant (GST, CAT et peroxydation lipidique) (figures 30 et 31). De plus, la contamination des palourdes par les HAPs et les métaux génère une neurotoxicité au niveau des branchies représentée par une inhibition de l'activité AChE (figure 32). L'observation des marqueurs biochimiques des palourdes pendant une année a montré une forte fluctuation temporelle (figures 33 et 34). La variation des biomarqueurs semble être liée aux paramètres abiotiques de l'eau, essentiellement la température, et aux processus physiologiques responsables de la reproduction chez *R. decussatus*. Cette fluctuation temporelle montre la présence de plusieurs pontes chez la palourde *R. decussatus* entre juin et décembre, avec deux pontes principales. La première ponte se manifeste en début d'été (juin) alors que la deuxième ponte, qui semble être légèrement moins efficace, se déroule pendant la période allant de la fin d'automne au début d'hiver (octobre-décembre). Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude réalisée sur la reproduction de la palourde *R. decussatus* en Tunisie (Hamida, 2014).

Récemment, les approches moléculaires commence à être appliquées dans les études écotoxicologiques pour évaluer l'impact d'une contamination environnementale sur les organismes aquatiques et afin de mieux comprendre les événements cellulaires précoces associés à des réponses sensibles et protectives se produisant lors d'une exposition aux contaminants (Arini et al., 2014b ; Banni et al., 2014 ; Dedeh et al., 2014a et b ; Negri et al, 2013). L'étude de l'expression génétique chez la palourde *R. decussatus* de la lagune de Tunis par la technique de RT-PCR quantitative en temps réel a montré une surexpression des gènes *sod*, *hsp70* et *mt* codants pour des produits respectivement impliqués dans l'élimination du stress oxydant, la réparation et la protection des protéines et la détoxication des métaux (tableaux XVIII et XIX). Ces résultats montrent que la réponse biologique à une contamination chimique commence au niveau moléculaire par une régulation du niveau de la transcription des gènes impliqués dans la défense et qui se traduit normalement par un renforcement du système protéique (enzymatique ou non enzymatique) de défense. Ces résultats sont en accord avec ceux issus de la partie expérimentale qui ont montré une surexpression des gènes impliqués dans les processus de détoxication chez la palourde *R. philippinarum* et *C. gigas* exposées à des concentrations environnementales de BaP. Les palourdes collectées dans la lagune de Tunis ont montré aussi une surexpression du gène *cox1* suggérant une induction du métabolisme mitochondrial et une surexpression du gène *ARNr 16S* indiquant une augmentation du nombre des mitochondries (tableaux XVIII et XIX). Ces

résultats reflètent une demande énergétique plus élevée dans les cellules des branchies et de la glande digestive probablement due aux mécanismes de détoxication (Achard et al., 2006). Les mitochondries représentent des cibles intracellulaires clés pour certains xénobiotiques tel que le cadmium en raison de leur capacité à accumuler ces contaminants et à cause de la sensibilité des enzymes mitochondriales aux altérations induites par ces contaminants (Pulido et Parrish, 2003; Valko et al., 2005; Cannino et al., 2009; Liu et al., 2009). L'exposition des palourdes et des huitres, au laboratoire, à des concentrations environnementales de BaP montre des résultats similaires avec une induction de l'expression des gènes *cox1* et *cytb* impliqués dans la respiration mitochondriale ce qui confirme que la cellule a besoin de l'énergie générée par les mitochondries sous forme d'ATP pour pouvoir se protéger et éliminer les contaminants (figures 40, 41, 43, 46, 49, 50, 52 et 53). Ainsi, l'outil génomique présente une sensibilité très importante (Nikinmaa et Rytkönen, 2012) et les niveaux d'ARNm peuvent être modulés par différents contaminants (Banni et al., 2007 ; Al Kaddissi et al., 2014 ; Chen et al., 2014).

Les réponses, lors d'une contamination, à des niveaux inférieurs de l'organisation biologique (réponses moléculaires et biochimiques) sont plus spécifiques, sensibles et reproductibles et facile à déterminer, mais plus difficiles à les relier aux changements écologiques. D'un autre côté, les réponses à des niveaux supérieurs de l'organisation biologique (réponses populationnelles et communautaires) sont directement indicatives sur l'état de santé de l'écosystème et par conséquent beaucoup plus pertinentes à la gestion environnementale (Au, 2004). Cependant, ces réponses sont plus difficiles à déterminer, moins spécifiques et ne se manifestent qu'à des stades tardifs lorsque les dommages environnementales ont déjà eu lieu (Connell et al., 1999). Dans ce cadre, les réponses histopathologiques sont relativement faciles à déterminer et elles peuvent êtres reliées à la santé des individus, qui à son tour permet une extrapolation aux effets au niveau de la population/communauté (Au, 2004). L'étude de la réponse histopathologique chez la palourde *R. decussatus* collectée dans la lagune de Tunis nous a permis d'observer des altérations structurales au niveau des branchies et de la glande digestive liées à l'exposition *in situ* à un mélange de contaminants. L'étude histologique des branchies a montré que les altérations structurales se manifestaient au niveau des lamelles branchiales qui représentent l'unité fonctionnelle de l'organe (figure 35). Ces altérations peuvent ainsi provoquer un dysfonctionnement des branchies et aboutir par la suite à la réduction de la consommation d'oxygène et à la perturbation de la fonction d'osmorégulation chez les bivalves (Nicholson,

2003 ; Au, 2004). Ces altérations histopathologiques consistaient principalement en des réactions inflammatoires (infiltration hémocytaire, malformation des lamelles et fusion des lamelles) avec l'apparition de certaines altérations sévères (altérations des lamelles et formation de fibrome) chez quelques individus. L'étude histologique des glandes digestives des palourdes de la lagune de Tunis a montré des altérations structurales au niveau des unités fonctionnelles de l'organe qui sont les tubules digestifs (figure 36). La gravité des altérations histopathologiques des tubules variaient entre des altérations légères (dilatation de la lumière tubulaire) et des altérations sévères (nécroses tubulaires et fibroses). Les branchies et la glande digestive chez les bivalves jouent un rôle important dans la collection, l'absorption et la digestion de la nourriture. Par conséquent, l'exposition des bivalves à des concentrations chroniques des contaminants présents dans l'eau et les sédiments peut finalement altérer leur capacité d'absorber la nourriture et compromettre ainsi leur croissance et leur reproduction (Au, 2004).

Les résultats concernant les différents biomarqueurs (biochimiques, moléculaires et histopathologiques) montrent une variation spatiale de la réponse biologique chez les palourdes collectées dans la lagune. Les palourdes du site Z2 présentent les niveaux de perturbations biologiques les plus élevées au niveau des branchies, alors que les palourdes du site Z1 présentent les glandes digestives les plus affectées par la contamination chimique. Ceci peut être expliqué par une différence dans le mode de contamination entre les palourdes des deux sites, ainsi les palourdes du site Z2 peuvent être contaminées principalement à travers l'eau de mer alors que la contamination des palourdes du site Z1 se fait essentiellement par voie trophique. Ces résultats sont conformes à ceux issues de l'approche expérimentale qui ont montré que l'impact d'une contamination de la palourde *R. philippinarum* par le BaP associé aux microalgues est plus important au niveau de la glande digestive alors que l'exposition de la même espèce au BaP via l'eau de mer affecte plus les branchies. L'analyse en composantes principales des données recueillies pendant la saison printanière a montré que les trois sites de la lagune de Tunis sont nettement pollués par rapport au site de référence. Cette analyse factorielle a montré aussi que le site Z2 est le plus affecté par la pollution anthropique (figures 37 et 38).

La deuxième partie de ce travail a été consacrée à l'élaboration des expériences de contamination au laboratoire menée sur la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le but de caractériser les effets biochimiques, génotoxiques et génétiques d'un modèle de HAP, le benzo(a)pyrène, chez ces espèces. Pour

ce faire, cinq expériences ont été réalisées en variant certains facteurs concernant la concentration du contaminant, le mode d'exposition, la durée d'exposition et le modèle biologique utilisé, mais tout en gardant les mêmes conditions abiotiques (photopériode, température,…). Deux gammes de concentrations de BaP ont été utilisées dans l'étude expérimentale : les concentrations aiguës et subaiguës. Les concentrations aiguës ont été choisies afin de caractériser, *in vivo*, les effets d'une contamination marine par les HAPs survenant après un accident (exemple : les accidents des pétroliers). Les concentrations subaiguës ont été utilisées dans le but de déterminer les effets d'une contamination chronique par les HAPs, ainsi nous avons utilisés des concentrations de BaP comparables à celles qui se trouvent dans l'eau de mer de la lagune de Tunis.

A l'issue de cette approche expérimentale menée sur des palourdes et des huîtres provenant du Bassin d'Arcachon en conditions contrôlées nous avons observé la variation de quatre biomarqueurs biochimiques (GST, CAT, AChE et MDA) (figures 39, 42, 45, 48 et 51). L'activité GST est un biomarqueur de métabolisation de phase II (Ono et al., 2005), il est considéré aussi comme un biomarqueur de défense contre les dommages oxydants et les produits de la peroxydation lipidique (George, 1994). L'exposition des palourdes à des concentrations environnementales de BaP montre une augmentation de l'activité GST indiquant une induction du système de défense (figure 42). Cependant, l'exposition des palourdes à des concentrations aiguës de BaP montre l'incapacité de l'enzyme à gérer ce type de contamination, essentiellement au niveau de la glande digestive (figure 45). L'analyse de l'activité GST chez les palourdes et les huîtres montre une similarité de la réponse entre les branchies et la glande digestive dans le cas d'une contamination chronique, alors qu'une différence dans la réponse a été observée entre les deux organes dans le cas d'une contamination aiguë indiquant que l'activité GST au niveau des branchies est plus efficace dans l'élimination du stress (figures 42, 45 et 51). Cette différence dans la réponse de l'activité GST entre les deux organes peut être due à une différence dans la fonction de l'enzyme, qui joue le rôle d'une enzyme de métabolisation dans la glande digestive et d'une peroxydase dans les branchies. Cette différence dans la réponse peut être due aussi au fait que la glande digestive représente le site principal d'accumulation des HAPs contrairement aux branchies qui accumulent temporairement les xénobiotiques. L'analyse de l'activité GST chez *R. philippinarum* exposée à 10 µg BaP/L (la concentration la plus élevée dans la lagune de Tunis) montre que la réponse de défense est plus précoce au niveau des branchies qu'au niveau de la glande digestive (figure 48). Les résultats de l'activité CAT et de la peroxydation

lipidique montrent une induction du stress oxydant chez les palourdes et les huîtres suite à leur exposition à des concentrations aiguës et subaiguës de BaP confirmant le rôle des HAPs dans la génération des radicaux libre et l'établissement d'un stress oxydant chez les bivalves. L'exposition des bivalves à des concentrations aiguës de BaP montre une augmentation de l'activité CAT chez les huîtres indiquant la résistance de ces organismes à une contamination aiguë contre une incapacité des palourdes à se défendre face à ce type de contamination indiquée par l'absence d'une augmentation de l'activité CAT chez les individus contaminés (figures 45 et 51). L'analyse du taux d'accumulation de MDA montre que le niveau de la peroxydation des lipides est dépendant de la concentration de BaP (figures 42, 45 et 51). Nous avons observé aussi que le niveau de la peroxydation lipidique varie entre les organes selon le mode de contamination (figures 39 et 42). En effet, une contamination des palourdes par voie trophique affecte plus la glande digestive alors que la contamination par voie directe (eau de mer) affecte plus les branchies. Dans le cas d'une exposition au BaP à travers l'eau de mer, l'induction de la peroxydation lipidique est plus précoce au niveau des branchies (après 1 jour) par rapport à la glande digestive (après 3 jours) (figure 48). Les résultats montrent que le BaP a un effet neurotoxique chez les bivalves caractérisé par une inhibition de l'activité AChE. L'ampleur de cet effet neurotoxique semble être dépendante de la concentration du BaP (figures 42, 45 et 51). De plus, l'apparition de la neurotoxicité du BaP est précoce (après 1 jour) chez les palourdes (figure 48). Du point de vue de neurotoxicité, les huîtres semblent être moins sensibles au BaP que les palourdes. En effet, l'inhibition de l'activité AChE chez les huîtres n'a été enregistrée qu'après une exposition à une concentration de 20 µg BaP/L, alors que chez les palourdes une inhibition de l'activité AChE a été notée après une exposition à des concentrations de 2 et 5 µg BaP/L (figures 42 et 51).

L'étude de la génotoxicité du BaP chez la palourde japonaise et l'huître creuse par la technique RAPD-qPCR montre des altérations génomiques après une exposition à des concentrations aiguës et subaiguës de BaP. En effet, l'analyse quantitative de la technique complétée par l'analyse qualitative nous ont permis de détecter des modifications dans la composition de l'ADN génomique chez les bivalves contaminés (tableaux XXIII, XXIV, XXV, XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX, XXX, XXXI, XXXII, XXXIII, XXXIV, XXXV, XXXVI et XXXVII). Ces altérations sont dues au pouvoir mutagène du BaP (IARC, 1987). La métabolisation du BaP par les enzymes de phase I chez les bivalves provoque son activation et sa biotransformation en métabolites réactifs (époxydes, quinones et phénols) qui se lient de manière covalente aux macromolécules cellulaires dont l'ADN génomique

(Martinez and Livingstone, 1995 ; Michel et al., 1995). La métabolisation du BaP par les enzymes de phase I peut générer les ERO provoquant ainsi un stress oxydant chez l'organisme qui peut aboutir à l'altération de l'ADN. La réaction entre les métabolites du BaP ou les radicaux libres et la molécule d'ADN peut entrainer différents dommages génomiques tels que la formation d'adduits à l'ADN, les cassures de brins de l'ADN, l'oxydation des bases de l'ADN, les mutations ponctuelles et les réarrangements génomiques (Marnett, 2000 ; Atienzar et al., 2002b). Nos résultats montrent que les enzymes de défense (GST et CAT), malgré leur induction, sont inefficaces dans la protection de la cellule des dommages de l'ADN même pour des concentrations environnementales de BaP, ceci est probablement dû à la forte toxicité du contaminant. De plus, nos résultats ont montré la forte sensibilité de la technique RAPD-qPCR dans la révélation des altérations de l'ADN, puisque en utilisant cette méthode nous avons pu détecter des dommages à l'ADN même chez les bivalves exposés à des concentrations environnementales de BaP (tableaux XXVI, XXVII, XXVIII, XXXII, XXXIII, XXXIV, XXXV, XXXVI et XXXVII). La grande sensibilité de cette technique réside dans sa capacité à révéler les mutations ponctuelles et les réarrangements génomiques en plus des autres altérations qui sont plus apparentes, ce qui n'est pas le cas pour les autres techniques d'analyse de génotoxicité tels que le test des micronoyaux et le test de comète qui ne révèlent que les altérations clastogènes et le dosage de la 8-oxo-7,8-dihydro-20-deoxyguanosine (8-oxodG) qui est destiné à quantifier l'oxydation de la base guanine de l'ADN (Orieux et al., 2011 ; Cambier et al., 2012 ; Šrut et al., 2012). Par conséquent, la RAPD-qPCR peut être considéré comme une technique d'un grand intérêt pour les études *in situ* concernant les risques environnementaux due à sa forte sensibilité même dans le cas d'une pollution chronique par les xénobiotiques.

La réponse transcriptionelle au BaP chez la palourde *R. philippinarum* et l'huître *C. gigas* a été étudiée à traves l'analyse de l'expression relative de plusieurs gènes dont les produits sont impliqués dans différents processus cellulaires tels que la biotransformation et la détoxication des contaminants, l'élimination du stress oxydant, la respiration mitochondriale, la réaction immunitaire (huître) et la reproduction (huître). Les résultats montrent une surexpression des gènes *cyp4*, *cyp1a1*, *gst*, *ahr* et *mdr* responsables du processus de détoxication chez les bivalves exposés à des concentrations subaiguës de BaP impliquant une induction des mécanismes de biotransformation et d'élimination du contaminant (figures 43, 44, 49, 50, 52 et 53). Ces résultats sont en accord avec ceux qui ont été trouvés suite à l'analyse des biomarqueurs chez la palourde *R. decussatus* collectée dans la lagune de Tunis,

site contaminé par les HAPs (dont le BaP) et les métaux traces et qui ont montré une augmentation du processus de détoxication via l'augmentation des activités benzo(a)pyrène hydroxylase (BPH) et GST (figures 30 et 33). L'induction de l'expression du gène *cyp4* chez la palourde japonaise exposée au BaP semble être liée à la surexpression du gène *ahr*, ce qui indique que ce dernier est impliqué dans la régulation du gène *cyp4* (Tian et al., 2013). Nous avons constaté que l'ampleur de la réponse transcriptionnelle de détoxication chez les palourdes contaminées diffère entre les branchies et la glande digestive selon le type de contamination car cette réponse était plus marquée au niveau de la glande digestive des palourdes contaminées par voie trophique alors qu'elle était plus importante au niveau des branchies des palourdes contaminées à travers l'eau de mer dans la deuxième expérience (figures 40, 41, 43 et 44).

Le mécanisme de biotransformation chez les organismes marins peut entrainer la bio-activation des polluants chimiques causant ainsi la génération des ERO et l'induction par la suite du stress oxydant (Regoli et Giuliani, 2013 ; Lacroix et al., 2014). Une surexpression des gènes *cat*, *sod* et *gpx* a été observée chez les palourdes et les huîtres exposées à des concentrations subaiguës de BaP, suggérant un niveau plus élevé des ERO chez ces individus probablement causé par la métabolisation du BaP par les enzymes de phase I (figures 43, 44, 52 et 53). Ces résultats sont en accord avec l'augmentation du taux d'accumulation de MDA et de l'activité CAT chez les individus contaminés (figures 42 et 51). L'étude, *in situ*, des biomarqueurs de stress oxydant montrent des résultats similaires aux résultats de l'approche expérimentale (contaminations chroniques) avec une augmentation de l'activité CAT et du niveau de la peroxydation lipidique chez la palourde *R. decussatus* contaminée par les HAPs (figures 31 et 34). L'accumulation du BaP chez les palourdes, par voie trophique ou par voie directe, entraine un stress oxydant au niveau des deux organes (branchies et glande digestive), ce qui indique que ces tissus sont les principaux sites responsables de l'accumulation des xénobiotiques chez les bivalves quelque soit le mode de contamination, d'où leurs intérêt dans les études écotoxicologiques (Porte et al., 2001 ; Bustamante et al., 2012).

L'étude de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial chez les palourdes et les huîtres contaminées par des concentrations subaiguës de BaP montre une induction de la transcription des gènes *cox1* et *cytb* (figures 43, 49, 50, 52 et 53). Les produits de ces deux gènes sont impliqués dans la synthèse de l'ATP pendant la respiration mitochondriale (Malatesta et al., 1995), ainsi la surexpression de ces gènes représente un mécanisme « adaptatif » ou d'acclimatation qui a pour fonction de fournir de l'énergie pour la

cellule afin de maintenir les mécanismes de défense. Dans certains cas nous avons pu observer une augmentation de l'expression du gène *ARNr 16S* qui indique une augmentation du nombre des mitochondries, ce qui est en accord avec la réponse d'acclimatation (figures 40, 49, 50 et 53).

L'étude de l'expression génétique chez *R. philippinarum* et les *C. gigas* exposées à des concentrations aiguës de BaP montre une réponse transcriptionelle différente entre les deux espèces. En effet, l'exposition des palourdes à des concentrations aiguës de BaP (400, 700, 1000 et 1300 µg/L) entraine une perturbation de l'expression génétique caractérisée par une inhibition de l'expression de certains gènes et la non induction de l'expression des autres gènes (pas de différences par rapport au témoin) (figures 46 et 47). Ces résultats indiquent que la capacité de défense des palourdes a été dépassée et que leur état de santé général a été altéré par les fortes concentrations de BaP. Par contre, l'exposition des huîtres à des concentrations aiguës de BaP (100, 400 et 1000 µg/L) montre une induction de l'expression des gènes étudiés, suggérant la présence d'une capacité de résistance face à une contamination aiguë plus importante chez *C. gigas* par rapport à *R. philippinarum* (figures 52 et 53). Nos résultats montrent aussi que l'expression des gènes de défense est associée à l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme mitochondriale (*cytb* et *cox1*), ceci suggère que la respiration mitochondriale représente un processus clé qui permet à la cellule de se défendre (métabolisation et élimination des contaminants et élimination des radicaux libres) face à une contamination chimique et ainsi à s'acclimater et à résister à la pollution. Par conséquent, le niveau d'expression des gènes *cytb* et *cox1* représente un nouvel outil pour l'évaluation de la pollution des milieux marins par les HAPs. L'exposition des huîtres au BaP entraine aussi l'induction du gène *vtg*, codant pour le la protéine précurseur du vitellus (figures 52 et 53), ce qui indique que le BaP et/ou ses métabolites ont une activité oestrogénique *in vivo* (Hoffmann et Oris, 2006). De même, une surexpression du gène *ilk*, codant pour des protéines pro-inflammatoires impliquées dans la réponse immunitaire, a été observée chez les huîtres contaminées (figures 52 et 53). Cette augmentation du gène *ilk* suggère que le BaP a une activité stimulatrice sur la réponse immunitaire. Les niveaux d'expression des gènes *vtg* et *ilk* peuvent nous informer respectivement de l'effet des HAPs sur la reproduction et sur le système immunitaire chez les bivalves, ainsi ils représentent des outils biologiques intéressant pour les études des risques environnementaux dans les milieux marins. Les résultats concernant l'expression des gènes chez les palourdes exposées au BaP pendant différentes durées de temps ont montré une surexpression précoce de certains gènes tels que *cyp4*, *gst*,

ahr, *cox1*, *cat* et *sod* au niveau des branchies et ahr et cox1 au niveau de la glande digestive après 1 jour de contamination (figures 49 et 50). Les niveaux d'expression des gènes chez les palourdes contaminées varient en fonction du temps d'exposition au BaP avec un retour généralement au niveau de base (celui du témoin) après 7 ou 14 jours en considérant les branchies (figures 49). Ainsi, les palourdes semblent présenter les signes d'une réponse d'acclimatation en lien avec la concentration environnementale du BaP (10 µg/L) qui représente la concentration la plus élevée qui a été enregistré dans l'eau de mer de la lagune de Tunis. Des réponses d'acclimatation similaires ont été observées chez l'huître *C. gigas* exposée, au laboratoire, à des concentrations environnementales de HAPs et de pesticides (Bijoux, 2014).

Les résultats biochimiques, génétiques et de génotoxicité issus de notre étude *in vivo* sont représentés dans les tableaux récapitulatifs XXXVIII (branchies) et XXXIX (glande digestive).

Tableau XXXVIII : Récapitulatif des résultats obtenus à partir des branchies des bivalves utilisés dans nos expérimentations *in vivo*.

		Réponse biochimique				**Expression génétique relative**												**Génotoxicité (quantitative)**	
		GST	**CAT**	**MDA**	**AChE**	***cyp4***	***gst***	***ahr***	***mdr***	***ARNr 16S***	***cyt b***	***cox1***	***cat***	***sod***	***gpx***	***cyp1a 1***	***vtg***	***ilk***	**OPB7**	**OPB11**
Expérience 1 (palourde-voie trophique)	400	-	-	↗	-	↗	=	=	=	↗	=	=	↗	=	=	-	-	-	=	=
	1000	-	-	=	-	↗	=	=	↗	↗	=	↗	↗	=	=	-	-	-	↘	=
Expérience 2 (palourde)	2	↗	↗	↗	↘	↗	↗	↗	=	=	=	↗	↗	↗	↗	-	-	-	=	↘
	5	=	↗	↗	↘	=	=	=	↗	=	↗	↗	↗	↗	↗	-	-	-	=	↘
Expérience 3 (palourde)	400	↗	=	↗	↘	↗	↗	↗	↗	↘	↗	↗	=	↘	↗	-	-	-	↘	=
	700	=	=	↗	↘	↘	=	↗	↗	↘	↘	↘	=	↘	↗	-	-	-	↘	↘
	1000	=	=	↗	↘	↘	=	↗	=	↘	↘	↘	↘	↘	↗	-	-	-	↘	=
	1300	↗	=	↗	↘	↘	↘	↘	=	↘	↘	↘	=	↘	↘	-	-	-	↘	↘
Expérience 4 (palourde)	1j	↗	↗	↗	↘	↗	↗	↗	=	=	=	↗	↗	↗	=	-	-	-	=	=
	3j	=	↗	=	↘	↗	=	↗	=	↘	=	↗	↗	=	=	-	-	-	=	=
	7j	=	=	↗	=	=	=	=	↘	=	↘	=	=	↘	=	-	-	-	=	=
	14j	↗	↗	↗	=	=	=	=	=	↗	=	=	=	=	=	-	-	-	↗	=
Expérience 5 (huître)	5	↗	=	↗	=	-	↗	-	↗	=	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
	20	↗	↗	↗	↘	-	↗	-	↗	=	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↘	=
	100	↗	↗	↗	↘	-	↗	-	↗	↘	↗	=	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↘	=
	400	↗	↗	↗	↘	-	↗	-	↗	↘	↗	=	=	↗	↗	↗	↗	↗	↘	↘
	1000	↗	↗	↗	↘	-	↗	-	↗	↘	↗	↗	↗	↗	=	↗	↗	↗	↘	↘

- : non déterminé ; = : pas de différence significative par rapport au témoin ; flèche en vert : augmentation ; flèche en rouge : diminution.

Tableau XXXIX : Récapitulatif des résultats obtenus à partir de la glande digestive des bivalves utilisés dans nos expérimentations *in vivo*.

		Réponse biochimique				**Expression génétique relative**												**Génotoxicité (quantitative)**	
		GST	**CAT**	**MDA**	**AChE**	***cyp4***	***gst***	***ahr***	***mdr***	***ARNr 16S***	***cyt b***	***cox1***	***cat***	***sod***	***gpx***	***cyp1a 1***	***vtg***	***ilk***	**OPB7**	**OPB11**
Expérience 1 (palourde-voie trophique)	400	-	-	↗	-	=	↗	↗	=	=	=	=	=	↗	=	-	-	-	↘	=
	1000	-	-	↗	-	↗	↗	↗	↗	=	=	↗	=	↗	=	-	-	-	=	=
Expérience 2 (palourde)	2	↗	↗	=	↘	↘	↗	=	=	=	=	=	↗	↗	=	-	-	-	=	=
	5	↗	↗	=	↘	↘	=	=	=	=	=	=	↗	↗	=	-	-	-	=	=
Expérience 3 (palourde)	400	=	=	↗	↘	↗	↗	↗	↗	↘	↘	↘	=	↘	↗	-	-	-	=	↗
	700	=	=	↗	↘	=	=	↗	↗	↘	↘	↘	=	↘	↗	-	-	-	↗	=
	1000	=	=	↗	↘	=	=	↗	=	↘	↘	↘	=	↘	↗	-	-	-	↗	↗
	1300	=	=	↗	↘	=	=	↗	=	↘	↘	↘	=	↘	↗	-	-	-	=	↗
Expérience 4 (palourde, 10 µg BaP/L)	1j	=	↗	=	↘	=	=	↗	=	=	=	↗	=	↗	=	-	-	-	=	=
	3j	=	=	↗	↘	=	=	=	=	=	↗	=	=	=	=	-	-	-	=	↗
	7j	↗	↗	↗	↘	↘	=	=	=	=	=	=	=	↗	=	-	-	-	=	↗
	14j	=	=	↗	↘	=	=	=	=	↗	=	↗	=	↗	↗	-	-	-	↘	↗
Expérience 5 (huître)	5	↗	↗	↗	=	-	=	-	=	=	↗	=	=	↗	↗	=	=	=	=	=
	20	↗	↗	↗	↘	-	=	-	↗	=	↗	=	↗	↗	↗	↗	↗	=	↘	=
	100	↗	↗	↗	↘	-	=	-	↗	=	↗	=	↗	↗	=	↗	↗	↗	=	=
	400	↘	↗	↗	↘	-	↗	-	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↘	↘
	1000	↘	↗	↗	↘	-	↗	-	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	=	=

- : non déterminé ; = : pas de différence significative par rapport au témoin ; flèche verte : augmentation ; flèche rouge : diminution.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

De nos jours, l'environnement marin est soumis à la pression de nombreuses substances toxiques, parmi lesquelles il y a les hydrocarbures et les métaux traces. De nombreux efforts sont actuellement entrepris pour promouvoir les sciences et les technologies dans le domaine de l'environnement afin d'améliorer la gestion des ressources, la protection et la réhabilitation de l'environnement. Il est donc nécessaire de disposer d'outils d'évaluation et de validation pour détecter les sites pollués et évaluer les risques encourus. C'est dans cette optique que s'inscrit ce travail de thèse dont les recherches avaient pour premier objectif d'évaluer l'état de santé de la lagune de Tunis à travers l'étude des diverses réponses transcriptionnelles, biochimiques et histopathologiques chez la palourde commune *Ruditapes decussatus* et la détermination des concentrations des HAPs et des métaux traces dans les sédiments et les tissus des palourdes. Le deuxième objectif de ce travail était de caractériser, au laboratoire, les effets génétiques, génotoxiques et biochimiques d'un modèle de HAP (benzo(a)pyrène) chez deux espèces de bivalves marins (*Ruditapes philippinarum* et *Crassostrea gigas*) suite à l'exposition à des concentrations subaiguës similaires à celles trouvées dans la lagune de Tunis et à des concentrations aiguës.

Notre étude *in situ* a montré une contamination des sédiments des différents sites de la lagune de Tunis par les HAPs et les métaux traces pendant les quatre saisons d'échantillonnage, ainsi que la biodisponibilité de ces contaminants pour la palourde *R. decussatus*. Les variations spatio-temporelles des concentrations des HAPs et des métaux dans les sédiments, observés dans cette étude, sont associées principalement aux charges des apports anthropiques. Cependant, les fluctuations spatio-temporelles des contaminants mesurés dans les tissus des palourdes sont plutôt associées aux changements des paramètres physico-chimiques du milieu (température et salinité) et aux processus physiologiques de l'animal, essentiellement la reproduction. En fait, l'approche chimique employée dans ce travail de terrain nous a permis de constater que la lagune de Tunis est fortement polluée. Dans cette étude, nous avons pu démontrer que cette contamination de nature organique et métallique a des effets biologiques chez la palourde *R. decussatus* en utilisant deux organes primordiaux pour la survie de l'organisme, les branchies et la glande digestive, vu leur rôle dans la respiration et l'alimentation. Ainsi, au niveau biochimique, nous avons observé une

augmentation des activités enzymatiques de biotransformation (BPH et GST) et de défense antioxydante (CAT), du niveau de la peroxydation lipidique (taux de MDA) et une inhibition de l'activité AChE. Au niveau moléculaire, nous avons noté une surexpression des gènes impliqués dans la respiration mitochondriale (*cox1* et *ARNr 16S*), le système antioxydant (*sod*), la réparation et la protection des protéines (*hsp70*) et la détoxication (*mt*). Au niveau tissulaire, l'étude histologique nous a permis de constater la sévérité de l'impact de la contamination sur les palourdes vu l'intensité du nombre élevé des lésions histopathologiques. Cette étude a montré que la fluctuation temporelle des biomarqueurs biochimiques est directement liée à l'interaction complexe entre les facteurs abiotiques (température) et les facteurs biotiques (la reproduction). Une analyse factorielle (ACP) nous a permis de discriminer entre les sites de la lagune de Tunis. En fait, elle a montré que le site Z2 est le plus affecté par la pollution multixénobiotique d'origine anthropique alors que les sites Z1 et Z3 ont un niveau de pollution comparable.

L'ensemble de ces résultats sur terrain a souligné l'importance de la combinaison des approches biologiques et chimiques et de l'intégration des réponses biologiques situées à différents niveaux de l'organisation biologique (moléculaire, biochimique, tissulaire) dans la biosurveillance de l'état de santé des organismes vivants et par conséquent de la qualité de leur environnement.

Le deuxième objectif de cette thèse contribue à la caractérisation des effets génétiques, génotoxiques et biochimiques du BaP au niveau des branchies et de la glande digestive de la palourde commune et de l'huître creuse exposées à des concentrations aiguës et subaiguës. L'exposition de la palourde *R. philippinarum* au BaP via la voie trophique a montré une variation des marqueurs biochimiques (GST, CAT, AChE et MDA) et une induction de certains gènes étudiés au niveau des branchies et de la glande digestive impliquant une réaction de défense chez l'organisme. La même chose a été observée chez la palourde *R. philippinarum* exposée à des concentrations subaiguës de BaP via l'eau de mer. Ces résultats ont montré que l'impact du BaP associé à la nourriture est plus important au niveau de la glande digestive alors que l'impact du BaP dissous dans l'eau de mer est plus important au niveau des branchies des palourdes. Nous avons pu constater aussi que le BaP dissous dans l'eau, même à des concentrations plus faibles, est plus toxique pour les palourdes que celui associé aux microalgues. L'exposition des palourdes à des concentrations aiguës de BaP via l'eau de mer a montré une invariabilité des marqueurs biochimiques de défense (GST et CAT) et une régression de l'expression de la majorité des gènes étudiés à partir d'une concentration

de 400 ou 700 µg/L indiquant l'incapacité de l'organisme à se défendre efficacement contre l'agression chimique et donc l'altération de son état de santé général. L'étude de la toxico-cinétique du BaP chez les palourdes exposées à une concentration subaiguë de 10 µg BaP/L (concentration maximale enregistrée dans l'eau de mer de la lagune de Tunis) nous a permis d'observer une fluctuation temporelle des paramètres biochimiques et transcriptomiques impliquant une réponse d'acclimatation chez les organismes exposés. Dans le but de comparer la réponse biologique à une exposition au BaP chez la palourde *R. philippinarum* à celle d'une autre espèce de bivalve marin, l'huître *C. gigas* a été exposée à des concentrations subaiguës et aiguës de BaP dissous dans l'eau de mer. Cette expérience a montré des réponses transcriptomiques au niveau des branchies des huîtres à partir d'une concentration de 5 µg BaP/L, alors que ces réponses ont été détectées à partir d'une concentration égale ou supérieure à 20 µg/L au niveau de la glande digestive impliquant une sensibilité plus importante des branchies au BaP dissous dans l'eau de mer par rapport à la glande digestive. On a pu aussi constater des réponses biochimiques et transcriptomiques similaires à celles de *R. philippinarum* suite à une exposition à des concentrations subaiguës de BaP (5 et 20 µg/L) caractérisée par une surexpression des biomarqueurs. Cependant, l'exposition des huîtres à des concentrations élevées de BaP (100, 400 et 1000 µg/L) suggère que cette espèce est plus résistante dans le cas d'une contamination aiguë par rapport à la palourde *R. philippinarum.* Ces expériences au laboratoire ont montré que les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la métabolisation mitochondriale (*cytb* et *cox1*), la reproduction (*vtg*) et la défense immunitaire (*ilk*) représentent des outils biologiques d'un grand intérêt dans le cas d'une exposition au BaP et susceptibles d'être utilisés comme biomarqueurs précoces chez les bivalves pour la biosurveillance des milieux contaminés par des concentrations chroniques et aiguës de HAPs.

L'étude de la génotoxicité en utilisant la technique de RAPD-qPCR a révélé un impact génotoxique du BaP chez les deux espèces de bivalve, suite à une exposition subaiguë ou aiguë, par voie trophique ou via l'eau de mer. Nous avons a pu constater aussi que l'effet génotoxique du BaP est précoce (après 1 jour d'exposition). Ces résultats impliquent un pouvoir génotoxique élevé du BaP chez les bivalves. Cette étude a permis de mettre en évidence la forte sensibilité de la technique RAPD-qPCR dans la détection des effets génotoxiques d'un contaminant même à des concentrations chroniques.

De manière globale, les approches en laboratoire ont souligné la forte toxicité du BaP chez les bivalves. Ils ont aussi pu mettre en évidence l'intérêt de l'application d'une

approche multibiomarqueur regroupant des biomarqueurs liés à différents niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique) pour pouvoir caractériser *in vivo* les effets d'un contaminant environnemental donné.

A l'issue de notre travail de recherche plusieurs perspectives peuvent être dégagées dans le but d'approfondir et de diversifier certaines approches, pour compléter et renforcer l'analyse interprétative des résultats. En effet, dans le cadre de l'étude *in situ* il serait intéressant d'analyser d'autres types de polluants dans la lagune de Tunis tels que les polychlorobiphényles (PCB), les pesticides, les nanoparticules et les produits pharmaceutiques. Il serait judicieux d'analyser les polluants dans d'autres matrices environnementales tels que l'eau de mer et les particules en suspension qui peut nous aider à identifier les voies de contaminations des bivalves et il semble être nécessaire de s'intéresser à la spéciation des polluants dans les conditions physico-chimiques retrouvées dans la lagune. Des études complémentaires portant sur d'autres types de biomarqueurs pourraient être envisagées. Un dosage des métallothionéines pourrait être réalisé pour évaluer les effets des métaux chez les bivalves. Dans le but de caractériser les éventuelles perturbations de la reproduction chez les bivalves, une analyse protéomique de l'expression des protéines impliquées dans la reproduction pourrait être projetée. Il serait intéressant aussi d'évaluer l'impact de la pollution au niveau populationnel par l'étude de la structure et de la dynamique des populations de la palourde.

Concernant l'approche expérimentale, il serait intéressant de réaliser des expériences de contamination en utilisant d'autres HAPs. Dans notre étude *in situ* nous avons pu mettre en évidence un effet combiné des contaminants et des facteurs abiotiques du milieu sur les biomarqueurs. La réalisation des expériences de contamination par les HAPs avec une variation de la température ou de la salinité serait nécessaire pour mieux caractériser l'effet combiné du contaminant/température ou contaminant/salinité. Egalement, il serait judicieux d'utiliser d'autres types de biomarqueurs. Dans le but de caractériser l'impact d'une contamination par les HAPs au niveau individuel, les réponses des biomarqueurs comportementaux (cinétique d'enfouissement des palourdes, valvométrie) pourraient être d'un grand intérêt. Une étude des biomarqueurs immunitaires (concentrations des hémocytes, pourcentage des granulocytes, la phagocytose) pourrait être intéressante pour évaluer l'immunotoxicité des HAPs chez les bivalves.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Achard M., Baudrimont M., Boudou, A., Bourdineaud J.P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. Aquatic Toxicology 67: 347-357.

Achard-Joris M., Gonzalez P., Marie V., Baudrimont M., Bourdineaud J.P., 2006. Cytochrome c oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. Biometals 19: 237-244.

Acquavita A., Falomo J., Predonzani S., Tamberlich F., Bettoso N., Mattassi G., 2014. The PAH level, distribution and composition in surface sediments from a Mediterranean Lagoon: The Marano and Grado Lagoon (Northern Adriatic Sea, Italy). Marine Pollution Bulletin. 81: 234-241.

Ahearn G.A., Mandal P.K., Mandal A., 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. Journal of Comparative Physiology Part B 174: 439-452.

Akcha F., Burgeot T., Budzinski H., Pfohl-Leszkowicz A., Narbonne J., 2000a. Induction and elimination of bulky benzo[a]pyrene-related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed in vivo to B[a]P-contaminated feed. Marine Ecology Progress Series 205: 195-206.

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

Akcha F., Leday G., Pfohl-Leszkowicz A., 2004. Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 552: 197-207.

Akcha F., Vincent Hubert F., Pfhol-Leszkowicz A., 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 534: 21-32.

Al-Arfaj, A.A., Alam, I.A., 1993. Chemical characterization of sediments from the Gulf area after the 1991 oil spill. Marine Pollution Bulletin 27 : 97-101.

Alink G.M., Frederix-Wolters E.M., Van der Gaag M.A., Van de Kerkhoff J.F., Poels C.L., 1980. Induction of sister-chromatid exchanges in fish exposed to Rhine water. Mutation Research 78: 369-374.

Al Kaddissi S., Legeay A., Elia A.C., Gonzalez P., Floriani M., Cavalie I., Massabuau J.C., Gilbin R., Simon O., 2014. Mitochondrial gene expression, antioxidant responses, and histopathology after cadmium exposure. Environmental Toxicology 29: 893-907.

Alloway B.J., Ayres D.C., 1997. Chemical Principles of Environmental Pollution. Blackie Academic and Profesional, an imprint of Chapman and Hall, London. p. 394.

Almeida E.A., Bainy A.C.D., de Melo Loureiro A.P., Martinez G.R., Miyamoto S., Onuki J., et al., 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 Part A 146: 588-600.

Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Ballan-Dufrançais C., Berthet B., Jeantet A.Y., Martoja R., Truchet M., 1989. Study of the bioaccumulation at the molecular, cellular and organism levels of lead and copper transferred to the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg directly from water or via food. Polish Academy of Sciences 34: 521-529.

Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J, Rainbowd P-S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic Toxicology 76: 160-202.

Amiard-Triquet C., Burgeot T., Claisse D., 1999. La surveillance de la qualité du milieu marin: l'expérience du Réseau national d'observation (RNO) et le développement de biomarqueurs. Océanis 25: 651-684.

Ankley G.T., Bencic D.C., Breen M.S., Collette T.W., Conolly R.B., Denslow N.D., Edwards S.W., Ekman D.R., Garcia-Reyero N., Jensen K.M., Lazorchak J.M., Martinović D., Miller D.H., Perkins E.J., Orlando E.F., Villeneuve D.L., Wang R.L., Watanabe K.H., 2009. Endocrine disrupting chemicals in fish: developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. Aquatic Toxicology 92: 168-178.

Ankley G.T., Di Toro D.M., Hansen D.J., Berry W.J., 1996. Technical basis and proposal for deriving sediment quality criteria for metals. Environmental Toxicology and Chemistry 15: 2056-2066.

Arini A., Daffe G., Gonzalez P., Feurtet-Mazel A., Baudrimont M., 2014a. Detoxification and recovery capacities of Corbicula fluminea after an industrial metal contamination (Cd and Zn): a one-year depuration experiment. Environmental Pollution 192: 74-82.

Arini A., Daffe G., Gonzalez P., Feurtet-Mazel A., Baudrimont M., 2014b. What are the outcomes of an industrial remediation on a metal-impacted hydrosystem? A 2-year field biomonitoring of the filter-feeding bivalve *Corbicula fluminea*. Chemosphere 108: 214-224.

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

Arkoosh M.R., Clemons E.R., Huffman P.A., Sanborn H.R., Casillas E., Stein J.E., 1996. Leukoproliferative response of splenic leukocytes from English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to chemical contaminants. Environmental Toxicology and Chemistry, 15: 1154-1162.

Arockia Vasanthi L., Revathi P., Arulvasu C., Munuswamy N., 2012. Biomarkers of metal toxicity and histology of Perna viridis from Ennore estuary, Chennai, south east coast of India. Ecotoxicology Environmental Safety 84: 92-98.

Atienzar F.A., Billinghurst Z., Depledge M.H., 2002a. 4-n-Nonylphenol and 17-beta estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. Environmental Pollution 120: 735-738.

Atienzar F.A., Evenden A.J., Jha A.N., Depledge M.H., 2002b. Use of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations: possible implications of confounding factors. Biomarkers 7: 94-101.

Atienzar F.A., Jha A.N., 2004. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphnia magna*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 552: 125-140.

Atienzar F.A., Jha A.N., 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 613: 76-102.

Attig H., Dagnino A., Negri A., Jebali J., Boussetta H., Viarengo A., Dondero F., Banni M., 2010. Uptake and biochemical responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to sublethal nickel concentrations. Ecotoxicology and Environmental Safety 73: 1712-1719.

Au DWT., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. Marine Pollution Bulletin 48: 817-834.

Avoine J., 1981. L'estuaire de la Seine : sédiments et dynamique sédimentaire. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Caen. p. 236.

Baggiolini M., 1998. Chemokines and leukocyte traffic. Nature 392: 565-568.

Banni M., Bouraoui Z., Ghedira J., Clearandeau C., Jebali J., Boussetta H., 2009a. Seasonal variation of oxidative stress biomarkers in clams *Ruditapes decussatus* sampled from Tunisian coastal areas. Environmental Monitoring and Assessment 155: 119-128.

Banni M., Bouraoui Z., Clerandeau C., Narbonne J.F., Boussetta H., 2009b. Mixture toxicity assessment of cadmium and benzo[a]pyrene in the sea worm *Hediste diversicolor*. Chemosphere 77 : 902-906.

Banni M., Dondero F., Jebali J., Guerbej H., Boussetta H., Viarengo A., 2007. Assessment of heavy metal contamination using real time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: A validation along the Tunisian coasts. Biomarkers 12: 369-383.

Banni M., Hajer A., Sforzini S., Oliveri C., Boussetta H., Viarengo A., 2014. Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in *Mytilus galloprovincialis* exposed to nickel and heat stress. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 160: 23-9.

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

Banni M., Messaoudi I., Said L., El Heni J, Kerkeni A., Said K., 2010a. Metallothionein gene expression in liver of rats exposed to cadmium and supplemented with zinc and selenium. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 59: 513-519.

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

Barnes R.S.K, 1980. Coastal lagoons. Cambridge Studies in Modern Biology 1, Cambridge University Press, Cambridge.

Barouki R., Morel Y., 2001. Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. Biochemical Pharmacology 61: 511-516.

Barra R., Sanchez-Hernandez J.C., Orrego R., Parra O., Galivan J.F., 2001. Bioavailability of PAHs in the Biobio river (Chile): MFO activity and biliary fluorescence in juvenile *Oncorhynchus mykiss*. Chemosphere 45: 439-444.

Barre P., Bride M., Beliard R., Petracca B., 1991. Localization of yolk proteins and their possible precursors using polyclonal and monoclonal antibodies, in *Helix aspersa*. Cellular and Molecular Biology 37: 639-650.

Baudrimont M., Andres S., Durrieu G., Boudou A., 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve Corbicula fluminea during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. Aquatic Toxicology 63: 89-102.

Baumard P., Budzinski H., Garrigues P., Narbonne J.F., Burgeot T., Michel X., Bellocq J., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus sp.*) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. Marine Environmental Research 47: 415-439.

Baumard P., Budzinski H., Michon Q., Garrigues P., Burgeot T., Bellocq J., 1998. Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from mussel and sediment records. Estuarine, Coastal and Shelf Science. 47: 77-90.

Beaune P.H., Loriot M.A., 2000. Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques : aspects métaboliques. Médecine/Sciences 16: 1051-1056.

Bebianno M.J., Barreira L.A., 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations and biomarker responses in the clam *Ruditapes decussatus* transplanted in the Ria Formosa lagoon. Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 1849-1860.

Bebianno M.J., Company R., Serafima L., Camus L., Cosson R.P., Fiala-Medoni A., 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in Bathymodiolus azoricus from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. Aquatic Toxicology 75: 354-373.

Bebianno M.J., Géret F., Hoarau P., Serafim M.A., Coelho M.R., Gnassia-Barelli M., Roméo M., 2004. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. Biomarkers 9: 305-330.

Belkhir M., Hadj Ali Salem M., 1983. Notion d'hydrologie comparée dans le lac de Tunis. Bulletin de l'Institut National Scientifique et Technique d'Océanographie et de Pêche de Salammbô 9: 71-88.

Bellucci L.G., Frignani M., Paloucci D., Ravanelli, M., 2002. Distribution of heavy metals in sediments of the Venice Lagoon: the role of the industrial area. The Science of the Total Environment, 295: 35-49.

Benedetti M., Martuccio G., Fattorini D., Canapa A., Barucca M., Nigro M., Regoli F., 2007. Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchiile*. Aquatic Toxicology 85: 167-175.

Ben Khedher S., Jebali J., Houas Z., Nawéli H., Jrad A., Banni M., Boussetta H., 2014. Metals bioaccumulation and histopathological biomarkers in *Carcinus maenas* crab from Bizerta lagoon, Tunisia. Environmental Science and Pollution Research 21: 4343-4357.

Ben Khedher S., Jebali J., Kamel N., Banni M., Rameh M., Jrad A., Boussetta H., 2013. Biochemical effects in crabs (*Carcinus maenas*) and contamination levels in the Bizerta Lagoon: an integrated approach in biomonitoring of marine complex pollution. Environmental Science and Pollution Research 20: 2616–2631.

Benlahcen K.T., Chaoui A., Budzinski H., Bellocq J., Garrigues P., 1997. Distribution and sources of polycylic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediments. Marine Pollution Bulletin 34: 298-305.

Ben Souissi J., 2002. Impact de la pollution sur les communautés macrobenthiques du Lac Sud de Tunis avant sa restauration environnementale. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences de Tunis. p. 266.

Berthou F., Balouet G., Bodennec G., Marchand M., 1987. The occurrence of hydrocarbons and histopathological abnormalities in oysters for seven years following the wreck of the Amoco Cadiz in Brittany (France). Marine Environmental Research 23: 103-133.

Bertrand J.C., Mille G., 1989. Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures. In: Bianchi M, Marty D., Bertrand J.C., Caumette P., et Gauthier M.J. (eds), Microorganismes dans les écosystèmes océaniques, Chapitre 13. Masson, Paris. pp. 85-343.

Bhandari R.K., Deem S.L., Holliday D.K., Jandegian C.M., Kassotis C.D., Nagel S.C., Tillitt D.E., Vom Saal F.S., Rosenfeld C.S., 2014. Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17α-ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. General and comparative endocrinology, *in press.* doi: 10.1016/j.ygcen.2014.09.014.

Bijoux H., 2014. Etude de l'impact toxique des contaminants chimiques du bassin d'Arcachon sur l'huitre creuse *Crassostrea gigas* ; approche *in situ* et expérimentale. Thèse de Doctorat en Géochimie et Ecotoxicologie. Université de Bordeaux. p. 387.

Bjorseth A., Olufsen S., 1983. Long transport of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Bjorseth A. (ed), Polycyclic aromatic hydrocarbons. Marcel Dekker, New York. pp. 507-524.

Bocquené G., Galgani F., Walker C.H., 1997. Les cholinestérases, biomarqueurs de neurotoxicité. In: Lagadic L., Caquet Th., Amiard J.C., Ramade F., (Eds), Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Masson, Paris. pp. 1-9.

Bodin N., Burgeot T., Stanisière J.Y., Bocquené G., Menard D., Minier C., Boutet I., Amat A., Cherel Y., Budzinski H., 2004. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. Comparative biochemistry and physiology Part C 138: 411-427.

Bogovski S., Lang T., Mellergaard S., 1999. Histopathological examinations of liver nodules in flounder (*Platichthys flesus L*.) from the Baltic Sea. ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil 56: 152-156.

Bolton R.M., Ahokas J.T., 1997. Purification and characterization of hepatic glutathione transferases from an insectivorous marsupial, the brown antechinus (*Antechinus stuartii*). Xenobiotica 27: 573-586.

Borgeraas J., Nilsen K., Stenersen J., 1996. Methods for purification of glutathione transferases in the earthworm genus *Eisenia*, and their characterization. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 114: 129-140.

Borneff J., Selenka F., kunte H., Maximos A., 1968. Synthetis of 3,4-benzopyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in plants. Archiv für Hygiene und Bakteriologie. 152: 279-282.

Boucheseiche C., Cremille E., Pelte T., Pojer K., 2002. Bassin Rhône - Méditerranée - Corse. Guide technique n°7, Pollution toxique et écotoxicologie : notion de base. Lyon, Agence de l'Eau Rhône - Méditerranée - Corse, p. 83.

Bouchez M., Blanchet D., Heasler F., Vendecasteel J.P., 1996. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement : propriétés, origines, devenir. Revue de l'institut français du pétrole 51(3) :407-419.

Bougrier S., Collet B., Geairon P., Geffard O., Héral M., Deslous-Paoli J.M., 1998. Respiratory time activity of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 219: 205-216.

Bouraoui Z., Banni M., Ghedira J., Clerandeau C., Guerbej H., Narbonne J.F., Boussetta H., 2008. Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata*. Fish physiology and biochemistry 34: 201-207.

Bouraoui Z., Banni M., Ghedira J., Clerandeau C., Narbonne J.F., Boussetta H., 2009. Evaluation of enzymatic biomarkers and lipoperoxidation level in Hediste diversicolor exposed to copper and benzo[a]pyrene. Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 1893-1898.

Bourgeat M.P., 2002. PCB et HAP résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale : Etude bibliographique. Thèse vétérinaire. Université Claude-Bernard-lyon.I. p. 155.

Bousquet J.C., 2003. Avis du conseil économique et social régional sur « Les risques de pollution par hydrocarbures en méditerranée ».Rapport préparé par la commission agriculture-MER-PECHE. pp. 12-13.

Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principal of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Bride M., Petracca B., Faivre D., 1992. The synthesis of vitellogenins by the digestive gland of *Helix aspersa*: evidence from cell-free translation of mRNA. Cellular and Molecular Biology 38: 181-187.

Brown T.M., Ross P.S., Reimer K.J., Veldhoen N., Dangerfield N.J., Fisk A.T., Helbing C.C., 2014. PCB Related Effects Thresholds As Derived through Gene Transcript Profiles in Locally Contaminated Ringed Seals (*Pusa hispida*). Environmental science & technology 48: 12952-12961.

Buege J.A., Aust S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology 50: 302-310.

Budzinski H., 1993. Les composés aromatiques alkylés dans les échantillons pétroliers : Aspects physico-chimiques et thermodynamiques. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux1. p. 306.

Budzinski H., Jones I., Bellocq C., Pierard P., Garrigues P., 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. Marine Chemistry. 58: 85-97.

Buhler D.R., Wang-Buhler J.L., 1998. Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 121: 107-137.

Bustamante P., Luna-Acosta L., Clemens S., Cassi R., Thomas-Guyon H., Warnau M., 2012. Bioaccumulation and metabolisation of 14C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater. Chemosphere 87: 938–944.

Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J.L., 2003. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. Mutation Research 531: 5-23.

Cailleaud K., Forget-Leray J., Souissi S., Hilde D., LeMenach K., Budzinski H., 2007. Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. Chemosphere 70: 270-80.

Callender E., 2003. Heavy Metals in the Environment-Historical Trends. In: B.S. Lollar (Ed.), Environmental Geochemistry. Treatise on Geochemistry. Elservier-Pergamon, Oxford. pp. 67-105.

Cajaraville M.P., Bebianno M.J., Blasco J., Porte C., Sarasquete C., Viarengo A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Science of the Total Environment 247: 295-311.

Cambier S., Gonzalez P., Durrieu G., Bourdineaud J.P., 2010. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. Ecotoxicology and Environmental Safety 73: 312-319.

Campbell P.G.C., Couillard Y., 2004. Prise en charge et détoxication des métaux chez les organismes aquatiques. In: Pelletier E., Campbell P.G.C. & Denizeau F. (eds.), Ecotoxicologie Moléculaire - Principes fondamentaux et perspectives de développement. Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy, Québec. pp. 197-256.

Campian J.L., Qian M., Gao X., Eaton J.W., 2004. Oxygen tolerance and coupling of mitochondrial electron transport. Journal of Biological Chemistry 279: 46580–46587.

Campillo J.A., Albentosa M., Valdés N.J., Moreno-González R., León V.M., 2013. Impact assessment of agricultural inputs into a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain) on transplanted clams (*Ruditapes decussatus*) by biochemical and physiological responses. Aquatic Toxicology 142-143: 365-379.

Campos A., Tedesco S., Vasconcelos V., Cristobal S., 2012. Proteomic research in bivalves: towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. Journal of Proteomics 75: 4346-4359.

Cannino G., Ferruggia E., Luparello C., Rinaldi A.M., 2009. Cadmium and mitochondria. Mitochondrion 9: 377–384.

Capaldi RA., 1990. Structure and assembly of Cytochrome c oxidase. Archives of Biochemistry and Biophysics 280: 252–262.

CAR/ASP (Centre d'Activités Régionales pour les Aires Spécialement Protégées), 2003. Impact du tourisme sur la biodiversité marine et côtière de la Méditerranée. Projet pour la préparation d'un Plan d'Action Stratégique pour la Conservation de la Biodiversité dans la Région Méditerranéenne (PAS – BIO), p. 107.

Carlson E.A., Li Y., Zelikoff J.T., 2002. The Japanese medaka (*Oryzias latipes*) model: applicability for investigating the immunosuppressive effects of the aquatic pollutant benzo[a]pyrene (BaP). Marine Environmental Research 54: 565-568.

Castaño A., Becerril C., 2004. In vitro assessment of DNA damage after short-and long-term exposure to benzo (a) pyrene using RAPD and the RTG-2 fish cell line. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 552: 141-151.

CEDRE, 2006. Mieux comprendre les marrées noires. CEDRE, Brest, p. 118. http://www.marees-noires.com/fr/outils/telecharger.php.

Cesari P., Pellizzato M., 1990. Biology of *Tapes Philippinarum*. In: *Tapes Philippinarum*: Biologia e Sperimentazione. Regione Veneto, Ente di Sviluppo Agricolo, Venice. p. 299.

CGDD-SOeS (Commissariat général au développement durable - Service de l'observation et des statistiques), 2011. Environnement littoral et marin. Monographie, Edition 2011, p. 164.

Châtel A., Faucet-Marquis V., Perret M., Gourlay-Francé C., Uher E., Pfohl-Leszkowicz A., Vincent-Hubert F., 2012. Genotoxicity assessment and detoxification induction in *Dreissena polymorpha* exposed to benzo [a] pyrene. Mutagenesis 27: 703-711.

Cheggour M., Chafik A., Fisher N.S., Benbrahim S., 2005. Metal concentrations in sediments and clams in four Moroccan estuaries. Marine Environmental Research 59: 119-37.

Chen J.S., Sappington T.W., Raikhel A.S., 1997. Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry. Journal of Molecular Evolution 44: 440-451.

Chen C., Xue S., Zhou Q., Xie X., 2011. Multilevel ecotoxicity assessment of polycyclic musk in the earthworm *Eisenia fetida* using traditional and molecular endpoints. Ecotoxicology 20: 1949–1958.

Chen H., Zha J., Liang X., Li J., Wang Z., 2014. Effects of the human antiepileptic drug carbamazepine on the behavior, biomarkers, and heat shock proteins in the Asian clam *Corbicula fluminea*. Aquatic Toxicology 155: 1-8.

Cheung C.C.C., Siu W.H.L., Richards B.J., De Luca-Abbott S.B., Lam P.K.S., 2004. Antioxidant responses to benzo [a] pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. Environmental Pollution 128: 393-403.

Chong K., Wang W.X., 2000. Comparative studies on the biokinetics of Cd, Cr, and Zn in the green mussel *Perna viridis* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Environmental Pollution 115: 107–121.

Chouba L., 2009. Bioaccumulation et tendance temporelle des métaux traces (Cd, Pb, Hg) dans les sédiments et chez les mollusques bioindicateurs de la qualité du littoral tunisien. Thèse de Doctorat, Institut National Agronomique de Tunis, Université de Carthage. p. 200.

CIESM, 2007. Impact of mariculture on coastal ecosystems. CIESM Workshop Monographs n°32, Monaco, p. 118. www.ciesm.org/online/monographs/lisboa07.pdf

Ciocan C.M., Cubero-Leon E., Langston W.J., Pope N., Cornelius K., Hill, Alvarez-Munoz D., Indiveri P., Lerebours A., Minier C., Rotchell J.M., 2015. Intersex related gene expression profiles in clams *Scrobicularia plana*: Molecular markers and environmental application. Marine pollution bulletin, in press.

Clairborne A., 1985. Catalase activity. Handbook of methods for oxygen radical research. CRC. Press Boca. Raton, Florida. pp. 283-284.

Claisse D., 1992. Accumulation des métaux lourds et polluants organique par les coquillages. In: Coquillage et santé publique, du risque à la prévention. Editions Ecole nationale de la santé publique, Paris, pp. 99-111.

Coelho M.R., Bebianno M. J., Langston W.J., 2002. Routes of TBT uptake in the clam *Ruditapes decussatus*. II. Food as vector of TBT uptake. Marine environmental research 54: 193-207.

Cojan I., Renard M., 1997. Sédimentologie. Dunod, Paris, 2ème édition, collection Sciences Sup., p. 481.

Coic, L., 2007. Etude dynamique de l'ostréiculture dans le bassin de Marennes-Oléron depuis l'introduction de l'huître japonaise *Crassostrea gigas*: de la production à la prolifération. IFREMER (Ed.). http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/3426/

Colombo J.C., Pelletier E., Brochu C., Khalil M., Cattogio J.A., 1989. Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study : Rio de La Plata Estuary, Argentina. Environmental Science & Technology 23: 888-894.

Commandeur J.N.M., Stijntjes G.J., Vermeulen N.P.E., 1995. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. Pharmacological Research 47: 271-330.

Connell D.W., Lam P.K.S., Richardson B.R., Wu R.S.S., 1999. Introduction to Ecotoxicology. Blackwell Science, Abingdon. p. 170.

Cossu C., Doyette A., Jacquin M.C., Vasseur P., 1997. Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques. In: Lagadic L., Caquet Th., Amiard J.C., Ramade F., (Eds.) Biomarqueurs en écotoxicologie: aspects fondamentaux. Masson, Paris. pp. 149-163.

Costa P.M., Carreira S., Costa M.H., Caeiro S., 2013. Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. Aquatic Toxicology 126: 442-454.

Cravo A., Pereira C., Gomes T., Cardoso C., Serafim A., Almeida C., Rocha T., Lopes B., Company R., Medeiros A., Norberto R., Pereira R., Araújo O., Bebianno M.J., 2012. A multibiomarker approach in the clam *Ruditapes decussates* to assess the impact of pollution in the Ria Farmosa lagoon, South Coast of Portugal. Marine Environmental Research 75: 23-24.

Croxton A.N., Wikfors G.H., Schulterbrandt-Gragg R.D., 2012. Immunomodulation in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to a PAH-contaminated, microphytobenthic diatom. Aquatic Toxicology 118: 27-36.

D'Adamo R., Di Stasio M., Fabbrochini A., 2008. Migratory crustaceans as biomonitors of metal pollution in their nursery areas. The Lesina lagoon (SE Italy) as a case study. Evironmental monitoring and assessment 143: 15-24.

Dachs J., Bayona J.M., Raoux C., Albaiges J., 1997. Spatial, vertical distribution and budget of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Western Mediterranean seawater. Environmental Science and Technology 31: 682-688.

Dedeh A., Ciutat A., Treguer-Delapierre M., Bourdineaud J.P., 2014a. Impact of gold nanoparticles on zebrafish exposed to a spiked sediment. Nanotoxicology 9: 71-80.

Dedeh A., Ciutat A., Tran D., Bourdineaud J.P., 2014b. DNA Alterations Triggered by Environmentally Relevant Polymetallic Concentrations in Marine Clams *Ruditapes philippinarum* and Polychaete Worms *Hediste diversicolor*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 67:651-658.

Delgado M., Perez-Camacho A., 2002. Hermaphroditism in *Ruditapes decussatus* (L.) (Bivalvia) from the Galician coast (Spain). Scientia Marina 66: 183-185.

Dellali M., Roméo M., Aissa P., 2001a. Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. Ocean Acta 24: 1-9.

Dellali M., Gnassia-Barelli M., Romeo M., Aissa P., 2001b. The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. Comparative Biochemistry and Physiology 130: 227-235.

De Luca-Abbott S.B., Richardson B.J., McClellan K.E., Zheng G.J., Martin M. et Lam P.K.S., 2005. Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. Marine Pollution Bulletin 51: 694-707.

Depledge M.H., Fossi M.C., 1994. The role of biomarker in environmental assessment. Ecotoxicology 3: 161-172.

Depledge M.H., Rainbow P.S., 1990. Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 97: 1-7.

Di Giulio, R.T., Habig, C., Gallagher, E.P., 1993. Effects of black Rock Harbor sediments on ondices of biotransformation, oxidative stress and DNA integrity in channel catfish. Aquatic Toxicology 26: 1-22.

Dil A., Misra A., Sulaiman I.M., Sinha S., Sarkar C., Mahapatra A.K., Hasnain S.E., 1998. Genetic alterations in brain tumors identified by RAPD analysis. Gene 206: 45-48.

Di Toro D.M., McGrath J.A., Hansen D.J., Berry W.J., Paquin P.R., Mathew R., Wu K.B., Santore R.C., 2005. Predicting sediment metal toxicity using a sediment biotic ligand model: Methodology and initial application. Environmental Toxicology and Chemistry 24: 2410-2427.

Djomo J.E., Ferrier V., Gauhier L., Zoll-Moreux C., Marty J., 1995. Amphibian micronucleus test in vivo: Evaluation of the genotoxicity of some major polycyclic aromatic hydrocarbons found in a crude oil. Mutagenesis. 10: 223-226.

Doyotte A., Cossu C., Jacquin M.C., Babut M., Vasseur P., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Aquatic Toxicology 39: 93-110.

EEA, 2006. Priority issues in the Mediterranean environment. European Environment Agency Report No 4/2006, Copenhague, p. 88.

Ellman G.L., Courtney K.O., Andres V., Featherstone R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 7: 88-95.

Enan M.R., 2006. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. Biotechnology and Applied Biochemistry 43: 147-154.

Er-Raioui H., Bouzid S., Marhraoui M., Saliot A., 2009. Hydrocarbon pollution of the Mediterranean coastline of Morocco. Ocean and Coastal Management 52: 124-129.

Ettajani H., Amiard J.C., 1995. Biodisponibilié de quelques métaux fixés sur les matières en suspension (MES) en milieu estuarien. Hydrécologie Appliquée 12: 75-89.

Euronet Consortium, 2012. Profil Environnemental de Pays-Tunisie. Rapport final. Contrat-Cadre EuropeAid/127054/C/SER/Multi - Lot 6: Environnement, 180 p. http://www.ugp3a.gov.tn/Fr/upload/doc_docs/document-21.pdf

Fang X., Thornton C., Scheffer B.E., Willett K.L., 2013. Benzo[a]pyrene decreases global and gene specific DNA methylation during zebrafish development. Environmental Toxicology and Pharmacology 36: 40–50.

Fang J., Wang K.X., Tang J.L., Wang Y.M., Ren S.J., Wu H.Y., Wang J., 2004. Copper, lead, zinc, cadmium, mercury, and arsenic in marine products of commerce from Zhejiang coastal area, China, May 1998. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 73: 583-590.

FAO, 2004. The hatchery culture of bivalves: a practical manual. Helm M.M., Bourne N., Lovatelli A., (Eds.), FAO Fisheries Technical Paper No. 471. Rome. p. 177.

Farrington J.W., 1989. Accumulation of hydrophobic organic pollutant compounds. In: Levin. S.A., Harwell M.A. Kelly J.R., Kimbal K.D. (eds), Ecotoxicology: Problems and approaches. Springer Verlag, New York. pp. 279-313.

Favier A., 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique 108–115. http://www.andrecontrelasla.be/IMG/pdf/Favier.pdf

Feldstein T., Nelson N., Mokady O., 2006. Cloning and expression of MDR transporters from marine bivalves, and their potential use in biomonitoring. Marine Environmental Research 62: S118-S121.

Fernandez B., Campillo A., Martinez-Gomez A., Benedicto J., 2010. Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. Aquatic Toxicology 99: 186–197.

Fernández B., Campillo J.A., Martínez-Gómez C., Benedicto J., 2012. Assessment of the mechanisms of detoxification of chemical compounds and antioxidant enzymes in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Mediterranean coastal sites. Chemosphere. 87: 1235-1245.

Ferrero-Miliani L., Nielsen O.H., Andersen P.S., Girardin S.E., 2007. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. Clinical and Experimental Immunology 147: 227-235.

Fisher S.W., 1995. Mecanisms of bioaccumulation in aquatic systems. Environnmental Contamination and Toxicology. 142: 87-117.

Fitzpatrick P.J., Sheehan D., Livingstone D.R., 1995. Studies on isoenzymes of glutathione S-transferase in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* with exposure to pollution. Marine Environmental Research 39: 241-244.

Flammarion P., Devaux A., Nehls S., Migeon B., Noury P., Garric J., 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). Ecotoxicology and Environmental Safety 51:145-153.

Foley V., Sheehan D., 1998. Glutathione S-transferases of the yeast *Yarrowia lipolytica* have unusually large molecular mass. Biochemical Journal 333: 839-845.

Foureman G.L., 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animal: hydrolysis and conjugation enzymes (or phase II enzymes). In Metabolism of PAH in the aquatic environment (Varanasi U, Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL. pp 185-202.

Fournier M., Pellerin J., Lebeuf M., Brousseau P., Morin Y., Cyr D., 2002. Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. Aquatic Toxicology 59: 83-92.

Fowler S.W., Papadopoulou C., Zafiropoulos D., 1985. Trace elements in selected species of zooplankton and necton from the open Mediterranean Sea. In Lekkas, & D. Temistokes (Eds.), Heavy metals in the environment. 5th International Conference Edinburgh, UK: CEP Consultants. 1: 570–672.

Franc A., 1960. Classe des bivalves. In: Grassé P.P., (Ed.). Traité de zoologie. Anatomie, systématique. Tome V. Fascicule II. Masson, Paris. pp. 1845-2133.

Franco A., Franzoi P., Torricelli P., 2008 Structure and functioning of Mediterranean lagoon fish assemblages: A key for the identification of water body types. Estuarine, Coastal and Shelf Science 79: 549-558.

Fu G., Kan A.T., Tomson M., 1994. Adsorption and desorption hysteresis of PAHs in surface sediment. Environmental Toxicology and Chemistry 13: 1559-1567.

Fu J., Wang H., Billah S.M., Yu H., Zhang X., 2014. Heavy metals in seawater, sediments, and biota from the coastal area of Yancheng City, China. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1697-1704.

Galaf F., Ghannam S., 2003. Contribution a l'élaboration d'un manuel et d'un site web sur la pollution du milieu marin : pollution chimique. Mémoire de troisième cycle en Agronomie Halieutique. Institut Agronomique et Vétérinaire, Rabat. p. 36.

Galgani F., Bocquene G., Truquet P., Burgeot T., Chiffoleau J.F., Claisse D., 1992. Monitoring of pollutant biochemical effects on marine organisms of the French coasts. Oceanologica Acta 15: 355-364.

Garcin J.C., 1998. Mesure de lésions oxydatives de l'ADN dans les tissus et les fluides biologiques comme biomarqueurs de stress oxydatif : applications in vivo chez le rat et chez l'homme. Thèse de Doctorat en sciences des aliments, Université de Bordeaux 1. p. 236.

Garrigues P., Soclo H., Marniesse M.P., Ewald M., 1987. Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in recent sediment from the continental shelf of the "Golfe de Gascogne" (Atlantic ocean) and in the Gironde Estuary. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 28: 121-131.

Geffroy B., Ladhar C, Cambier S, Treguer-Delapierre M, Brèthes D, Bourdineaud JP. 2012. Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: the role of size, concentration and exposure time. Nanotoxicology 6: 144-160.

George S.G., 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. Aquatic toxicology 4: 37-85.

Gérard G., 1978. Recherches sur la variabilité de diverses populations de *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* (Veneridae, Bivalvia). Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest. p. 149.

Geret F., Serafim A., Bebianno M.J., 2003. Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussates*. Ecotoxicology 12: 417-426.

Ghate H.V., Mulherkar L., 1979. Histological changes in the gills of two freshwater prawn species exposed to copper sulphate. Indian Journal of Experimental Biology 17: 838-840.

Giamberini L., Pihan J.C., 1996. The pericardial glands of the zebra mussel: Ultrastructure and implication in lead detoxication process. Biology of the Cell 86: 59-65.

Giarratano E., Gil M.N., Malanga G., 2011. Seasonal and pollution-induced variations in biomarkers of transplanted mussels within the Beagle Channel. Marine Pollution Bulletin 62:1337-1344.

Girotti A.W., 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. Journal of Lipid Research 39: 1529–1542.

Giusti A., Leprince P., Mazzucchelli G., Thome J.-P., Lagadic L., Ducrot V., Joaquim-Justo C., 2013. Proteomic analysis of the reproductive organs of the hermaphroditic gastropod *Lymnaea stagnalis* exposed to different endocrine disrupting chemicals. PLoS One e0081086.

GlobalTox, 1997. Technical evaluation of histopathology as an environmental monitoring tool for the mining industry in Canada. Report prepared for Aquatic Effects Technology Evaluation (AETE) Program, Ottawa. Natural Resources Canada by GlobalTox International Consultants Inc., Ottawa. p. 153

Goel M.R., Shara M.A., Stohs S.J., 1988. Induction of lipid peroxydation by hexachlorocyclohexane, Dieldrin, TCDD, Carbon Tetrachloride and hexachlorobenzene in Rats. Bulletin of Environment Contamination and Toxicology 40: 255-262.

Gold C., 2002. Etude des effets de la pollution métallique (Cd/Zn) sur la structure des communautés de diatomées périphytiques des cours d'eau. Approches expérimentales *in situ* et en laboratoire. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux 1, p. 175.

Gold-Bouchot G., Sima-Alvarez R., Zapata-Perez O., Guemez-Ricalde J., 1995. Histopathological effects of petroleum hydrocarbons and heavy metals on the American oyster (*Crassostrea virginica*) from Tabasco, Mexico. Marine Pollution Bulletin 31: 439-445.

Gonzalez P., Baudrimont M., Boudou A., Bourdineaud J.P., 2006. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). Biometals 19: 225-235.

Gonzalez P., Dominique Y., Massabuau J.C., Boudou A., Bourdineaud J.P., 2005. Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the fish zebra (*Danio rerio*). Environmental Science & Technology 39: 3972-3980.

Goulletquer P., 1995. Cycle de reproduction naturelle de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Bivalves Aquaculture Marine, Groupe de travail sur la reproduction des mollusques. http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/3209/.

Gourlay C., Tusseau-Vuillemin M.H., Garric J., Mouchel J.M., 2003. Effect of dissolved organic matter of various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of PAHs in Daphnia magna. Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1288-1294.

Gravato C., Santos M.A., 2003. Genotoxicity biomarkers' association with B (a) P biotransformation in *Dicentrarchus labrax L*. Ecotoxicology and Environmental Safety 55: 352-358.

Greenamyre J.T., MacKenzie G., Peng T.I., Stephans S.E., 1999. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Biochemical Society Symposia 66: 85–97.

Griscom S.B., Fisher N.S., Luoma S.N., 2002. Kinetic modeling of Ag, Cd and Co bioaccumulation in the clam *Macoma balthica*: quantifying dietary and dissolved sources. Marine Ecology Progress Series 240: 127–141.

Grizel H., 1996. Some examples of the introduction and transfer of mollusk populations. Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties 15: 401-408.

Grizel H., 2003. An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. Ifremer, Plouzané, France. p. 200.

Gschewend P.M., Hites R.A., 1981. Flux of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine and lacustrine sediments in the north-eastern United States. Geochimica et Cosmochimica Acta 45: 2359-2367.

Guilherme S., Válega M., Pereira M.E., Santos M.A., Pacheco M., 2008. Antioxidant and biotransformation responses in *Liza aurata* under environmental mercury exposure -relationship with mercury accumulation and implications for public health. Marine Pollution Bulletin 56: 845-59.

Gowland B.T.G., Moffat C.F., Stagg R.M., Houlihan D.F., Davies I.M., 2002. Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. Marine Environmental Research 54:169–77.

Habig W.H., Pabst M.J., Jakboy W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry 249: 7120-7130.

Halliwell B., Cross C.E., 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. Environmental Health Perspectives 102: 5-12.

Hamida L., 2004. Reproduction de la palourde *Ruditapus decussatus*, en milieu naturel (sud Tunisie) et en milieu contrôlé (écloserie expérimentale): relation avec le système immunitaire. Thèse de Doctorat en Océanologie Biologique. Université de Bretagne Occidentale. p. 88.

Harrison W., Winnick M.A., Kwong P.T.Y., Mckay D., 1975. Crude oil spills-Disappearance of aromatic and aliphatic components from small sea-surface slicks. Environmental Science & Technology 9: 231-234.

Hase A., Hite R.A., 1976. On the origin of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments: biosynthesis by anaerobic bacteria. Geochimica et Cosmochimica Acta. 40: 1141-1143.

Hayward A., Takahashi T., Bendena W.G., Tobe S.S., Hui J.H.L., 2010. Comparative genomic and phylogenetic analysis of vitellogenin and other large lipid transfer proteins in metazoans. FEBS Letters 584: 1273–1278.

Hemalatha S., Banerjee T.K., 1997. Histopathological analysis of acute toxicity of zinc chloride on the respiratory organs of air-breathing catfish heteropneustes (*Saccobranchus*) fossilis (*Bloch*). Veterinarski Arhiv 67: 11-24.

Hermes-Lima M., 2005. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. Functional Metabolism. John Wiley & Sons Inc.. pp. 319–368.

Hinson J.A., Kadlubar F.F., 1988. Glutathione and glutathione transferases in the detoxification of drug and carcinogen metabolites. In: Ketterer B., Sies H., (Eds.), Glutathione Conjugation, Mechanisms and Biological Significance. Academic Press, London. pp. 235-280.

Hoarau P., Garello G., Gnassia-Barelli M., Roméo M., Girard J., 2004. Effect of three xenobiotic compounds on glutathione S-transferase in the clam *Ruditapes decussatus*. Aquatic Toxicology 68: 87–94.

Hoarau P., Gnassia-Barelli M., Roméo M., Girard J.P., 2001. Differential induction of glutathione S-transferases in the clam *Ruditapes decussatus* exposed to organic compounds. Environmental Toxicology and Chemistry 20: 523-529.

Hoffmann J.L., Oris J.T., 2006. Altered gene expression: A mechanism for reproductive toxicity in zebrafish exposed to benzo [a] pyrene. Aquatic toxicology 78: 332-340.

Howell N., 1989. Evolutionary conservation of protein regions in the protonmotive cytochrome b and their possible roles in redox catalysis. Journal of Molecular Evolution 29: 157–169.

Hur D., Jeon J.K., Hong S., 2013. Analysis of immune gene expression modulated by benzo [a] pyrene in head kidney of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B 165: 49-57.

IARC, 1987. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Overall Evaluation of Carcinogenity: An Updating of IAPC Monographs, vol. 1-42(Suppl. 7). International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

INERIS, 2006. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - Benzo[a]pyrène. Version N°2-3-juillet 2006. p. 44.

Iwakura Y., Ishigame H., Saijo S., Nakae S., 2011. Functional specialization of interleukin-17 family members. Immunity 34: 149-162.

James M.O., Boyle S.M., 1998. Cytochromes P450 in crustacean. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 121: 157-172.

James M.O., Kleinow K.M., 1994. Trophic transfert of chemicals in the aquatic environment. In: Malins D.C., Ostrander G.K. (eds), Aquatic toxicology: Molecular, biochemical and cellular perspectives. Lewis, London. pp. 69-92.

Jebali J., 2006. Etude de la toxicité moléculaire et sub-cellulaire des polluants environnementaux sur un modèle biologique marin. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques et Biotechnologie. Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir. p. 138.

Jebali J., Banni M., De Almeida E.A., Boussetta H., 2007. Oxidative DNA damage levels and catalase activity in the clam *Ruditapes decussatus* as pollution biomarkers of Tunisian marine environment. Environmental Monitoring and Assessment 124: 195-200.

Jeong W.G., Cho S.M., 2007. Long-term effect of polycyclic aromatic hydrocarbon on physiological metabolisms of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture 265: 343–350.

Jin Y., Liu Z., Peng T., Fu Z., 2015. The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: A survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. Fish and Shellfish Immunology 43: 405-414.

Johnson L.L., Landahl J.T., Kubin L.A., Horness B.H., Myers M.S., Collier T.K., Stein J.E., 1998. Assessing the effects of anthropogenic stressors on Puget Sound flatfish populations. Journal of Sea Research 39: 125-137.

Jonker M.T.O., Koelmans A.A., 2002. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls to soot and soot-like materials in the aqueous environment: Mechanistic considerations. Environmental Science and Technology 36: 3725-3734.

Jouini Z., Ben Charrada R., Moussa M., 2005. Caractéristiques du Lac Sud de Tunis après sa restauration. Marine Life 15: 3-11.

Kamel N., 2014. Effets combinés des facteurs environnementaux et des polluants chimiques chez la moule *Mytilus galloprovincialis* : Harmonisation des biomarqueurs d'exposition suivant les recommandations OSPAR et MEDPOL. Thèse de doctorat en cotutelle. Université de Monastir-Université de Nantes. p. 190.

Kamel N., Attig H., Dagnino A., Boussetta H., Banni M., 2012. Increased temperatures affect oxidative stress markers and detoxification response to benzo [a] pyrene exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 63: 534-543.

Kamel N., Burgeot T., Banni M., Chalghaf M., Devin S., Minier C., Boussetta H., 2014. Effects of increasing temperatures on biomarker responses and accumulation of hazardous substances in rope mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Bizerte lagoon. Environmental Science and Pollution Research 21: 6108-6123.

Kappus H., 1991. Lipid Peroxidation: mechanism and biological relevance. In: Aruoma O.I., Halliwell B., (Eds.), Free Radicals and Food Additives. Taylor and Francis, London. pp. 59-75.

Katkansky S.C., Sparks A.K., 1966. Seasonal sexual pattern in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Washington State. Fisheries Ressources 2: 80-89.

Kehrer J.P., 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical Reviews in Toxicology 23: 21-48.

Keith L.H., Telliard W.A., 1979. Priority pollutants: I - A perspective view. Environmental Science & Technology 13: 416-423.

Kennedy V.S., Newell R.I.E., Eble A.F., 1996. The Eastern oyster *Crassostrea virginica*. University of Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland.

Khan R.A., 1995. Histopathology in Winter Flounder, *Pleuronectes americanus*, following chronic exposure to crude oil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 54: 297-301.

Khan M.A.Q., Coello W., Khan A.A., Pinto H., 1972. Some characteristics of the microsomal mixedfunction oxidase in the freshwater crayfish, Cambarus. Life Science 11: 405-415.

Khedir-Ghenim Z., Zrafi-Nouira I., Bahri R., Belayouni H., Hammami M., Rouabhia M., Saidane-Mosbahi D., 2009. Identification and distribution of petroleum hydrocarbons in sediments, seawater and Ruditapes decussatus collected from a Mediterranean Sea site. International Journal of Water 5: 35-50.

Kim K.H., Jahan S.A., Kabir E., Brown R.J.C., 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. Environment international 60: 71-80.

Kisseljova N.P., Kisseljov F.L., 2005. DNA demethylation and carcinogenesis. Biochemistry (Moscow) 70: 743–752.

Knoppers B., 1994. Aquatic primary production in coastal lagoons. In: Kjervfe B (Ed.) Coastal Lagoon Processes. Elseviers, Amsterdam, pp. 243-275.

Knopper L.D., Mineau P., 2004. Organismal effects of pesticide exposure on meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) living in golf course ecosystems: developmental instability, clinical hematology, body condition, and blood parasitology. Environmental Toxicology and Chemistry 23: 1512–1519.

Kraaij R., Ciarelli S., Tolls J., Kater B.J., Belfroid A., 2001. Bioavailability of lab-contaminated and native polycyclic aromatic hydrocarbons to the amphipod *Corophium volutator* relates to chemical desorption. Environmental Toxicology and Chemistry 20: 1716-1724.

Krishnakumar P.K., Casillas E., Varanasi U., 1995. Effects of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washing, USA. II: Cytochemical detection of sub-cellular changes in the digestive cells. Marine Biology 124: 251–259.

Kucuksezgin F., Kontas A., Altay O., Uluturhan E., Darilmaz E., 2006. Assessment of marine pollution in Izmir Bay: nutrient, heavy metal and total hydrocarbon concentrations. Environment International 32: 41-51.

Labrot F.R.D., Tisnerat G., Cabridenc R., Narbonne J.F., 1996. Le plomb dans l'environnement: sources, mécanismes de transfert et effets biologiques. In: Aspects analytiques du plomb dans l'environnement, Lavoisier Tec & Doc éditions. pp. 3-15.

Lacaze J.C., 1980. La pollution pétrolière en milieu marin. Masson, Paris. p. 118.

Lackner R., 1998. Oxidative stress in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck T., Hinton D.E., Streit B., (Eds). Fish Ecotoxicology. Birkhauser, Basel. pp. 203-224.

Lacroix C., Coquillé V., Guyomarch J., Auffret M., Moraga D., 2014. A selection of reference genes and early-warning mRNA biomarkers for environmental monitoring using *Mytilus spp*. as sentinel species. Marine pollution bulletin 86: 304-313.

Ladhar-Chaabouni R., Smaoui-Damak W., Hamza-Chaffai A., 2009. In vivo variation of some biomarkers with time and cadmium concentration in the cockle *Cerastoderma glaucum*. Marine biology research 5: 487-495.

Lafaurie M., Narbonne J.F., Galgani F., 1992. Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement. Analysis Magazine 20: 28-33.

Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : Principes et définitions. In : Lagadic, L., Caquet, Th., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds). Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Masson, Paris. pp. 1-9.

Langston W.J., 1990. Toxic effects of metals and the incidence of metal pollution in marine pollution in marine ecosystems. In: R.W. Furness, P.S. Rainbow (Eds.), Heavy Metals in the Marine Environment. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 101-123.

Laruelle F., 1999. Phénologie et déterminisme de la reproduction chez *Ruditapes decussatus* (L.) et *R. philippinarum* (Adams et Reeves) en Bretagne. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest. p. 230.

Lauret M., Oheix J., Derolez V., Laugier T., 2011. Guide de reconnaissance et de suivi des macrophytes des lagunes du Languedoc-Roussillon. Réseau de Suivi Lagunaire (Ifremer, Cépralmar, Agence de l'Eau RM&C, Région Languedoc-Roussillon). p. 148. http://archimer.ifremer.fr/doc/00043/15416.

Le Dû-Lacoste M., 2008. Etude des phénomènes de biotransformation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons). Relation exposition - génotoxicite. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux 1. p. 377.

Lee R.F., 2003. Photo-oxidation and Photo-toxicity of Crude and Refined Oils. Spill Science and Technology Bulletin 8: 157-162.

Lemaire P., Livingstone D.R., 1993. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flonder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. Comparative Biochemistry and Physiology 1: 1119-1150.

Lemaire-Gony S., Lemaire P., Pulsford A.L., 1995. Effects of cadmium and benzo (a) pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. Aquatic Toxicology 31: 297-313.

Le Pennec M., Barillé L. Grizel H., 2003. The gills. In: Grizel H., (Ed.), An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. Ifremer, Plouzané, France. p. 201.

Lesven L., 2008. Devenir des Eléments Traces Métalliques au Sein du Sédiment, un Compartiment Clé de l'Environnement Aquatique. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille. p. 179.

Le Treut Y., 1986. La palourde. Anatomie - Biologie - Elevage - Pêche - Consommation –Inspection sanitaire. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire, Université de Nantes. p. 162.

Li Q., Zhao X., Kong L., Yu H., 2013. Transcriptomic response to stress in marine bivalves. Invertebrate Survival Journal 10: 84-93.

Lima I., Moreira S.M., Osten J.R.V., Soares A.M.V.M., Guilhermino L., 2007. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the north-western coast of Portugal. Chemosphere 66: 1230-1242.

Literathy P., 1993. Considerations for the assessment of environmental consequences of the 1991 Gulf War. Marine Pollution Bulletin 27: 349-356.

Liu H.H., He J.Y., Chi C.F., Shao J., 2014. Differential HSP70 expression in *Mytilus coruscus* under various stressors. Gene 543: 166–173.

Liu D., Pan L., Cai Y., Li Z., Miao J., 2014. Response of detoxification gene mRNA expression and selection of molecular biomarkers in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo [a] pyrene. Environmental Pollution 189: 1-8.

Liu T., Pan L., Jin Q., Cai Y., 2015. Differential gene expression analysis of benzo (a) pyrene toxicity in the clam, *Ruditapes philippinarum*. Ecotoxicology and environmental safety 115: 126-136.

Liu N., Pan L., Miao J., Xu C., Zhan L., 2010. Molecular cloning and sequence analysis and the response of a aryl hydrocarbon receptor homologue gene in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo (a) pyrene. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 152: 279-287.

Liu J., Qu W., Kadiiska M.B., 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. Toxicology and Applied Pharmacology 238: 209–214.

Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25: 402-408.

Livingstone D.R., 1988. Responses of microsomal NADPH-cytochrome reductase activity and cytochrome P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants. Marine Ecology Progress Series 46: 37-43.

Livingstone D.R., 1989. Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. Xenobiotica 1041-1062.

Livingstone D.R., 1990. Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in invertebrates. Biochemical Society Transactions 18: 15-19.

Livingstone D.R., 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. Advances in Comparative and Environmental Physiology 7: 46-185.

Livingstone D.R., 1993, Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 57: 195-211.

Livingstone D.R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 120: 43-49.

Livingstone D.R., Lips F., Garcia Martinez P., Pipe R.K., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. Marine Biology 112: 265-276.

Liziard S., 2013. Littoralisation de la façade nord-méditerranéenne: Analyse spatiale et prospective dans le contexte du Changement Climatique. Thèse de Doctorat en Géographie et Aménagement, Université de Nice-Sophia Antipolis. p. 390.

Lopes P.A., Pinheiro T., Santos M.C., Da Luz Mathias M., Collares-Pereira M.J., Viegas-Crespo A.M., 2001. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. The Science of the Total Environment 280: 153-63.

Lopez-Barea J., 1995. Biomarkers in Ecotoxicology : an overview. In: Degen G.H., Seiler J.P., Bentley P. (Eds.), Toxicology in Transition: Proceedings of the 1994 EUROTOX Congress Meeting Held in Basel Switzerland, August 21-24, 1994, Springer Berlin Heidelberg. pp. 57-79.

Louiz I., Kinani S., Gouze M.E., Ben-Attia M., Menif D., Bouchonnet S., Porcher J.M., Ben-Hassine O.k., Ait-Aissa S., 2008. Monitoring of dioxin-like, estrogenic anti-androgenic activities in sediments of Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: contribution of low concentration of polynuclear aromatic hydrocarbons. Science of the Total Environment 402: 318-329.

Lu K.P., Hallberg L.M., Tomlinson J., Ramos K.S., 2000. Benzo(a)pyrene activates L1Md retrotransposon and inhibits DNA repair in vascular smooth muscle cells. Mutation Research 454: 35-44.

Luoma S.N., Rainbow P.S., 2008. Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 93-123.

Maanan M., 2008. Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region. Environmental Pollution 153: 176-183.

Maest A.S., Crerar D.A., Stallard R.F., Ryan J.N., 1990. Metal and nutrient behavior in the Raritan estuary, New Jersey, U.S.A.: The effect of multiple freshwater and industrial waste inputs. Chemical Geology 81: 133–149.

Maître-Allain T., 1983. Croissance de deux espèces de palourdes dans l'étang de Thau (Herault, France) en fonction des facteurs hydrologiques. Rapp. Comm. Intern. de la Mer Med. 28 : 165-166.

Malatesta F., Antonini G., Sarti P., Brunori M., 1995. Structure and function of a molecular machine: cytochrome c oxidase. Biophysical Chemistry 54: 1-33.

Mallatt J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 42: 630-648.

Manelis R., Hornung H., Fishelson L., Yawetz A., 1993. The effects of exposure to heavy metal ions cytochrome B5 and components of the mixed function oxidases from the digestive gland microsomes of the mollusc *Monodonta turbinata*. Water Science and Technology 27: 473–480.

Marchand M., Kantin R., 1997. Contaminants chimiques en milieux aquatiques, 3ème partie : Présentation de quelques exemples caractéristiques. Océanis 23: 517-695.

Maria V.L., Bebianno M.J., 2011. Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo (a) pyrene and copper. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 154: 56-63.

Marigómez I., Soto M., Cajaraville M.P., Angulo E., Giamberini L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. Microscopy Research and Technique 56: 358-392.

Marnett L.J., 2000. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis 21: 361-370.

Marquez V.B.F., 2011. ABC multidrug transporters: target for modulation of drug pharmacokinetics and drug-drug interactions. Current Drug Targets 12: 600-620.

Martin D.J., Rainbow P.S., 1998a. Haemocyanin and the binding of cadmium and zinc in the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). Science of the Total Environment 214: 133-152.

Martin, D.J., Rainbow, P.S., 1998b. The kinetics of zinc and cadmium in the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). Aquatic Toxicology 40: 203-231.

Martín-Díaz M.L., Blasco J., González de Canales M., Sales D., DelValls T.A., 2005. Bioaccumulation and toxicity of dissolved heavy metals from the Guadalquivir Estuary after the Aznalcóllar mining spill using *Ruditapes philippinarum*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 48: 233-241.

Martín-Díaz M.L., Jiménez-Tenorio N., Sales D., Delvalls T.A., 2008. Accumulation and histopathological damage in the clam *Ruditapes philippinarum* and the crab *Carcinus maenas* to assess sediment toxicity in Spanish ports. Chemosphere 71: 1916-1927.

Martinez P.G., Livingstone D.R., 1995. Benzo(a)pyrene dione stimulated oxyradical production by microsomes of digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. Marine Environment Research 39: 185-189.

Mathieu M., Lubet P., 1993. Storage tissues metabolism and reproduction in marine bivalves. A brief review. Invertebrate Reproduction and Development 23: 123–129.

Matozzo V., Binelli A., Parolini M., Locatello L., Marin M.G., 2010. Biomarker responses and contamination levels in the clam *Ruditapes philippinarum* for biomonitoring the Lagoon of Venice (Italy). Journal of Environmental Monitoring 12: 776-786.

Matozzo V., Binelli A., Parolini M., Previato M., Masiero L., Finos L., Bressan M., Marin M.G., 2012. Biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* and contamination levels in sediments from seaward and landward sites in the Lagoon of Venice. Ecological Indicators 19: 191-205.

Matsumoto T., Nakamura A.M., Mori K., Kayano T., 2003. Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Zoological Science 20: 37–42.

Mason R.P., 2013. Trace metals and organisms: Essential and toxic metals, organometallics, microbial processes, and metal bioaccumulation. In: Mason, R.P. (Ed.), Trace Metals in Aquatic Systems. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. pp. 370-421.

Mason A.Z., Jenkins K.D., 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. In: Tessier A. and Turner D.R. (Eds.), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley and Sons, New York. pp. 479-608.

McElroy A.E., Farrington J.W., Teal J.M., Varanasi U., 1989. Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment, Boca Raton: CRC Press. pp. 1-40.

Mcloughlin J., 1986. Guide pour l'exploration et l'exploitation des ressources de pétrole et de gaz naturel du fond marin méditerranéen. UNEP, IG. 74, Inf. 5: 4-9.

Medeiros I.D., Siebert M.N., Toledo-Silva G., Rodrigues T.B., Marques M.R., Bainy A.C., 2008. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. Environmental toxicology and pharmacology 26: 362-365.

Medhioub M.N., 1993. Situation actuelle de la pêche de la palourde *Tapes decussatus* en Tunisie. Acte des 1ères journées tunisiennes des sciences de la mer, Kerkennah. pp. 69-70.

Miao J., Pan L., Liu N., Xu C., Zhang L., 2011. Molecular cloning of CYP4 and GSTpi homologues in the scallop *Chlamys farreri* and its expression in response to benzo [a] pyrene exposure. Marine genomics 4: 99-108.

Michel C., 2011. Biomarqueurs de génotoxicité chez *Dreissena polymorpha*: indicateurs de la pression chimique urbaine et variabilité naturelle des lésions de l'ADN. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. p. 192.

Michel X.R., Beasse C., Narbonne J.F., 1995. In vivo metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 28: 215–222.

Michel X.R., Salaun J.P., Galgani F., Narbonne J.F., 1994. Benzo[a]pyrene hydroxylase activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* a potentiel marker of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbon-type compounds. Marine Environment Research 38: 257-273.

Michel X.R., Suteau P., Robertson L.W., Narbonne J.F., 1993. Effects of benzo(a)pyrene, 3,3%, 4,4%-tetrachlorobiphenyl and 2,2%, 4, 4%, 5,5%-hexachlorobiphenyl on the xenobiotic-metabolizing enzymes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). Aquatic Toxicology 27: 335-344.

Mille G., Asia L., Guiliano M., Malleret L., Doumenq P., 2007. Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediterranean Sea (Gulf of Fos area, France). Marine Pollution Bulletin 54: 566-575.

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16: 1215.

Montes-Nieto R., Fuentes-Almagro C.A., Bonilla-Valverde D., Prieto-Álamo M.J., Jurado J., Carrascal M., Gómez-Ariza J.L., López-Barea J., Pueyo C., 2007. Proteomics in free-living *Mus spretus* to monitor terrestrial ecosystems. Proteomics 7: 4376-4387.

Montes-Nieto R., García-Barrera T., Gómez-Ariza J.L., López-Barea J., 2010. Environmental monitoring of Domingo Rubio stream (Huelva Estuary, SW Spain) by combining conventional biomarkers and proteomic analysis in *Carcinus maenas*. Environmental pollution 158: 401-408.

Mora P., Fournier D., Narbonne J.F., 1999. Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Muller). Comparative Biochemistry and Physiology Part C 122: 353-361.

Morales-Caselles C., Martín-Díaz M.L., Riba I., Sarasquete C., Del Valls T.Á., 2008. Sublethal responses in caged organisms exposed to sediments affected by oil spills. Chemosphere 72: 819-825.

Moreira S.M., Moreira-Santos M., Ribeiro R., Guilhermino L., 2004. The Coral Bulker fuel oil spill on the North Coast of Portugal: spatial and temporal biomarker responses in *Mytilus galloprovincialis*. Ecotoxicology 13: 619–630.

Morton B.S., 1983. Feeding and digestion in Bivalvia. In: Wilbur, A.S.a.K. (Ed.). The Mollusca. Academic Press, New York. p. 64.

Morton B., 1987. The functional morphology of the organs of the mantle cavity of *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Mytilacea). American Malacological Bulletin 5: 159-64.

Munari M., Marin M.G., Matozzo V., 2014. Effects of the antidepressant fluoxetine on the immune parameters and acetylcholinesterase activity of the clam *Venerupis philippinarum*. Marine Environment Research 94: 32-37.

Myers M.S., Johnson L.L., Hom T., Collier T.K., Stein J.E., Varanasi U., 1998. Toxicopathic lesions in subadult English sole (*Pleuronectes vetulus*) from Puget Sound, Washington, USA: relationships with other biomarkers of contaminant exposure. Marine Environmental Research 45: 47-67.

Narbonne J.F., 1991. Mécanismes de biotransformation des polluants organiques chez les animaux marins. Océanis 17: 449-458.

Narbonne J.f., Aarab N., Clerandeau G., Daubeze M., Narbonne J., Champeau O., Garrigues P., 2005. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends. Biomarkers 10: 58-71.

Narbonne J.F., Daubeze M., Clerandeau C., Garrigues P., 1999. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. Biomarkers 4: 415-424.

Narbonne J.F., Garrigues P., Ribera D., Raoux C., Mathieu A., Lemaire P., Salaun J.P., Lafaurie M., 1991. Mixed function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: Field studies on the French coast of the Mediterranean Sea. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 100: 37-42.

Nasci C., Ros L., Campesan G., Vleet E.S., Salizzato M., Sperni L., Pavoni B., 1999. Clam transplantation and stress-related biomarkers as useful tools for assessing water quality in coastal environments. Marine Pollution Bulletin 39: 255–260.

National Research Council, 1985. Oil in the sea: inputs, fates and effects. National Academic Press. Washington, D.C., p. 601.

Nebert D.W., Nelson D.R., 1991. P450 nomenclature based on evolution. Methods in Enzymology 206: 3-11.

Neff J.M., 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment - Sources, Fates and Biological Effects. Applied Science Publishers Ltd., Essex, England, p. 262.

Neff J.M., 1985. Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Rand G.M., Petrocelli S.R. (eds), Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA. pp. 416-454.

Neff J.M., Hillman R.E., Carr R.S., Buhl R.L., Lahey J.I., 1987. Histopathological and biochemical responses in Arctic marine bivalve molluscs exposed to experimentally spilled oil. Arctic 40: 220–229.

Newbold R.F., Brookes P., 1976. Exceptional mutagenicity of benzo(a)pyrene diol epoxid in cultured mammalian cells. Nature 261: 52–54.

Nicholas M., Allen G.P., 1981. Sedimentary process in coastal lagoons. In: Coastal lagoon research present and future, UNESCO., Technologie Marine Sciences, 33: 27-80.

Nicholson S., 2003. Cardiac and branchial physiology associated with copper accumulation and detoxication in the mytilid mussel *Perna viridis* (L.). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 295: 157–171.

Nicholsona S., Lamb P.K.S., 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). Environment International 31: 121–132.

Nikinmaa M., Rytkönen K.T., 2011. Functional genomics in aquatic toxicology-do not forget the function. Aquatic Toxicology 105: 16-24.

Nikinmaa M., Rytkönen K.T., 2012. From genomes to functions in aquatic biology. Marine Genomics 5: 1-6.

Nixon S.W., 1981. Remineralization and nutrients cycling in coastal marine ecosystem. Estuaries and nutrients, (B.J. Neilson and E. Cronim, Editors), Humana Press. pp. 1111-1138.

Niyogi S., Biswas S., Sarker S., Datta A.G., 2001. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. Marine Environmental Research 52: 13-26.

Notar M., Leskovsek H., Faganeli J., 2001. Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. Marine Pollution Bulletin 42: 36-44.

Normand J., 2009. Déterminismes génétiques de l'allocation à la reproduction chez les huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) triploïdes. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle. p. 232.

Nyland J.F., Fairweather D., Shirley D.L., Davis S.E., Rose N.R., Silbergeld E.K., 2012. Low-dose inorganic mercury increases severity and frequency of chronic coxsackievirus-induced autoimmune myocarditis in mice. Toxicological Sciences 125: 134-143.

Okay O.S., Donkin P., Peters L.D., Livingstone D.R., 2000. The role of algae (I*sochrysis galbana*) enrichment on the bioaccumulation of benzo [a] pyrene and its effects on the blue mussel *Mytilus edulis.* Environmental Pollution 110: 103-113.

Okay O.S., Tolun L., Telli-Karakoç F., Tüfekçi V., Tüfekçi H., Olgun A., Morkoç E., 2003. The changes of T-PAH levels and health status of mussels in Izmit bay (Turkey) after Marmara earthquake and subsequent refinery fire. Environment international. 28: 671-675.

Oliveira M., Serafim A., Bebianno M.J., Pacheco M., Santos M.A., 2008. European eel (*Anguilla anguilla* L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure. Sciences of The Total Environment 70: 20–26.

Oliver B.L.M., Fisher W.S., 1999. Appraisal of prospective bivalve immunomarkers. Biomarkers 4: 510-530.

Oliver B.L.M., Fisher W.S., Winstead J.T., Hemmer B.L., Long E.R., 2001. Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. Aquatic Toxicology 55: 203-222.

OMI/PNUE, 2002. Système Régional d'Information; Partie D, Guides Opérationnels et Documents Techniques, Fascicule 1: Guide pour la lutte contre la pollution marine accidentelle en Méditerranée, Guide du REMPEC (première version publié en juillet 1985).

Ono H., Ozaki K., Yoshikawa H., 2005. Identification of cytochrome P450 and glutathione-S-transferase genes preferentially expressed in chemosensory organs of the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus L.* Insect biochemistry and molecular biology 35: 837-846.

OPECST (Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques), 2011. La pollution de la Méditerranée : état et perspectives à l'horizon 2030. Rapport n° 652. p. 188.

Orieux N., Cambier S., Gonzalez P., Morin B., Adam C., Garnier-Laplace J., Bourdineaud J.P., 2011. Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). Ecotoxicology and Environmental Safety 74: 974-983.

Osborne M.R., Jacobs S., Harvery R.G., Brookes P., 1981. Minor products from the reaction of (C) and (-) benzo[a]pyreneanti-diol epoxide with DNA. Carcinogenesis 2: 553-558.

Palanikumar L., Kumaraguru A.K., Ramakritinan C.M., Anand M., 2012. Biochemical response of anthracene and benzo [a] pyrene in milkfish *Chanos chanos*. Ecotoxicology and Environmental Safety 75: 187-197.

Pamplona R., Costantini D., 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 301, R843-R863.

Pan L., Liu N., Xu C., Miao J., 2011. Identification of a novel P450 gene belonging to the CYP4 family in the clam Ruditapes philippinarum, and analysis of basal-and benzo (a) pyrene-induced mRNA expression levels in selected tissues. Environmental toxicology and pharmacology 32: 390-398.

Pan, L.Q., Liu, N., Wang, J., 2012. Study of biomarkers selection of the scallop *Chlamys farreri* exposed to B[a]P. Acta Hydrobiol. Sin. 36, 299–306.

Pan L.Q., Ren J., Liu J., 2006. Responses of antioxidant systems and LPO level to benzo (a) pyrene and benzo (k) fluoranthene in the haemolymph of the scallop *Chlamys ferrari*. Environmental Pollution 141: 443-451.

Pan K., Wang W.X., 2012. Trace metal contamination in estuarine and coastal environments in China. Science of the Total Environment 421-422: 3-16.

Papo M.B., Maccatrozzo L., Bertotto D., Pascoli F., Negrato E., Poltronieri C Binato G., Gallina A., Radaelli G., 2014. Expression of CYP4 and GSTr genes in *Venerupis philippinarum* exposed to benzo (a) pyrene. Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger 196 : 241-246.

Parant M., 1998. Le métabolisme des xénobiotiques chez les bivalves. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie 321: 485-494.

Park K.I., Choi K.S., 2004. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for studying of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): I. Quantifying eggs. Aquaculture 241: 667-687.

Parlanti E., 1990. Utilisation des hydrocarbures comme traceurs d'origine et d'évolution de la matière organique sédimentaire en milieu marin. Etude du Golfe du Lion et du Golfe de Gascogne. Thèse en Sciences, Université de Bordeaux 1. p. 289.

Pauley G.B., Van Der Raay B., Troutt D., 1988. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest) - Pacific oyster. United States Fish and Wildlife Service. Biological Report 82: 1-28.

Paul-Pont I., 2010. Sensibilité et adaptation de populations de bivalves marins soumis à des stress multiples: infestation parasitaire, contamination microbienne et pollution métallique. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux 1. p. 339.

Paul-Pont I., Gonzalez P., Baudrimont M., Nili H., de Montaudouin, X., 2010. Short-term metallothionein inductions in the edible cockle *Cerastoderma edule* after cadmium or mercury exposure: discrepancy between mRNA and protein responses. Aquatic Toxicology 97: 260-267.

Pedrajas J.R., Lopez-Barea J., Peinado J., 1996. Dieldrin induces peroxisomal enzymes in fish *Sparus aurata* liver. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 115: 125-131.

Pellerin-Massicotte J., 1997. Influence of elevated temperature and air exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). Journal de Recherche Océanographique 22: 91– 98.

Peňa-Llopis S., Dolores Frrando M., Pena J.B., 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. Aquatic Toxicology 65: 337-360.

Pérez-Lopez M., Novoa-Valinas M.C., Melgar-Riol M.J., 2002. Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. Toxicological Letters 136: 97-106.

Pérez-Ruzafa A., Marcos C., 2012. Fisheries in coastal lagoons: An assumed but poorly researched aspect of the ecology and functioning of coastal lagoons. Estuarine, Coastal and Shelf Science 110: 15-31.

Perrière-Rumèbe M., 2012. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Année 2012. Rapport Ifremer, Arcachon. p. 63.

Peters L.D., Nasci C., Livingstone D.R., 1998. Immunochemical investigations of cytochrome P450 forms/epitopes (CYP1A, 2B, 2E, 3A and 4A) in digestive gland of *Mytilus sp.* Comparative Biochemistry and Physiology Part C 121: 361-369.

Phillips D.J.H., 1986. Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: Program design imperatives. Marine Pollution Bulletin 17: 10-17.

Pipe R.K., Coles J.A., 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. Fish & Shellfish Immunology 5: 581-595.

Pizon F.X., 2005. Evolution des risques de pollution par les hydrocarbures depuis les naufrages de l'Erika et de Prestige. Communication présentée à Hyères le 11 mars 2005 au 4ème forum Méditerranéen des risques pétroliers (http://www.afcan.org/interventions1.html).

Plan Bleu, 2010. Les transports maritimes de marchandises en Méditerranée : perspectives 2025. Plan Bleu, Valbonne (Les Cahiers du Plan Bleu 7), p. 60.

PNUE/PAM, 2012: Etat de l'environnement marin et côtier de la Méditerranée, PNUE/PAM - Convention de Barcelone, Athènes, p. 96.

PNUE/PAM-Plan Bleu, 2009. Etat de l'environnement et du développement en Méditerranée. PNUE/PAM-Plan Bleu, Athènes, p. 204.

Podechard N., Lecureur V., Le Ferrec E., Guenon I., Sparfel L., Gilot D., Gordon J.R., Lagente V., Fardel O., 2008. Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo (a) pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. Toxicology Letters 177: 130-137.

Ponurovsky S.K., Yakovlev Y.M., 1992. The reproductive biology of the japanese littleneck, *Tapes phillipinarum* (Adams and Reeve, 1850) (Bivalvia: Veneridae). Journal of Shellfish Research 11: 265-277.

Poppe G.T., Goto Y., 1991. European Seashells. Volume I (Polyplacophora, Caudofoveata, Solenogastra, Gastropoda). Hemmen V.C., (Ed.), Germany, Wiesbaden. p. 352.

Porte C., Solé M., Albaigés J., Livingstone D.R., 1991. Response of mixed-function oxygenase and antioxidase enzyme system of *Mytilus sp*. to organic pollution. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 100: 183–186.

Porte C., Solé P., Borghi V., Martinez M., Chamorro J., Torreblanca A., Ortiz M., Orbea A., Soto M., Cajarville M.P., 2001. Chemical, biochemical and cellular responses in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Spanish Mediterranean coast. Biomarkers 6: 335–350.

Porter J.S., Dyrynda P.E.J., Ryland J.S., Carvalho G.R., 2001. Morphological and genetic adaptation to a lagoon environment: a case study in the bryozoan genus *Alcyonidium*. Marine Biology 139: 575-585.

Poutiers J.M., 1987. Bivalves. In: Fisher W., Schneider M., Bauchaud M.L., (Eds.), Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pèche: Méditerranée et mer noire. (1) Végétaux et invertébrés. FAO, Rome. pp. 371-512.

Power A., Sheehan D., 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 114: 99-103.

Prapanthadara L.A., Koottathep S., Promtet N., Hemingway J., Ketterman A.J., 1996. Purification and characterization of a major glutathione S-transferase from the mosquito *Anopheles dirus* (species B). Insect Biochemistry and Molecular Biology 26: 277-285.

Prein A.E., Thie G.M., Alink G.M., Koeman J.H., Poels C.L., 1978. Cytogenetic changes in fish exposed to water of the river Rhine. Science of the Total Environment 9: 287-291.

Pruski A.M., Dixon D.R., 2002. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis L*. Aquatic Toxicology 57: 127–137.

Pulido M.D., Parrish A.R., 2003. Metal-induced apoptosis: Mechanisms. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 533: 227–241.

Qi X.M., Li P.J., Liu W., Xie L.J., 2006. Multiple biomarkers response in maize (*Zea mays L*.) during exposure to copper. Journal of Environmental Sciences-China 18: 1182–1188.

Rainbow P.S., 1997. Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. Estuarine, Coastal and Shelf Science 44:169–175.

Ramade F., 1979. Ecotoxicologie. Masson édition. p. 228.

Randerath K., Randerath E., Zhou G.D., Supunpong N., He L.Y., McDonald T.J., Donnelly K.C., 1999. Genotoxicity of complex PAH mixtures recovered from contaminated lake sediments as assessed by three different methods. Environmental and Molecular Mutagenesis. 33: 303-312.

Regoli F., Frenzilli G., Bocchetti R., Annarumma F., Scarcelli V., Fattorini D., Nigro M., 2004. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. Aquatic Toxicology 68: 167–178.

Regoli F., Giuliani, M.E., 2013. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. Marine Environmental Research 93: 106-117.

Reina C.P., Nabet B.Y., Young P.D., Pittman R.N., 2012. Basal and stress-induced Hsp70 are modulated by ataxin-3. Cell Stress & Chaperones 17: 729-742.

Rejomon G., Nair M., Joseph T., 2010. Trace metal dynamics in fishes from the southwest coast of India. Environmental Monitoring and Assessment 167: 243-255.

Rether B., Masfaraud J.F., Keith G., Devaux A., Monod G., 1997. Biomarqueurs de génotoxicité chez les végétaux et les animaux. In: Lagadic L., Caquet Th., Amiard J.C., Ramade F., (Eds), Biomarqueurs en écotoxicologie: aspects fondamentaux. Masson, Paris. pp. 185-208.

Rewitz K.F., Kjellerup C., Jørgensen A., Peterse C., Andersen O., 2004. Identification of two *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) cytochromes P450 and induction by xenobiotics. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 138: 89-96.

Reynders H., Van der Ven K., Moens L.N., Van Remortel P., De Coen W.M., Blust R., 2006. Patterns of gene expression in carp liver after exposure to a mixture of waterborne and dietary cadmium using a custom-made microarray. Aquatic Toxicology 80: 180-193.

Reynaud S., Deschaux P., 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. Aquatic Toxicology 77: 229-238.

Rezgui A., Ben Maiz N., Moussa M., 2008. Fonctionnement hydrodynamique et écologique du Lac Nord de Tunis par modélisation numérique. Revue des sciences de l'eau 21: 349-361. http://id.erudit.org/iderudit/018781ar.

Riba I., González de Canales M., Forja J.M., DelValls T.A., 2004. Sediment quality in the Guadalquivir estuary: sublethal effects associated with the Aznalcóllar mining spill. Marine Pollution Bulletin 48: 153-163.

Ricciardi F., Matozzo V., Binelli A., Marin M.G., 2010. Biomarker responses and contamination levels in crabs (*Carcinus aestuarii*) from the Lagoon of Venice: An integrated approach in biomonitoring estuarine environments. Water Research, 44: 1725-1736.

Rice C.A., Myers M. S., Willis M.L., French B.L., Casillas E., 2000. From sediment bioassay to fish biomarker-connecting the dots using simple trophic relationships. Marine Environmental Research 50: 527-533.

Roberts S., Gueguen, Y., de Lorgeril J., Goetz F., 2008. Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure. Developmental & Comparative Immunology 32: 1099–1104.

Robinson W.E., Ryan D.K., Sullivan P.A., Boggs C.C., 1997. Cadmium binding in the blood plasma of two marine bivalves. Environmental Toxicology and Chemistry 16: 1195-1202.

Roesijadi G., Bogumil R., Vasak M., Kagi J.H., 1998. Modulation of DNA binding of a tramtrack zinc-finger peptide by the metallothionein-thionein conjugate pair. Journal of Biological Chemistry 28:17425-17432.

Roesijadi G., Robinson W., 1994. Metal regulation in auqatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. In: MD and OG Lewis Publishers, B.R. (Ed.). Aquatic toxicology: molecular, biochemical and cellular perspectives. pp. 387-420.

Rodriguez-Ariza A., Martinez-Lara E., Pascual P., Pedrajas J.R., Abril N., Dorado G., Toribio F., Barcena J.A., Peinado J., Pueyo C., 1993. Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. The Science of the Total Environmental 1: 109-116.

Rodríguez-Ortega M.J., Alhama J., Funes V., Romero-Ruíz A., Rodríguez-Ariza A., López-Barea J., 2002. Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from South-Spanish Littoral. Environmental Toxicology and Chemistry 21: 542-9.

Rouvier E., Luciani M.F., Mattei M.G., Denizot F., Golstein P., 1993. Ctla-8, cloned from an activated T-cell, bearing Au-rich messenger-RNA instability sequences, and homologous to a Herpesvirus Saimiri gene. Journal of Immunology 150: 5445-5456.

Ruesink J.L., Lenihan H.S., Trimble A.C., Heiman K.W., Micheli F., Byers J.E., Kay M.C., 2005. Introduction of non-native oysters: ecosystem effects and restoration implications. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 36: 643-89.

Saha M., Sarkar S.K., Bhattacharya B., 2006. Interspecific variation in heavy metal body concentrations in biota of Sunderban mangrove wetland, northeast India. Environment International 32: 203-207.

Saravana Bhavan P., Geraldine P., 2000. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. Aquatic Toxicology 50: 331-339.

Sarkadi B., Homolya L., Szakacs G., Varadi A., 2006. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. Physiological Reviews 86: 1179-1236.

Sauer T.C., Brown J.S., Boehm P.D., Aurand D.V., Michel J. et Hayes M.O., 1993. Hydrocarbon source identification and weathering characterization of intertida and subtidal sediments along the Saudi Arabian coast after the Gulf War oil spill. Marine Pollution Bulletin. 27: 117-134.

Savva D., 1996. DNA fingerprinting as a biomarker assay in ecotoxicology. Toxicology and Ecotoxicology News 3: 110-114.

Shatkin G., Shumway S.E., Hawes R., 1997. Considerations regarding the possible introduction of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to the Gulf of Maine: A review of global experience. Journal of Shellfish Research 16: 463-477.

Shi D., Wang W.X., 2004. Understanding the Differences in Cd and Zn Bioaccumulation and Subcellular Storage among Different Populations of Marine Clams. Environmental Science and Technology 38: 449-456.

Shili A., Trabelsi E.B., Ben Maïz N., 2002. Seasonal dynamics of macro-algae in the South Lake of Tunis. Journal of Coastal Conservation 8: 127-134.

Shin P.K.S., Yau F.N., Chow S.H., Tai K.K., Cheung S.G., 2002. Responses of the green-lipped mussel *Perna viridis* (L.) to suspended solids. Marine Pollution Bulletin 45:157-162.

Shugart, L.R., 2000. DNA damage as a biomarker of exposure. Ecotoxicology 9: 329-340.

Singh K.P., Roy D., 2001. Identification of novel breast tumor-specific mutation(s) in the q11.2 region of chromosome 17 by RAPD/AP-PCR fingerprinting. Gene 269: 33-43.

Singer S.C., Lee R.F., 1977. Mixed-function oxygenase activity in blue crab Callinectes sapidus: tissue distribution and correlation with changes during molting and development. Biological Bulletin 153: 377-386.

Singer S.C., March P.E., Gonsoulin F., Lee R.F., 1980. Mixed function oxygenase activity in the blue crab, *Callinectes sapidus*: characterization of enzyme activity froom stomach tissue. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 65: 129-134.

Smith A.P., DeRidder B.P., Guo W.J., Seeley E.H., Regnier F.E., Goldsbrough P.B., 2004. Proteomic analysis of Aradopsis Glutathione S-transferase from Benxacor-and Copper-treated seedlings. The Journal of Biological Chemistry 279: 26098-26104.

Snape J.R., Maund S.J., Pickford D.B., Hutchinson T.H., 2004. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. Aquatic Toxicology 67: 143-154.

Sobral P., Widdows J., 2000. Effects of increasing current velocity, turbidity and particle-size selection on the feeding activity and scope for growth of *Ruditapes decussatus* from Ria Formosa, southern Portugal. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 245: 111-125.

Soclo H., 1986. Etude de la distribution des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les sédiments récents, identification des sources. Thèse en Sciences, Université de Bordeaux 1. p. 158.

Soldatov A.A., Gostyukhina O.I., Golovina I.V., 2007. Antioxidant enzyme complex of tissues of the bivalve *Mytilus galloprovincialis* Lam. under normal and oxidative-stress conditions: a review. Application Biochemestry Microbiology 43: 556–562.

Solé M., Kopecka-Pilarczyk J., Blasco J., 2009. Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, from a Marsh ecosystem in SW Spain. Environment International 35: 523–531.

Solé M., Peters L.D., Magnusson K., Sjölin A., Granmo Â., Livingstone D.R., 1998. Responses of the cytochrome P450-dependent monooxygenase and other protective enzyme systems in digestive gland of transplanted common mussel (*Mytilus edulis* L.) to organic contaminants in the Skagerrak and Kattegat (North Sea). Biomarkers 3: 49–62.

Solé M., Porte C., Albaigés J., 1994. Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: its relation with contaminant body burdens. Aquatic Toxicology 30: 271-283.

Spencer P.S., Kim M.S., Sabri M.I., 2002. Aromatic as well as aliphatic hydrocarbon solvent axonopathy. International Journal of Hygiene and Environmental Health 205: 131-136.

Šrut M., Štambuk A., Bourdineaud J.P., Klobučar G.I., 2015a. Zebrafish genome instability after exposure to model genotoxicants. Ecotoxicology 24: 887-902.

Šrut M., Bourdineaud J.P., Štambuk A., Klobučar G.I., 2015b. Genomic and gene expression responses to genotoxic stress in PAC2 zebrafish embryonic cell line. Journal of Applied Toxicology, in press.

Stange K, Swachamer D.L., 1994. Factors affecting phytoplankton species-specific differences in accumulation of 40 polychlorinated biphenyls (PCBs). Environmental Toxicology and Chemistry 13: 1849–1860.

Stegeman J.J., 1985. Benzo(a)pyrène oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel *Mytilus edulis* and other bivalve mollusc species from the Western North Atlantic. Marine Biology 89: 21-30.

Stegeman J.J., Hahn M.E., 1994. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K., (Eds.), Aquatic toxicology: molecular, biochemical and cellular perspectives. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton. pp. 87–206.

Suteau P.M., Migaud M.L., Daubeze M., Narbonne J.F., 1988. Comparative induction of drug metabolizing enzymes in whole mussel by several types of inducer, Marine Environment Research 24: 119.

Suzuki T., Hara A., Yamaguchi K., Mori K., 1992. Purfication and immunolocalization of a vitellin -like protein from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Marine Biology 113: 239–245.

Szefe P., Frelek K., Szefer K., Lee Ch.B., Kim B.S., Warzocha J., Zdrojewska I., Ciesielski T., 2002. Distribution and relationships of trace metals in soft tissue, byssus and shells of *Mytilus edulis trossulus* from the southern Baltic. Environmental Pollution 120: 423-444.

Tatrai E., Kovacikova Z., Hudak A., Adamis Z., Ungvary G., 2001. Comparative in vitro toxicity of cadmium and lead on redox cycling in type II pneumocytes. Journal of Applied Toxicology 21: 479-483.

Templeton D.M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L.G., Muntau H., Van Leeuwen H.P., Lobinski R., 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). Pure and Applied Chemistry 72: 1453-1470.

Tian S., Pan L., Sun X., 2013. An investigation of endocrine disrupting effects and toxic mechanisms modulated by benzo [a] pyrene in female scallop *Chlamys farreri*. Aquatic Toxicology 144: 162-171.

Tian S., Pan, L., Zhang H., 2014. Identification of a CYP3A-like gene and CYPs mRNA expression modulation following exposure to benzo [a] pyrene in the bivalve mollusk *Chlamys farreri*. Marine Environmental Research 94: 7-15.

Timbrell J., 2001. Principles of Biochemical Toxicology. 3rd Ed., London, Taylor et Francis.

Tolosa J.M., Bayona Y.J., Albaigés Gs., 1996. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocabons and sulfur/oxygen derivatives in northwestern Mediterranean sediments: spatial and temporal vatriability, fluxes and budgets. Environmental Science and Technology. 30: 2495-2503.

Trabelsi E.L.B., Armi Z., Trabelsi-Annabi N., Shili A., Ben Maiz N., 2013. Water quality variables as indicators in the restoration impact assessment of the north lagoon of Tunis, South Mediterranean. Journal of Sea Research 79: 12-19.

Trabelsi S., Driss M.R., 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons in superficial coastal sediments from Bizerte Lagoon, Tunisia. Marine Pollution Bulletin. 50 : 344–359.

Tremblay L., Kohl S.D., Rice J.A., Gagné J.P., 2005. Effects of temperature, salinity, and dissolved humic substances on the sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to estuarine particles. Marine Chemistry. 96: 21-34.

Trigui-El Menif N., 1995. La palourde *Ruditapes decussatus* des côtes tunisiennes : biométrie, reproduction et impact de l'environnement sur la bioaccumulation en métaux traces. Thèse de Doctorat. Université de Tunis II. p. 261.

Troost K., 2010. Causes and effects of a highly successful marine invasion: Case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries. Journal of Sea Research 64: 145-165.

Tsangaris C., Kormas K., Strogyloudi E., Hatzianestis I., Neofitou C., Andral B., Galgani F., 2010. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. Comparative Biochemestry and Physiology Part C 151: 369-378.

Tukaj S., Tukaj Z., 2010. Distinct chemical contaminants induce the synthesis of Hsp70 proteins in green microalgae *Desmodesmus subspicatus*: heat pretreatment increases cadmium resistance. Journal of Thermal Biology 35: 239–244.

Turki S., Hadj Ali S. M., 1990. Evolution de l'état trophique dans le lac de Tunis (partie nord). Bulletin de l'Institut National Scientifique et Technique d'Océanographie et de Pêche de Salammbô 17: 61-74.

Turner A., Rawling M.C., 2002. Sorption of benzo[a]pyrene to sediment contaminated by acid mine drainage: contrasting particle concentration-dependencies in river water and seawater. Water Research 36: 2011-2019.

Turrens J.F., 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Bioscience Reports 17: 3–8.

Tuvikène A., 1995. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Annales Zoologici Fennici 32: 295-307.

UNEP/MAP, 2006. Illegal Oil Discharge in European Seas. Environment Alert Bulletin, 7. United Nations Environment Programme, Mediterranean Action Plan, Athens. http://www.grid.unep.ch/products/3_Reports/ew_oildischarge.en.pdf

UNEP/MAP, 2012. State of the Mediterranean Marine and Coastal Environment, UNEP/MAP –Barcelona Convention, Athens, p. 92.

UNEP/MAP/MED POL, 2012. Releases, emissions and sources of pollutants in the Mediterranean region: An assessment of 2003-2008 trends. United Nations Environment Programme, Mediterranean Action Plan, Athens.

Vache C., Camares O., Dastugue B., Creveaux I., Vaury C., Bamdad M., 2007. A potential genomic biomarker for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants: multidrug resistance gene 49 in *Drosophila melanogaster*. Environmental Toxicology and Chemistry 26: 1418-1424.

Valton E., Amblard C., Wawrzyniak I., Penault-Llorca F., Bamdad M., 2013. P-gp expression in brown trout erythrocytes: evidence of a detoxification mechanism in fish erythrocytes. Scientific Reports 3: 3422.

Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology. 13: 57-149.

Varanasi U., Relchert W.L., Stein J.E., Brown D.W., Sanborn H.R.,. 1985. Bioavailability and biotransformation of aromatic hydrocarbons in benthic organisms exposed to desiment from an urban estuary. Environmental Science & Technology 19: 836-841.

Varotto L., Domeneghetti S., Rosani U., Manfrin C., Cajaraville M.P., Raccanelli S., Pallavicini A., Venier P., 2013. DNA damage and transcriptional changes in the gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to nanomolar doses of combined metal salts (Cd, Cu, Hg). PLoS One 8(1):e54602.

Vermeulen N.P, Bessems J.G., Van de Straat R., 1992. Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention. Drug Metabolism Reviews. 24: 367-407.

Vethaak A.D., Jol J.G., 1996. Diseases of flounder Platichthys flesus in Dutch coastal and estuarine waters, with particular reference to environmental stress factors. I. Epizootiology of gross lesions. Diseases of Aquatic Organisms 26: 81-97.

Vethaak A.D., Jol J.G., Meijboom A., Eggens M.L., Rheinhalt T., Wester P.W., Van de Zande T., Bergman A., Dankers N., Ariese F., Baan R.A., Everts J.M., Opperhuizen A., Marquenie J.M., 1996. Skin and liver diseases induced in flounder (*Platichthys flesus)* after long-term exposure to contaminated sediments in large-scale mesocosms. Environmental Health Perspectives 104: 1218-1229.

Viamajala S., Peyton B.M., Richards L.A., Petersen J.N., 2007. Solubilization, solution equilibria, and biodegradation of PAH's under thermophilic conditions. Chemosphere 66: 1094-1106.

Viarengo A., Arena N., Canesi L., Alia F.A., Orunesu M., 1994. Structural and biochemical alterations in the gills of copper-exposed mussels. In: Renzoni A., Mattei N., Lari L., (Eds.). Contaminants in the environment. Boca Raton: Lewis Publishers, pp. 135-144.

Viarengo A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. Aquatic Sciences 1: 295-317.

Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 3: 281-300.

Viarengo A., Nott J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 104: 355-372.

Vidal M.L., Rouimi P., Debrauwer L., Narbonne J.F., 2002. Purification and characterisation of glutathion-S-transferase from the fresh water clam *Corbicula fluminea* (Muller). Comparative Biochemistry and Physiology Part C 131: 477-489.

Vidal-Liñán L., Bellas J., Campillo J.A., Beiras R., 2010. Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain) Chemosphere 78: 265–272.

Vieira L.R., Sousa A., Frasco M.F., Lima I., Morgado F., Guilhermino L., 2008. Acute effects of Benzo [a] pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). Science of the Total Environment 395: 87-100.

Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullos M.J., Valavanidis A., 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. Marine Pollution Bulletin 54:1361-1371.

Voelker D., Vess C., Tillmann M., Nagel R., Otto G.W., Geisler R., Schirmer K., Scholz S., 2007. Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. Aquatic Toxicology 81: 355-364.

Wang W.X., Chow A.T., 2002. Benzo [a] pyrene absorption and exposure pathways in the green mussel *Perna viridis*. Environmental Toxicology and Chemistry 21: 451-458.

Wang Y., Fang J., Leonard S.S., Krishna Rao K.M., 2004 Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. Free Radical Biology & Medicine 36: 1434–1443.

Wang Z., Fingas M.F., 2003. Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. Marine Pollution Bulletin. 47: 423-452.

Wang Z., Fingas M., Lambert P., Zeng G., Yang C., Hollebone B., 2004. Characterization and identification of the Detroit River mystery oil spill (2002). Journal of Chromatography A 1038: 201-214.

Wang L., Pan L., Liu N., Liu D., Xu C., Miao J., 2011. Biomarkers and bioaccumulation of clam *Ruditapes philippinarum* in response to combined cadmium and benzo [α] pyrene exposure. Food and Chemical Toxicology 49: 3407-3417.

Wang Z., Yan C., Vulpe C.D., Yan Y., Chi Q., 2012. Incorporation of in situ exposure and biomarkers response in clams *Ruditapes philippinarum* for assessment of metal pollution in coastal areas from the Maluan Bay of China. Marine Pollution Bulletin 64: 90-98.

Wedderburn J., Mc Fadzen I., Sanger R.C., Beesley A., Heath C., Hornsby M., Lowe D., 2000. The application of cellular and physiological biomarkers, in the mussel *Mytilus edulis*, in conjunction with early life stage bioassays and adult histopathology. Marine Pollution Bulletin 40: 257–267.

Welsh J., McClelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 18: 7213–7218.

Whitlock Jr J.P., 1999. Induction of cytochrome P4501A1. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 39: 103-125.

Widdows J., Donkin P., Staff F.J., Matthiessen P., Law R.J., Allen Y.T., Thain J.E., Allchin, C.R., Jones B.R., 2002. Measurement of stress effects (scope for growth) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) collected from the Irish Sea. Marine Environmental Research 53: 327-356.

Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.

Williams T.D., Mirbahai L., Chipman J.K., 2014. The toxicological application of transcriptomics and epigenomics in zebrafish and other teleosts. Brief Functional Genomics 13: 157-171.

Wilson S.C., Jones K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Environmental Pollution 81: 229-249.

Winston G.W., Di Giulio R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquatic Toxicology 19: 137-161.

Wootton A.N., Herring C., Spry J.A., Wiseman A., Livingstone D.R., Goldfarb P.S., 1995. Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression (CYP1A) in the mussel *Mytilus sp.* Marine Environment Research 39: 21-26.

Wyrobeck A.J., Gordon L.A, Burkhart J.G., Francis M.W., Kapp R.W., Letz G., Malling H.V., Topham J.C., Whorton M.D., 1983. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in

nonhuman mammals: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Research 115: 1-72.

Xu C., Pan L., Liu N., Wang L., Miao J., 2010. Cloning, characterization and tissue distribution of a pi-class glutathione S-transferase from clam (*Venerupis philippinarum*): Response to benzo [α] pyrene exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 152: 160-166.

Young L.Y., Cerniglia C.E., 1995. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley, New-York.

Youngblood W.W., Blumer M., 1975. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: homologous series in soils and recent marine sediments. Geochimca et Cosmochimca Acta. 39: 1303-1314.

Yunker M.B., Macdonald R.W., Vingarzan R., Mitchell R.H., Goyette D., Sylvestre S., 2002. PAHs in the Fraser River basin: A critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. Organic Geochemistry. 33: 489-515.

Zaghden H., Kallel M., Elleuch B, Oudot J., Saliot A., 2007. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments of Sfax, Tunisia, Mediterranean Sea. Marine Chemistry 105: 70-89.

Zhang Z., Hu J., Jin W.A., An L., Tao S., Chen J., 2005. Induction of vitellogenin mRNA in juvenile chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) treated with 17β-estradiol and 4-nonylphenol. Environmental Toxicology and Chemistry 24: 1944-1950.

Zhang J-G,Tirmenstein MA,Nicholls-Grzemski FA,Fariss MW. 2001 Mitochondrial electron transport inhibitors cause lipid peroxidation-dependent and -independent cell death: protective role of antioxidants. Arch Biochem Biophys 393, 87–96.

Zheng S., Chen B., Qui X., Lin K., Yu X., 2013. Three novel cytochrome P450 genes identified in the marine polychaete *Perinereis nuntia* and their transcriptional responses to xenobiotics. Aquatic Toxicology 134-135: 11-22.

Zheng S., Qiu X., Chen B., Yu X., Lin K., Bian, M., Liu Z., Huang H., Yu W., 2011. Toxicity evaluation of benzo [a] pyrene on the polychaete *Perinereis nuntia* using subtractive cDNA libraries. Aquatic Toxicology 105: 279-291.

Zrafi I., Hizem L., Chalghmi H., Ghrabi A., Rouabhia M., Saidane-Mosbahi D., 2013. Aliphatic and Aromatic Biomarkers for Petroleum Hydrocarbon Investigation in Marine Sediment. Journal of Petroleum Science Research 2: 145-155.

Zrafi-Nouira I., Khedir-Ghenim Z., Bahri R., Cheraeif I., Rouabhia M., Saidane-Mosbahi D., 2009. Hydrocarbons in seawater and water extract of Jarzouna-Bizerte coastal of Tunisia (Mediterranean Sea): petroleum origin investigation around refinery rejection place. Water, air, and soil pollution, 202: 19-31.

Zrafi-Nouira I., Khedir-Ghenim Z., Safi N.M.D., Bahri R., Mzoughi N., Ameur A., Saidane-Mosbahi D., 2010. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons around a petroleum refinery rejection area in Jarzouna-Bizerte Coastal (Tunisia). Sediment and soil contamination an International Journal. 19: 292-306.

Zrafi-Nouira I., Khedir-Ghenim Z., Zrafi F., Bahri R., Cheraeif I., Rouabhia M., Saidane -Mosbahi D., 2008. Hydrocarbon Pollution in the Sediment from the Jarzouna-Bizerte Coastal Area of Tunisia (Mediterranean Sea). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 80: 566-572.