



HAL
open science

Valorisation des gastéropodes marins en écotoxicologie par l'étude de leur diversité génétique et leurs réponses aux perturbations environnementales

Mariem Zaidi

► **To cite this version:**

Mariem Zaidi. Valorisation des gastéropodes marins en écotoxicologie par l'étude de leur diversité génétique et leurs réponses aux perturbations environnementales. Ecotoxicologie. Le Mans Université; Université de Sfax. Faculté des sciences, 2022. Français. NNT : 2022LEMA1011 . tel-03711540

HAL Id: tel-03711540

<https://theses.hal.science/tel-03711540v1>

Submitted on 1 Jul 2022

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.



THESE DE DOCTORAT DE

LE MANS UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 598

Sciences de la Mer et du littoral

Spécialité : « *Biologie marine - Ecotoxicologie* »

Par

« Mariem ZAIDI »

« Valorisation des gastéropodes marins en écotoxicologie par l'étude de leur diversité génétique et leurs réponses aux perturbations environnementales »

Thèse présentée et soutenue à « **Le Mans Université** », le « **17 Juin 2022** »

Unité de recherche : **Biologie des Organismes, Stress, Santé (BIOSSE)- EA2160, Le Mans Université
Biodiversité Marine et Environnement- UR/11/ES-72, Faculté des sciences de Sfax**

Thèse N° : **2022LEMA1011**

Rapporteurs avant soutenance :

Imed Messaoudi, Professeur
Institut supérieur de biotechnologie,
Université de Monastir

Marc Pagano, Directeur de recherches
Aix Marseille Université

Composition du Jury :

Amélie Châtel, Maître de conférences HDR
Université catholique de l'Ouest, Angers, France

Jasmine Nahrgang, Professeur
UiT The Arctic University of Norway

Zaher Drira, Maître de conférences HDR
Université de Sfax, Tunisie

Présidente du jury :

Amel Hamza-Chaffai, Professeur
Institut préparatoire aux études d'ingénieurs de Sfax, Tunisie

Directeur de thèse

Vincent Leignel, Maître de conférences HDR
Le Mans Université

Co-directeur de thèse

Habib Ayadi, Professeur
Université de Sfax

« Don't think in small steps. Think in giant leaps »

Remerciements

Je vous présente cette thèse de doctorat qui représente un travail qui s'est inscrit dans la durée, elle a constitué le fil conducteur d'une tranche de ma vie et me conduit aujourd'hui à l'aube de la maturité scientifique. De nombreuses personnes se sont retrouvées entre Mariem la doctorante et son doctorat. Ce sont ces personnes que j'aimerais mettre en avant dans ces remerciements.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien des universités : Le Mans université et l'université de Sfax et du Ministère de l'Europe et affaires étrangères qui m'ont permis de bénéficier de différentes allocations de recherche et diverses aides financières qui m'ont permis de mener à terme et sereinement mes recherches.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pendant l'élaboration de ma thèse, en particulier mes directeurs, Docteur Vincent Leignel qui a dirigé avec bienveillance, compétence, optimisme et grande disponibilité ma thèse. Ses encouragements pendant mes moments de doute, son enthousiasme, ses conseils et la formation qu'il m'a dispensé sont une véritable source d'inspiration pour moi. Je tiens également à exprimer toute ma gratitude au Professeur Habib Ayadi, pour son intérêt, sa disponibilité, son soutien et ses nombreux conseils durant la rédaction de ma thèse. J'ai été honorée par leur encadrement qui a forgé mon engouement pour la recherche scientifique.

Merci aux membres de mon comité de suivi individuel de thèse, Docteurs Hélène Arambourou et Amélie Châtel pour leurs regards extérieurs et leurs conseils sur mon travail de doctorat.

Je souhaite exprimer mes remerciements les plus sincères au Professeur Imed Messaoudi et au Directeur de Recherche Marc Pagano d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse et aux Docteurs Amélie Châtel et Zaher Drira et aux Professeurs Amel Hamza-Chaffai et Jasmine Nahrgang pour leurs qualités d'examineurs.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la disponibilité et l'accueil chaleureux que m'a témoigné le Laboratoire BIOSSE à Le Mans Université. Les nombreuses expériences que j'ai eu l'occasion de mener dans le cadre de mon projet de recherche m'ont permis de donner vie, je l'espère, à ce récit.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres du laboratoire de biodiversité marine et environnement à l'université de Sfax notamment au Docteur Sana Gammoudi sur qui j'ai pu compter pour toutes procédures administratives qui n'étaient pas évidentes avec la

distance. Un merci tout particulier au Docteur Wassim Guermazi de m'avoir aidé sur la fin de mes analyses de données avec rigueur, dynamisme, professionnalisme et enthousiasme.

Je souhaite témoigner très sincèrement et très chaleureusement toute ma gratitude à tous les stagiaires que j'ai encadré ou participé à leur encadrement, ils ont contribué très largement à ma formation scientifique, notamment sur les aspects d'encadrement, j'ai énormément appris à leur contact et c'est devenu une véritable richesse pour moi, plus précisément : Mesdames Audrey Botté, Clarisse Seguin et Monsieur Anthony Montembault.

Un grand merci à mes collègues de bureau au Mans : Aurélie, Gurvan, Julie, Maxime et Romuald (qui faisait partie du bureau aussi). Merci d'avoir partagé un bureau, le calme du travail, les doutes et les peurs, la motivation et les encouragements mais également d'être devenus des vrais amis en dehors du laboratoire. Merci pour les échanges constructifs qu'on ait pu avoir dans le bureau, merci pour les discussions sérieuses et moins sérieuses, pour les pauses café, les fous rires, les browkies (quelle découverte d'ailleurs), les soirées, les pique-nique, le concert sous la pluie (pour faire plaisir à la miss qui aime le rap...), les soirées Couscous (Tunisien bien évidemment) et bien d'autres ! Je tiens à adresser un merci tout particulier à Julie. Tu as été un réel soutien dans les moments difficiles de cette dernière année de thèse. Merci Maxime pour ton aide précieuse et pour nos discussions riches et interminables sur l'écotoxicologie et la science. Merci à mes collègues de laboratoire BOREA à Caen de m'avoir bien accueilli durant mon année d'ATER.

Momo je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien indéfectible et tes encouragements. Rania mon rayon de soleil, merci d'avoir été l'amie qui vaut plus qu'une vraie sœur dans ma vie. Je te remercie d'avoir été toujours là pour m'écouter, m'apaiser, m'encourager, me soutenir et me conseiller quand j'en avais besoin et à me tirer vers le haut durant les périodes difficiles et parfois douloureuses. J'ai de la chance de t'avoir dans ma vie depuis dix ans. Tu es quelqu'un de précieux.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagné tout au long de ces années. Je suis redevable à mes parents, Samia et Waer Zaidi, pour leur amour, leur soutien et leur confiance indéfectibles tout au long de mon parcours. Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour ma petite nièce, que je n'ai pas encore eu l'occasion de rencontrer mais qui m'accompagne et illumine mes journées depuis trois mois.

Liste des publications

1. Zaidi M, Athmouni K, Métais I, Ayadi H, Leignel V (2022) (IF = 4,223). The Mediterranean limpet *Patella caerulea* (Gastropoda, Mollusca) to assess marine ecotoxicological risk: a case study of Tunisian coasts contaminated by metals (<https://doi.org/10.1007/s11356-021-18490-3>)
2. Botté A, Seguin C, Nahrgang J, Zaidi M, Guery J, Leignel V (2022) (Ecotoxicology, IF = 2.823). Lead in the marine environment: concentrations and effects on invertebrates (<https://doi.org/10.1007/s10646-021-02504-4>)
3. Botté A, Zaidi M, Guery J, Fichet D, Leignel V (2022) (Aquatic Ecology, IF= 1.641). Aluminium in aquatic environments : abundance and ecotoxicological impacts (<https://doi.org/10.1007/s10452-021-09936-4>)

Liste des communications scientifiques

❖ Orales

- Zaidi M, Rjeb K, Athmouni K, Ayadi H, Leignel V. *Comparative ecotoxicological study between two marine mollusc species collected along the Tunisian coast*. (Congrès Méditerranéen en Bio-analyses, Mahdia-Tunisie, 2019)

❖ Affichées

- Zaidi M, Athmouni K, Ayadi H, Leignel V. *Ecotoxicological study of the metallic pollution along the Tunisian coast. Focus on two molluscan models (*Solen marginatus*, *Patella caerulea*)*. (SETAC, Dublin-Irlande, 2020).
- Zaidi M. Les chapeaux chinois, les vrais experts des mers ! (Expose ta Thèse, EDSML / Le Mans Université, 2021).
- Zaidi M, Badawi M, Leignel V. “Multibiomarker box” : a new molecular tool to integrated ecotoxicological investigations in *Patella vulgata*. (SEFA, Versailles-France, 2021)

Table des matières

Chapitre I : Etat des connaissances	1
Introduction générale et problématiques	1
I. Généralités sur les mollusques gastéropodes	7
I.1 Les gastéropodes en écotoxicologie marine :	8
I.1.1 Synthèse des bioindicateurs utilisés	8
I.1.2 Les biomarqueurs étudiés chez les gastéropodes	10
II. Les métaux trace dans les systèmes aquatiques	13
II.1 Généralités	13
II.2 Sources des métaux dans le milieu marin	13
II.3 Domaines d'utilisation des métaux	14
II.4 Incorporation des métaux dans la biomasse	14
II.4.1 Répartition et devenir des métaux dans l'environnement marin	14
II.4.2 Influence de la dégradabilité :	15
III. Bioaccumulation et bioconcentration :	16
III.1 Notion de biodisponibilité :	16
III.2 Bioconcentration, bioaccumulation et bioamplification	16
III.3 Régulation et détoxification :	17
IV. Toxicités aigüe et chronique.	18
V. Evaluation des risques de contamination des écosystèmes	19
V.1 La mesure de la contamination des organismes - Les bioindicateurs de contamination	20
V.2 Bioindicateurs d'effets : <i>monitoring</i> d'espèces « sentinelles » ou encore d'altération des communautés par les polluants	21
V.3 Les biomarqueurs	22
V.4 Les catégories de biomarqueurs	24

V.4.1	Les biomarqueurs de défense ou d'adaptation	24
V.4.2	Les biomarqueurs de dommage ou d'effet	24
V.4.3	Les biomarqueurs de susceptibilité/sensibilité ou de génotoxicité.....	25
VI.	Généralités sur le stress oxydatif.....	25
VI.1	Les mécanismes antioxydants.....	26
VI.1.1	Le système antioxydant enzymatique	26
VI.1.1.1	La catalase (CAT).....	26
VI.1.1.2	La superoxyde dismutase (SOD).....	27
VI.1.1.3	La glutathion peroxydase (GPx).....	27
VI.1.2	Le système antioxydant non enzymatique	27
VI.1.3	La peroxydation lipidique	28
Chapitre II : Caractérisation d'éléments relatifs à la diversité génétique des trois espèces étudiées : <i>Patella caerulea</i> , <i>Patella vulgata</i> et <i>Littorina littorea</i>		
I.	Exploration des modèles d'études	30
I.1	Les patelles	30
I.1.1	Position systématique.....	30
I.1.2	Les différentes espèces reconnues de patelles	31
I.1.3	Répartition géographique	31
I.1.4	Un comportement alimentaire particulier ?.....	34
I.1.5	Reproduction	34
I.1.6	Exploitation des patelles	35
I.1.7	Intérêt écologique des patelles	36
I.1.8	Problème taxonomique.....	37
I.2	Les littorines	37
I.2.1	Position systématique.....	38
I.2.2	Les différentes espèces de littorines reconnues en France.....	38
I.2.3	<i>Littorina littorea</i>	39
I.2.3.1	Distribution géographique.....	39
I.2.3.2	Comportement alimentaire	40

I.2.3.3	Reproduction	40
I.2.3.4	Exploitation des littorines.....	41
I.2.3.5	Intérêt écologique des littorines.....	42
II.	Les marqueurs moléculaires analysés	42
II.1	Les marqueurs mitochondriaux	42
II.1.1	Le cytochrome oxydase I (COI)	42
II.1.2	La région contrôle (D-Loop).....	42
II.2	Les marqueurs nucléaires ribosomiques (ITS1-ITS2).....	43
III.	Méthodes moléculaires utilisées pour l'analyse de la diversité génétique.....	43
III.1	Extraction des acides nucléiques (ADN)	43
III.2	Amplification en chaine par polymérase (PCR)	44
III.3	Extraction, ligation et clonage des fragments amplifiés	44
III.4	Analyse génétique	44
IV.	Résultats et discussion.....	45
IV.1	Diversité génétique de <i>Patella Caerulea</i>	45
IV.1.1	Discussion	51
IV.2	Diversité génétique des modèles atlantiques <i>P. vulgata</i> et <i>L. littorea</i>	55
IV.2.1	Diversité génétique de <i>Patella vulgata</i>	55
IV.2.2	Diversité génétique de <i>Littorina littorea</i>	64
IV.2.3	Discussion	69
Chapitre III : Relation entre biodisponibilité environnementale des métaux et dérèglement de l'homéostasie redox chez la patelle méditerranéenne <i>Patella caerulea</i> des côtes tunisiennes.....		
		74
I.	Introduction.....	74
I.1	Généralités sur la situation environnementale en Méditerranée et en Tunisie	74
I.2	Pertinence du suivi des métaux en milieu marin en Tunisie	75
I.3	Les bioindicateurs mollusques en Méditerranée	77
I.4	Les bioindicateurs mollusques en Tunisie.....	78

I.5	Intérêt écotoxicologique de <i>Patella caerulea</i>	78
II.	Matériel et Méthodes.....	79
II.1	Les sites de prélèvement.....	79
II.1.1	Le site du Cap Bon, Sidi Rais (CB).....	80
II.1.1.1	Situation géographique et caractéristiques physiques.....	80
II.1.1.2	Sources de pollutions dans le site du Cap Bon.....	82
II.1.2	Le site de la Chebba (C).....	82
II.1.2.1	Situation géographique et caractéristiques physiques.....	82
II.1.2.2	Les sources de pollution.....	83
II.1.3	Le golfe de Gabès.....	83
II.1.3.1	Situation géographique et spécificités.....	83
II.1.3.2	Le site de Kerkennah (K).....	84
II.1.3.3	Les sources de pollution.....	84
II.1.3.4	Le site de Gabès (G).....	85
II.1.3.5	Les sources de pollution.....	85
II.2	Etude sur terrain.....	86
II.2.1	Stratégie de prélèvement.....	86
II.2.2	Mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau.....	87
II.3	Dosage des éléments traces par absorption atomique.....	87
II.3.1	Préparation du matériel biologique.....	87
II.3.2	Dosage.....	88
II.3.3	Assurance qualité des dosages des métaux.....	89
II.3.4	Facteur de bioaccumulation (BAF).....	90
II.3.5	Evaluation des risques.....	90
II.4	Techniques du dosage de certains biomarqueurs du stress oxydatif.....	91
II.4.1	Préparation du cytosol.....	91
II.4.2	Dosage des protéines totales.....	92
II.4.3	Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD).....	92
II.4.4	Dosage de l'activité de la catalase (CAT).....	92
II.4.5	Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx).....	92

II.4.6	Dosage du taux de la peroxydation lipidique.....	93
II.5	Analyse des données et outils statistiques utilisés.....	93
II.5.1	Système d'Information Géographique QGIS	93
II.5.2	Logiciel R pour le traitement des résultats	93
II.5.3	Test de Student.....	93
II.5.4	Test d'analyse de variance ANOVA (Analysis of Variance).....	94
II.5.5	Analyse multifactorielle en Composantes Principales (ACP)	94
II.5.6	Test de corrélation de Pearson	95
II.5.7	Analyse par Classification Hiérarchique (ACH)	95
III.	Résultats et discussion.....	95
III.1	Caractérisation physico-chimique des sites d'étude	95
III.1.1	Physico-chimie des eaux de surface	95
III.1.2	Discussion.....	96
III.1.3	Conclusion.....	98
III.2	Caractérisation environnementale des sites d'étude	99
III.2.1	Distribution spatiale des métaux trace dissous dans les eaux de surface	99
III.2.1.1	Indice de pollution des métaux (MPI)	101
III.2.1.2	Discussion	101
III.3	Evaluation du risque écotoxicologique	104
III.3.1	Variation de la bioaccumulation des métaux trace dans les patelles.....	104
III.3.1.1	Discussion	106
III.3.2	Evaluation du dérèglement de l'homéostasie	110
III.3.2.1	Analyse des activité biochimiques des enzymes antioxydantes chez <i>P. caerulea</i> 110	
III.3.2.2	Discussion	111
	Chapitre IV : Evaluation de la toxicité de l'aluminium et du plomb sur <i>P. vulgata</i> et <i>L. littorea</i> lors de contaminations expérimentales aiguës (96h).....	116
I.	Introduction.....	116
I.1	Pourquoi l'aluminium ?	118

I.1.1	Caractéristiques générales et origines naturelles de l'aluminium	118
I.1.2	Domaines d'utilisation de l'aluminium.....	119
I.1.3	Bioaccumulation de l'aluminium chez les gastéropodes marins	119
I.1.4	Facteurs « affectants » la disponibilité de l'aluminium dans le milieu marin 120	
I.1.5	Valeurs réglementaires pour l'aluminium en milieu marin	121
I.2	Pourquoi le plomb ?.....	122
I.2.1	Caractéristiques générales et origines naturelles du Plomb	122
I.2.2	Domaines d'utilisation du plomb	122
I.2.3	Bioaccumulation du plomb chez les gastéropodes.....	123
I.2.4	Facteurs affectant la solubilité et la biodisponibilité du plomb	123
I.2.5	Valeurs réglementaires pour le plomb en milieu marin	124
II.	Matériel et méthodes	125
II.1	Phase d'acclimatation au laboratoire	125
II.2	Préparation des solutions Stocks	125
II.3	Tests de toxicité	126
II.4	Modélisation des courbes dose-réponse	127
II.5	Recherche <i>in silico</i> de séquences de transcrits pour des biomarqueurs antioxydants et apoptotiques	127
III.	Résultats	128
III.1	Présentation des courbes Dose-réponse	128
III.1.1	Aluminium.....	128
III.1.2	Plomb.....	129
III.2	Réponses biochimiques de biomarqueurs :.....	131
III.3	Caractérisation <i>in silico</i> de séquences de biomarqueurs.....	133
III.3.1	Les séquences de biomarqueurs antioxydants	133
III.3.2	Les séquences de biomarqueurs apoptotiques intrinsèques.....	134
IV.	Discussion	135

IV.1	Etude de la toxicité aigüe comparative entre l'aluminium et le plomb	135
IV.2	Etude de la toxicité aigüe comparative entre les deux modèles.....	136
IV.3	Dosage des biomarqueurs enzymatiques	139
V.	Perspectives	140
	Discussion générale	143
	Conclusions et perspectives.....	154
	ANNEXES	157
	Références bibliographiques	168

Liste des abréviations

AAS : Atomic Absorption Spectrometry

ACP : Analyse en Composantes Principales

AHC : *Agglomerative Hierarchical Clustering*

ANOVA : Analyse de Variance

BSA : Sérum Albumine Bovine

C : La Chebba

CAT : Catalase

CB : Le Cap Bon

Cd : Cadmium

CIESM : *International Commission for Scientific Exploration of the Mediterranean Sea*

COI : Cytochrome oxydase-sous unité I

Cu : Cuivre

DGSV : Direction Générale des Services Vétérinaires

DMG : Dernier maximum glacier

DRO : Dérivés Réactifs de l'Oxygène

ERO : Espèces Réactives à l'Oxygène

FAO : *Food and Agricultural Organisation*

Fe : Fer

FeOOH : Oxhydroxyde de fer

g : gramme

G : Gabès

GCT : Le groupe chimique de Tunisie

GPX : glutathion peroxydase

GST : la glutathion Stransférase (GST)

H : Hauteur de la coquille

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

IAEA : *International Atomic Energy Agency*

IUCN : *International Union for Conservation of Nature*

K : Kerkennah

LC : *Lethal Concentration*

LD : Limite de détection

LD : Limite de détection du spectrophotomètre par absorption atomique.

LQ : Limite de quantification

m : mètre

MAP : Plan d'Action méditerranéen

MDA : Malondialdéhyde

MED POL : *The Programme for the Assessment and Control of Marine Pollution in the Mediterranean*

mg : Milligramme

mg/ml : milligramme par millilitre

mM : Milli molaire

MPI : *Metal Pollution Index*

NBT : *Nitro Blue Tetrazolium*

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

Ni : Nickel

nm : Nanomètre

nmole/mg prot : nano moles par milligramme de protéines

nmoles GSH/min/mg de protéines : Nano mole de GSH par minute par milligramme de protéines

O₂⁻ : Anion superoxyde

ONAS : Office National d'Assainissement Sanitaire de Tunisie

p.s.u : Practical salinity unit, unité de salinité

Pb : Plomb

PS : Poids Sec

PubMed : Public/Publisher MEDLINE

R : langage de programmation R.

SOD : SuperOxyde Dismutase

TBA : Acide Thiobarbiturique

U/ mg protéines : Unité par milligramme de protéines.

UNEP : *United Nations Environment Programme*

USEPA : *United States Environmental Protection Agency*

Zn : Zinc

µg.L⁻¹ : microgramme par litre

µg/ g PS : microgramme par gramme de Poids Sec

µmole/min/mg de protéines : micromole par minute par milligramme de protéines

Liste des figures

Figure 1: Référencement de publications PubMed utilisant des gastéropodes en écotoxicologie marine.....	10
Figure 2: Modification de la répartition des différentes espèces chimiques de l'aluminium en fonction du pH.....	15
Figure 3: Principes des toxicités aigüe et chronique	18
Figure 4: Les différents niveaux d'organisation pouvant être affectés par les polluants et la rapidité de la réponse.....	22
Figure 5: Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques	23
Figure 6: L'évolution du rôle des biomarqueurs en fonction de l'accroissement de la concentration d'un polluant ou de la durée d'exposition	24
Figure 7: Systèmes enzymatiques et non enzymatiques impliqués dans la défense contre le stress oxydant	26
Figure 8: Schématisation de la balance du stress oxydant	28
Figure 9: Aires de répartition géographique des neuf espèces du genre <i>Patella</i>	33
Figure 10: Image représentant des traces de broutage	34
Figure 11: Changement de sexe chez les patelles en relation avec l'âge.....	35
Figure 12 : Répartition verticale des littorines	38
Figure 13: Morphologie externe de <i>Littorina littorea</i> adulte	39
Figure 14: Répartition mondiale de l'espèce <i>Littorina littorea</i>	40
Figure 15: Carte indiquant les sites de prélèvement des patelles de Méditerranée en Tunisie	46
Figure 16: Exemple d'un profil PCR (COI) obtenu sur <i>P. Caerulea</i> (site C).....	47
Figure 17: Analyse phylogénétique moléculaire basée sur le COI	48
Figure 18: Réseau d'interconnexions entre populations de <i>Patella caerulea</i> basé sur le COI	49
Figure 19: Exemple d'un profil PCR (ITS) obtenu sur <i>P. caerulea</i> (site C)	50
Figure 20: Réseau d'interconnexions entre 4 différentes populations tunisiennes de <i>Patella caerulea</i> basé sur ITS1-ITS2.....	51
Figure 21: Carte des sous-bassins, les principaux passages et détroits de la Méditerranée.....	53
Figure 22: Circulation générale en mer Méditerranée	53
Figure 23: Les fronts de la mer Méditerranée	54
Figure 24: Carte de répartition des échantillons de <i>P. vulgata</i>	55
Figure 25: Analyse moléculaire phylogénétique basée sur le COI	56

Figure 26: Arbre d'interconnexion entre toutes les populations de <i>Patella vulgata</i> basé sur le COI mitochondrial.....	57
Figure 27: Structure de la population à grande échelle chez <i>Patella vulgata</i>	58
Figure 28: Mitogénome partiel de <i>P. vulgata</i> et localisation et séquences des amorces (D-loop) mitochondriale.....	60
Figure 29 : Exemple de profile de PCR (D-Loop) sur des individus de <i>P. vulgata</i>	60
Figure 30: Réseau d'interconnexion d'haplotypes basé sur le gène D-loop de différentes populations de <i>Patella vulgata</i>	61
Figure 31: Relations entre le Fst transformé et le logarithme de la distance géographique pour les populations de <i>P. vulgata</i>	63
Figure 32: Les différentes populations de <i>Littorina littorea</i> couvrant son aire native.....	65
Figure 33: Arbre d'interconnexion entre toutes les populations de <i>Littorina littorea</i> basé sur le COI mitochondrial.....	66
Figure 34: Structure de la population à grande échelle chez <i>L.littorea</i>	69
Figure 35 : Carte topographique de l'océan Atlantique Nord -Est.	71
Figure 36: Représentation des deux courants principaux se divisant au niveau de l'Irlande et l'Angleterre	72
Figure 37: Points chauds de pollution au niveau des côtes méditerranéennes.....	75
Figure 38: Position géographique des zones d'étude.....	81
Figure 39: Le site du Cap Bon (CB)	81
Figure 40 : Position géographique de la région du golfe de Gabès.....	84
Figure 41: Le site de Kerkennah (K).....	84
Figure 42: Le site de Gabès (G)	85
Figure 43: Prélèvement des échantillons.....	87
Figure 44 : Dosage des métaux	89
Figure 45: Préparation du cytosol	91
Figure 46: Distribution inter-sites des concentrations des métaux dans l'eau	100
Figure 47: Diagramme de l'indice de pollution métallique (MPI).....	101
Figure 48: Position du site K sur la carte des îles Kerkennah.....	102
Figure 49 : Répartition inter-sites des concentrations internes des différents métaux.....	105
Figure 50: Distribution inter-sites des réponses antioxydantes.....	111
Figure 51: Mécanisme enzymatique antioxydant des mollusques.	117
Figure 52: Mécanismes apoptotiques des mollusques	118
Figure 53: Schématisation des origines naturelles d'aluminium en milieu marin.....	119

Figure 54: Modification de la solubilité et la disponibilité de l'Al en fonction du pH...	121
Figure 55: Cristallisoirs d'expérimentation (patelles)	127
Figure 56: Courbes Dose-réponse au plomb à LC30 pour <i>P. vulgata</i> et <i>L. littorea</i>	129
Figure 57 : Courbes Dose-réponse au plomb à LC30 pour <i>P. vulgata</i> et <i>L. littorea</i>	131
Figure 58: Réponses biochimiques des biomarqueurs de stress oxydant suite à une exposition aigüe à LC30 (Al et Pb) chez <i>L. littorea</i>	132
Figure 59: Séquences protéiques de biomarqueurs du stress oxydant (<i>L. littorea</i>).....	133
Figure 60: Séquences protéiques de biomarqueurs antioxydants (<i>P. vulgata</i>)	133
Figure 61: Séquences protéiques des biomarqueurs apoptotiques intrinsèques (<i>L. littorea</i>).	134
Figure 62: Séquences protéiques des biomarqueurs apoptotiques intrinsèques (<i>P. vulgata</i>).	134
Figure 63: Modélisation combinée des courbes dose/réponse pour l'aluminium.....	135
Figure 64: Comparaison entre la concentration en Cd chez <i>L. littorea</i> et <i>P. vulgata</i> prélevées sur le même site à deux années différentes	137
Figure 65: comparaison entre les concentrations métalliques ($\mu\text{g/g}$ PS) chez <i>P. vulgata</i> et différentes espèces de littorines.....	138
Figure 66: Profil des réponses antioxydantes en fonction d'un gradient croissant de stress..	140
Figure 67: Carte simplifiée des courants au sein du bassin méditerranéen.....	144
Figure 68: Relation entre la durée de phase larvaire et la dispersion moyenne estimée sur la base des distances génétiques, pour 32 espèces marines dont 12 Gastéropodes.....	145
Figure 69: Représentation des descripteurs bio-physico-chimiques (A) et des observations correspondantes (B) dans l'espace des axes F1 et F2.	149
Figure 70 : Analyse hiérarchique montrant les associations entre les sites étudiées	150

Liste des tableaux

Tableau 1: Biomarqueurs utilisés chez différentes espèces de gastéropodes marins.....	12
Tableau 2: Facteurs qui influencent la fiabilité des bioindicateurs	21
Tableau 3: Les différents radicaux libres oxygénés	25
Tableau 4: Distribution des espèces <i>Patella</i> spp. En océan Atlantique et mer Méditerranée..	31
Tableau 5: Tableau récapitulatif des différentes espèces de patelles avec quelques caractères indicatifs ainsi que des photos de morphologie interne et externe de la coquille	32
Tableau 6: Différentiation interpopulationnelle estimée avec le logiciel DNAsp.	51
Tableau 7: Indices de neutralité et de diversité de <i>P. vulgata</i> basé sur les données de COI....	59
Tableau 8: Indices de neutralité et de diversité de <i>P. vulgata</i> basé sur les données de D-Loop	62
Tableau 9: Indices de génétique de populations entre les populations de <i>Patella vulgata</i> calculés à partir de la D-loop	62
Tableau 10: Matrice de comparaison par paires de la distance génétique entre les différentes populations de <i>P. vulgata</i> basé sur la D-Loop	63
Tableau 11 : Indices de neutralité et de diversité de <i>L. littorea</i> basé sur les données de COI.	67
Tableau 12: Matrice de comparaison par paires de la distance génétique entre les différentes populations de <i>L. littorea</i> basées sur les données de COI.....	68
Tableau 13: Sources des éléments trace métalliques étudiés	76
Tableau 14: Répartition spatiale de la qualité des eaux côtières du golfe de Tunis.....	82
Tableau 15 : Analyse du matériel de référence TORT-1	90
Tableau 16: Classification de la qualité de l'eau selon la valeur de MPI.....	91
Tableau 17: Paramètres physico-chimiques des différents sites d'étude.....	96
Tableau 18: Concentrations moyennes des métaux trace ($\mu\text{g/L}$) dans les échantillons d'eau de surface collectés dans les quatre sites d'étude	99
Tableau 19: Tailles et masse moyennes des patelles collectées des différentes zones étudiées.	104
Tableau 20 : Concentrations moyennes internes des métaux ($\mu\text{g/g}$ PS) et facteurs de bioaccumulation (BAF) dans les patelles	105
Tableau 21: Concentrations d'aluminium enregistrées chez des espèces de gastéropodes ...	120
Tableau 22: Concentrations de Plomb trouvées dans la littérature chez des gastéropodes....	123
Tableau 23: Concentrations (g/L) logarithmiques et intermédiaires appliquées lors des expositions aux deux métaux (Al et Pb).....	126

Tableau 24: Concentrations létales acquises suites aux expositions de <i>P. vulgata</i> à l'Al (96h)	128
Tableau 25: Concentrations létales acquises suites aux expositions de <i>L. littorea</i> à l'Al (96h)	128
Tableau 26: Concentrations létales acquises suites aux expositions de <i>P. vulgata</i> au Pb (96h)	130
Tableau 27: Concentrations létales acquises suites aux expositions de <i>L. littorea</i> au Pb (96h)	130
Tableau 28: Tableau récapitulatif des valeurs toxicologiques de référence.....	135
Tableau 29: Analyse des composantes bio- physico-chimiques des quatre zones étudiées...	148



CHAPITRE I

Chapitre I : Etat des connaissances

Introduction générale et problématiques

La contamination des milieux marins par de nombreux produits chimiques rejetés par l'agriculture, les communautés urbaines et les industries constitue l'une des préoccupations environnementales majeures depuis plusieurs décennies (Peters et al., 2013). Ces substances peuvent être des composés de synthèse (xénobiotiques, toxiques) tels que des pesticides et des médicaments, affectant les écosystèmes par leur simple présence ; ou des contaminants comme des métaux qui engendrent des effets délétères sur les organismes à partir d'une concentration seuil.

Les métaux représentent une classe de composés hautement présents en milieu aquatique dont les effets sont observables aux diverses échelles du vivant (individu, population, communauté). Ils peuvent induire une diminution de la diversité génétique des espèces en sélectionnant uniquement les individus possédant des caractères de tolérance et/ou de résistance, modifiant ainsi indirectement les paramètres régulant la cinétique des populations (taux d'éclosion, développement/croissance, succès reproductif, ...). Sur des sites fortement pollués par des métaux une perte brutale de la variabilité génétique due à des événements de goulot d'étranglement et d'effet fondateur peut être ainsi observée (Belfiore et Anderson, 2001; Ross et al., 2002; Kim et al., 2003; Matson et al., 2006; Ensibi et al., 2015; Rumisha et al., 2017a). Cela est particulièrement vrai pour les espèces ayant une période benthique (invertébrés, poissons), restant en contact à la fois avec la colonne d'eau et le sédiment souillés par les métaux (Matson et al., 2006).

L'omniprésence et la diversité de la pollution marine, a conduit la communauté scientifique à effectuer des suivis de la qualité environnementale par le dosage régulier des métaux dans la colonne d'eau et les sédiments (démarche de chimie de l'environnement). Il s'agit ainsi d'évaluer le degré de détérioration du milieu sans référence *a priori* aux impacts biologiques potentiels. L'objectif est de pouvoir déceler rapidement la présence de contamination dans l'environnement avant que celle-ci puisse éventuellement avoir un impact sur la santé publique (contamination dans les zones de tourisme ou lors de consommation des produits de la mer). Une telle démarche aurait pu éviter par exemple la catastrophe de Minamata au Japon entre 1932 et 1966 qui s'est illustrée par la contamination de milliers de personnes par du méthylmercure accumulé dans l'eau de boisson et les poissons consommés par les

populations locales. En effet, ce genre de perturbations auraient probablement pu être évitées si on avait pu déceler au préalable la forte charge en métaux présente dans l'environnement. Il est donc important de suivre les variations des concentrations des substances d'origine anthropique même en absence de révélation d'effets toxiques sur les individus ou les écosystèmes. L'approche des métaux nécessite des méthodes d'échantillonnage précises et des techniques analytiques sophistiquées souffrant parfois d'une limite de détection élevée. De plus, le suivi des apports métalliques renseigne sur la charge indifférenciée de la totalité des espèces chimiques d'un élément présentes dans l'eau et ne renseigne donc pas de manière spécifique sur leurs biodisponibilités environnementale et écotoxicologique ; donnée pourtant primordiale pour comprendre les processus de contamination des écosystèmes. Ainsi, un suivi des concentrations de métaux au sein des tissus d'organismes apporte une compréhension supplémentaire aux dosages des métaux dans le milieu extérieur en renseignant sur la fraction biodisponible, la bioaccumulation et la bioconcentration. En parallèle, une estimation du taux de métaux accumulés au sein de plusieurs espèces ayant des niches écologiques distinctes permet de déterminer l'accumulation le long du réseau trophique donc sa bioamplification (biomagnification) (Readman et al., 1993; Ettajani et al., 2001).

La santé des écosystèmes aquatiques est reliée directement avec la santé de l'homme par le biais de contamination provenant majoritairement par les voies cutanée et d'ingestion (Amiard et al., 2008 ; Rabaoui et al., 2013 ; Bashir et al., 2020), définissant ainsi le concept "One Health" (Essack, 2018). Précédent ce concept, Goldberg (1975) avait proposé une approche biologique en utilisant des espèces animales ou végétales comme indicatrices de l'état de santé de leur environnement au travers des concentrations des polluants détectés dans leurs tissus et leurs perturbations biologiques (comportementales et physiologiques). Il s'agit du principe de l'utilisation des « bioindicateurs quantitatifs » qui repose sur le fait que les organismes marins accumulent les contaminants, en particulier les métaux, en relation avec les concentrations présentes dans le milieu (Goldberg, 1975; Phillips, 1977; Phillips et Segar, 1986; Casas, 2005). De plus, les degrés d'assimilation et d'accumulation des métaux chez les organismes vivants sont souvent des processus assez complexes qui varient d'une espèce à une autre (Casas, 2005) et qui dépendent des formes chimiques de chaque élément (Bowen, 1966). L'utilisation des bioindicateurs quantitatifs marins s'est illustrée par exemple au sein des programmes internationaux de *biomonitoring* tels que le « Mussel Watch » aux Etats-Unis, le RINBIO (Réseau Intégrateurs Biologiques) en Méditerranée, le RNO [Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin, devenu le ROCCH (Réseau d'Observation de la

Contamination Chimique)] en France (Grall et Glémarc, 2003 ; Oehlmann et Schulte-Oehlmann, 2003) ; et plusieurs études indépendantes portant sur l'évaluation des risques environnementaux (Bryan et al., 1977, 1983 ; Nakhlé, 2003 ; Casas, 2005 ; Reguera et al., 2018 ; Louzon et al., 2020, 2021 ; Zaidi et al., 2022).

Les espèces les plus utilisées en milieu marin sont les bivalves, comme les moules et les huîtres (*Mytillus* spp. et *Crassostrea* spp.), car ce sont des filtreurs respectant tous les critères de définition d'un bon bioindicateur (abondance, large zone de répartition, grande taille, bioaccumulation/bioconcentration, maintien en laboratoire possible, ...) (Beliaeff et al., 1998 ; Cantillo, 1998 ; Oros et al., 2005 ; Sole et al., 2000 ; Viñas et al., 2018). Cependant, des espèces bioindicatrices illustrant les autres niches écologiques sont également nécessaires (Reguera et al., 2018). Bien que moins populaires que les bivalves en écotoxicologie marine, les gastéropodes sont de plus en plus utilisés car ils occupent diverses fonctions écologiques (carnivores, brouteurs, détritivores, vivant en symbiose avec des microalgues) et entrent également dans l'alimentation humaine. Malgré leur forte diversité et leur omniprésence dans les divers écosystèmes, l'usage des gastéropodes reste de façon surprenante minoritaire en écotoxicologie. Après analyse de la bibliographie disponible sur la base de données PubMed, il apparaît que les gastéropodes marins les plus utilisés en écotoxicologie sont : les patelles (*Patella* spp.) (Reguera et al., 2018), les littorines (*Littorina littorea*) (Oehlmann et Schulte-Oehlmann, 2003 ; Noventa et al., 2011) et plus sporadiquement l'ormeau (*Haliotis* sp.) (Gaume et al., 2012) voire les gibbules (*Gibbula umbilicalis*) (Silva et al., 2017). Par exemple, de nombreux travaux ont validé l'utilisation des patelles pour l'étude des intensités de contaminations liées aux métaux (Campanella et al., 2001 ; Cubadda et al., 2001 ; Storelli et Marcotrigiano, 2005 ; Yüzereroğlu et al., 2010 ; Belkhodja et al., 2012 ; Rabaoui et al., 2013 ; Bordbar, 2015 ; Aydın-Önen et Öztürk, 2017 ; Conti et al., 2017 ; Lozano-Bilbao et al., 2021 ; Zaidi et al., 2022), aux hydrocarbures (Næs et al., 1998 ; Lewis et al., 2010 ; Bartolomé et al., 2011), aux microplastiques (Karlsson et al., 2017) et aux composés organochlorés tels que PCB (Peña-Méndez et al., 1996) dans les tissus des différentes espèces de patelles ainsi que dans la coquille (Foster et Chacko, 1995 ; Pérez-López et al., 2003). Il en est de même pour les littorines qui ont été utilisées pour l'évaluation des pollutions liées aux métaux (De Wolf et al., 2000), aux pesticides (Ikpesu et Ogbomida, 2017), aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (Ololade et al., 2011) et à de nombreux toxiques tels que PCB et TBT (Oehlmann et al., 2004 ; Noventa et al., 2011). Le présent travail de thèse portera exclusivement sur l'usage des patelles

et de *Littorina littorea* avec, pour les patelles, les deux espèces emblématiques de la Méditerranée et de l'Atlantique, respectivement, *Patella caerulea* et *Patella vulgata*.

Etant donné que l'absorption et la toxicité des polluants (ex : les métaux) sont influencées, entre autre, par l'espèce utilisée (Wang, 1987; Rumisha et al., 2017b), il est plus judicieux, dans le cadre d'une étude des effets écotoxicologiques sur des bioindicateurs quantitatifs de faire une analyse préliminaire permettant de s'assurer de l'identité taxonomique des individus analysés (Bouzaza, 2018). Par exemple, certains doutes subsistent quant à l'identification de plusieurs espèces du genre *Patella* et la possibilité d'hybridation entre espèces (Côrte-Real et al., 1996a, 1996b; Koufopanou et al., 1999; Sá-Pinto et al., 2005, 2008). Les critères morphologiques sur lesquels est basée la distinction systématique entre ces espèces sont d'une grande plasticité (ornementation de la coquille, couleur du pied...). Il est donc parfois très compliqué de différencier deux espèces en se basant uniquement sur des caractères purement phénotypiques (Fischer-Piette et Gaillard, 1959). L'examen de la structure de la radula (langue) des patelles permettrait une meilleure distinction spécifique mais cela nécessite une dissection de chaque individu utilisé et un examen minutieux sous loupe binoculaire. De ce fait, l'analyse génétique des individus apparaît indispensable. Cela permet également d'évaluer la diversité génétique des modèles (*Patella* spp. et *Littorina littorea*) sur l'ensemble de leur aire de répartition, afin de s'assurer de l'homogénéité des espèces étudiées et d'évaluer le flux de gènes inter-populationnel (**premier volet du travail de thèse**). Ceci nous a permis lors de ce présent travail de thèse de nous assurer que nous n'avions donc pas affaire à des populations génétiquement isolées au sein de l'aire de répartition, et d'entrevoir une extrapolation des réponses physiologiques mesurées sur certaines populations à l'ensemble de l'espèce.

Dans son livre « Introduction à l'écotoxicologie », Ramade, (2007) note que de tous les métaux et autres éléments toxiques contaminant l'écosystème, le plomb constitue, au même titre que le mercure et devant le cadmium ou l'arsenic, le métal le plus ubiquiste et l'un des plus toxiques de ces polluants. Il ajoute que le plomb est classé au 4^{ème} rang après l'aluminium, le cuivre et le zinc en termes de métaux dont la consommation est la plus importante. Cela justifie la présence de ce métal dans la liste des substances chimiques prioritaires (c'est-à-dire qui présentent un risque significatif pour l'environnement aquatique). Ceci ayant conduit à l'établissement de conventions et de réglementations internationales (OSPAR, UE, USEPA, ...). Au sein du présent travail, nous avons cherché à établir une synthèse des connaissances (*review*) portant sur le plomb et l'aluminium (**deuxième volet du travail de thèse**) car ce sont

deux métaux très fréquents en mer et pourtant aucune publication globale récente ne fait mention de leurs concentrations et effets sur les organismes marins.

L'estimation des effets et des réponses au stress au sein des organismes est une partie essentielle dans une approche d'écotoxicologie. Divers paramètres peuvent ainsi être suivis. Par exemple, l'analyse peut porter sur l'estimation d'expression et/ou de synthèse de biomarqueurs (Bebianno et al., 1992), d'effets génotoxiques, de l'altération de la viabilité cellulaire, des perturbations endocriniennes (l'analyse de l'indice de l'Intersex), de la déstabilisation membranaire lysosomale (Noventa et al., 2011), de l'immunotoxicité (incidences et intensité d'infiltration des haemocytos) (Oehlmann et Schulte-Oehlmann, 2003), ou plus récemment sur la caractérisation de transcriptomes focalisés sur les réponses immunitaires (Gorbushin, 2018). A ce jour, les seuls biomarqueurs qui aient été étudiés chez *P. caerulea* sont : l'activité enzymatique Ethoxy-Résorufine-O-Dééthylase (EROD) (Yawetz et al., 1992), l'induction des enzymes de biotransformation de type P450 (Yawetz et al., 1992; Bonacci et al., 2007) et l'expression de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) comme biomarqueur de perturbation endocrinienne (De Lisa et al., 2013). Concernant *P. vulgata* s'est l'induction des métallothionéines (Howard et Nickless 1977; Brown et al., 2004), de l'alfa-amylase (enzyme du stress neurotoxique) (Douhri et Sayah, 2009) et de l'ACHE (Douhri et Sayah, 2009; Browne et al., 2015) qui ont été évaluées.

De façon surprenante, les enzymes du stress oxydant à savoir la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX) ainsi que le produit de la peroxydation lipidique (malondialdéhyde, MDA) n'ont jamais fait l'objet d'une même étude chez nos modèles de bioindicateurs étudiés (*Littorina littorea*, *Patella caerulea* et *Patella vulgata*) pourtant ce sont des biomarqueurs précoces d'une grande importance dans l'étude de l'écotoxicité chez les invertébrés (Regoli et al., 2002b; Jensen, 2003; Vlahogianni et al., 2007). L'analyse des sensibilités et des réponses antioxydantes de nos modèles d'étude aux métaux constituera donc le **troisième volet du travail de thèse** afin de définir le lien entre la biodisponibilité des métaux (ex : mesure de la bioaccumulation) et l'induction d'effets écotoxicologiques.

Récapitulatif des objectifs principaux de la thèse :

Premier volet « Approche de diversité génétique des modèles » : Caractérisation des modèles d'étude d'Atlantique (*P. vulgata*, *L. littorea*) et de Méditerranée (*P. caerulea*) en analysant leur diversité génétique sur l'ensemble de leurs aires de répartition.

Deuxième volet « Approche bibliographique » : Etablir une synthèse des connaissances recueillies sur la présence et les effets sur les invertébrés marins du plomb (élément trace) et de l'aluminium (contaminant émergeant en milieu marin).

Troisième volet « Approche écotoxicologique expérimentale et environnementale » : Etablir le lien entre biodisponibilité environnementale et effets des métaux (aluminium, plomb) au travers du prisme de l'homéostasie redox lors de contaminations aiguës (96h).

En perspectives de ce travail, nous avons également caractériser les séquences de multiples gènes de réponses aux stress (oxydants et apoptotiques) au sein de transcriptomes disponibles pour développer ultérieurement une approche par qPCR afin d'entrevoir les niveaux de réponses précoces aux contaminations métalliques.

I. Généralités sur les mollusques gastéropodes

Les mollusques sont apparus pendant l'ère cambrienne, entre 541 et 530 millions d'années (Kallouche, 2018). Ils possèdent un corps divisé en trois parties : la tête, le corps et le pied. Les mollusques représentent l'embranchement le plus riche, après celui des arthropodes, avec plus de 70 000 espèces connues (Rosenberg, 2014). Parmi les principales classes de mollusques, les gastéropodes représentent 57 % des espèces (40 000 sp.), les bivalves 11,4% (8000 sp), les céphalopodes 1% (700 sp.), quant aux Polyplacophora et Scaphopoda ils ne correspondent qu'à 1,4% (1000 sp.) (Esposito et al., 2022).

Bien que « Mollusca » soit un phylum regroupant principalement des animaux marins, les gastéropodes et les bivalves ont également étendu leur colonisation aux milieux dulcicole et terrestre (MolluscaBase Eds., 2022). Ainsi, ces organismes par exemple peuvent être rencontrés des zones marines littorales à abyssales, dans les lacs et rivières, en forêt, en montagne, en milieu polaire, mais aussi dans les steppes et déserts (Hyman, 1967; Purchon, 1968; Oehlmann et Schulte-Oehlmann, 2003; Bautz et al., 2010 ; Kallouche, 2018). Comme cité précédemment, ils ont également la particularité d'occuper différents niveaux de la chaîne trophique, montrant leur forte importance éco-biologique (Bautz et al., 2010). Les mollusques sont donc utilisés en *biomonitoring* pour évaluer la qualité des écosystèmes terrestres, marins et d'eau douce et pour quantifier les effets des polluants environnementaux (Dallinger et al., 2000; Oehlmann et Schulte-Oehlmann, 2003; Duft et al., 2007; Reguera et al., 2018; Louzon et al., 2020; Zaidi et al., 2022). Ceci est particulièrement vrai pour les deux classes les plus diverses de mollusques, gastéropodes et bivalves qui sont les bioindicateurs les plus utilisés en raison de leurs fortes capacités de bioconcentration des xénobiotiques/contaminants (Oehlmann et Schulte-Oehlmann 2003; Bodin et al., 2004 ; Casas 2005 ; Hédouin et al., 2006 ; Zaidi et al., 2022).

La classe « Gastropoda » (Cuvier 1797) regroupe des animaux à corps mou, non segmenté, ayant une tête visible portant deux paires de tentacules sensorielles et une paire d'yeux. La bouche est pourvue d'une langue râpeuse : la radula. La partie ventrale est constituée par la sole de reptation, un pied musculeux, qui sert à la locomotion en rampant sur le substrat. La plupart des espèces sont caractérisées par une torsion de la masse viscérale à 180° lors de leur développement et une coquille univalve hélicoïde qui protège la masse viscérale. Les formes les plus dérivées (limaces) ont perdu leur coquille au cours de l'évolution. Certaines espèces possèdent un opercule corné ou calcifié produit par le pied et permettant à l'animal de se rétracter au sein de sa coquille. Certains gastéropodes résistent ainsi à la dessiccation à marée

basse, en renfermant une petite quantité d'eau à l'intérieur de leur coquille ; et se protégeant de la prédation (Wilbur et Yonge 1964).

I.1 Les gastéropodes en écotoxicologie marine :

I.1.1 Synthèse des bioindicateurs utilisés

Les gastéropodes marins sont principalement benthiques pendant la phase adulte (Ruppert et Barnes, 1994). Ils sont donc en contact à la fois avec les polluants se trouvant dans la colonne d'eau et dans les sédiments. Malgré cela, peu d'attention en écotoxicologie a été portée aux gastéropodes, en comparaison avec les bivalves, possédant pourtant toutes les qualités recherchées chez un bon bioindicateur (Bélangier, 2009). Hung et al. (2001) ont montré pourtant qu'en comparant l'accumulation des éléments traces métalliques chez 30 espèces de mollusques dans les eaux côtières de Taïwan, les concentrations les plus élevées de Cd, Cr, Cu, Pb et Zn ont été mesurées chez les espèces de gastéropodes ; tandis que les bivalves étaient de meilleurs accumulateurs de As, Ni et Sn. Szefer et al. (1999) ont confirmé cette accumulation différentielle entre les bivalves et gastéropodes en évaluant la charge en métaux chez 4 espèces de mollusques (deux bivalves : *Ostrea cucullata* et *Pitar* spp., un gastéropode : *Turbo coronatus* et un polyplacophore *Acanthopleura haddoni*) au niveau du golfe d'Aden, en montrant que les gastéropodes et polyplacophores sont capables d'accumuler plus fortement les métaux. En parallèle, d'autres espèces de gastéropodes ont prouvé leur pouvoir bioaccumulateur de métaux tels que l'ont démontré les travaux de Bryan et al. (1977) sur l'hormeau, *Haliotis tuberculata*, et sur les littorines, *Littorina littorea* (Bryan et al., 1983 ; Noventa et al., 2011) et *Littorina brevicula* (Kang et al., 1999 ; Kim et al., 2003). En Syrie, deux espèces de gastéropodes, *Patella* spp et *Monodonta turbinata*, ont été utilisées pour le suivi de la contamination au Cd, Cu, Hg, Pb, et Zn (Al-Masri, 2002). En Israël, Herut et al. (1999) ont utilisé *Patella* spp. et *Cellana rota* dans le contrôle de la contamination par les métaux trace. Au Liban, des patelles et des monodontes ont été utilisées pour étudier l'accumulation du Cd, Cu, Fe, Hg, Ni et Pb (Shiber et Chatila, 1978; Kayal 1981; Nakhlé, 2003). En Italie, d'autres espèces de gastéropodes ont également été proposées ; *Monodonta turbinata* (Cubadda et al., 2001) et *Patella caerulea* (Campanella et al., 2001; Cubadda et al., 2001; Conti et al., 2007; Storelli et Marcotrigiano, 2005) pour l'évaluation de la contamination métallique. En Turquie (Yüzereroğlu et al., 2010; Aydın-Önen et Öztürk, 2017), en Tunisie (Belkhodja et al., 2012; Rabaoui et al., 2013; Zaidi et al., 2022) et en Iran (Bordbar, 2015), l'espèce *Patella caerulea* a servi d'espèce indicatrice de la pollution métallique. D'autres

espèces de patelles ont également été utilisées dans le *biomonitoring* des contaminations métalliques telles que *Patella piperata* (Bergasa et al., 2007), *P. vulgata* (Duhri and Sayah, 2009), *P. candei* et *P. aspera* (Lozano-Bilbao et al., 2021). Daby, (2006) rapporte également l'utilisation de *Nucella lapillus* en Irlande et de *Thais clavigera* au Japon comme indicateurs de éléments trace métalliques (ETM) alors que Ying et al., (1993) ont fait appel à *Polinices sordidus* pour leurs travaux portant sur l'accumulation et la régulation des ETM dans la zone intertidale de la baie de Quibray, en Australie. D'autres études se sont, pour leur part, focalisées sur l'usage des gastéropodes comme indicateurs de contamination au tributylétain (TBT) dans l'environnement marin (Bauer et al., 1995; Huet et al., 1995; Oehlmann et al., 1998; El Ayari et al., 2018; Otegui et al., 2019). Les gastéropodes peuvent également être utilisés à d'autres fins qu'au *biomonitoring* des ETM et du TBT. Par exemple, des recherches effectuées dans la mer de Bohai, en Chine, par Zhao et al. (2005), ont révélé que les gastéropodes accumulent d'avantage les Bphényles Polychlorés (BPC) que les bivalves. Ils en sont arrivés à la conclusion que certaines espèces de gastéropodes peuvent être utilisées en tant que bioindicateurs ou espèces sentinelles pour l'évaluation du taux de contamination aux BPC le long des côtes chinoises. Finalement, de façon plus générale, Espinosa et al. (2007) proposent d'utiliser la composition des communautés de patelles du port de Ceuta en Espagne comme bioindicateur de l'état des côtes soumises au déversement des eaux usées.

Une analyse de la bibliographie disponible sous PubMed, liée aux mots clés : *gasteropod, marine or seawater or sea/ocean, ecotoxicology or contamination or pollution*, montre que les deux modèles de gastéropodes majoritairement utilisés appartiennent à la famille Littorinidae (genre : *Littorina*) avec 173 publications (Bryan et al., 1983 ; Kang et al., 1999 ; De Wolf et al., 2000 ; Kim et al., 2003 ; Noventa et al., 2011) et la famille Patellidae (genre : *Patella*) avec 115 publications (Davies et Cliffe 2000; Duhri et Sayah 2009 ; Belkhodja et al., 2012 ; Espinosa et Rivera-Ingraham 2016 ; Reguera et al., 2018 ; Viñas et al., 2018 ; Pérez et al., 2019 ; Zaidi et al., 2022) (figure 1). Parmi les autres familles, on peut trouver aussi les Haliotidés (genre : *Haliotis*) avec 79 publications, les Muricidés (genres : *Murex* et *Nucella*) avec 73 publications, les Troquidés (genres : *Gibbula*, *Monodonta* et *Phorcus*) avec 38 publications, les Aplysidés (genre : *Aplysia*) avec 14 publications, les Buccinidés (genre : *Buccinum*) avec 11 publications, les Calyptraeidés (genre : *Crepidula*) avec 5 publications et les Turritellidés (genre : *Turitella*) avec seulement 2 publications.

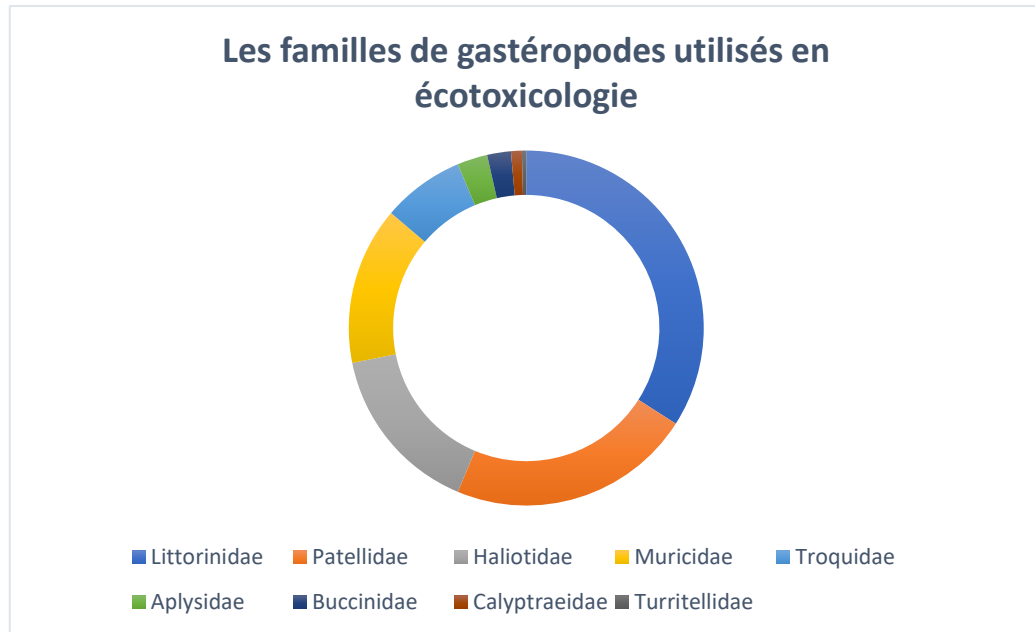


Figure 1: Référencement de publications PubMed utilisant des gastéropodes en écotoxicologie marine

I.1.2 Les biomarqueurs étudiés chez les gastéropodes

Une panoplie de biomarqueurs a été étudié chez les gastéropodes en tant qu'organismes indicateur de la qualité de l'environnement. L'Imposex est un type de pseudohermaphrodisme affectant les gastéropodes de type Prosobranch. Ce phénomène a été décrit pour la première fois en 1970 et est caractérisé par le développement de caractères sexuels mâles, notamment un pénis, un spermiducte et/ou des canaux déférents chez un gastéropode femelle. Ce phénomène a été observé en France chez *Ocenebra erinaceus*, *Hinia reticulata* (Huet et al., 1995), *Nucella lapillus*, (Huet et al., 1995; Oehlmann et al., 1998), en Tunisie et en Algérie chez *Stramonita haemastoma* (El Ayari et al., 2018), et au Brésil chez *Leucozonia nassa* et *Stramonita brasiliensis* (Otegui et al., 2019) suite à la présence de tributylétain (TBT) dans le milieu marin. Cependant, vers le milieu des années 1990s, on a découvert que le gastéropode *Littorina littorea* n'est pas affecté par l'Imposex mais développe des malformations de l'appareil génital féminin en présence de fortes concentrations de TBT. Ce phénomène, appelé Intersex, est caractérisé par des altérations au niveau de l'oviducte. Il comprend quatre stades d'altérations à partir desquels les chercheurs ont développé un indice, le ISI (InterSex Index), servant de biomarqueur d'évaluation des taux de contamination au TBT (Bauer et al., 1995; Oehlmann et al., 1998). En plus des biomarqueurs de perturbation endocrinienne, l'activité de

l'acétylcholinestérase (ACHE) a été évaluée comme biomarqueur de neurotoxicité chez les gastéropodes exposés à des stress environnementaux. Gaitonde et al. (2006), par exemple, ont mesuré l'ACHE chez un Muricidé, *Cronia contracta*, afin d'évaluer le degré de contamination par les contaminants neurotoxiques (métaux, hydrocarbures pétroliers) de la côte de Goa en Inde. Douhri et Sayah (2009) ont étudié le même biomarqueur chez des individus de *Patella vulgata* prélevés dans des stations marines chargées en métaux au niveau de la baie de Tanger au Maroc. D'autres biomarqueurs ont été également étudiés chez les gastéropodes en écotoxicologie, tel que le présente le tableau 1 ci-après.

Tableau 1: Biomarqueurs utilisés chez différentes espèces de gastéropodes marins

Espèces	Biomarqueurs	Contaminants	Référence
<i>Patella caerulea</i>	CAT, SOD, GPX, MDA	Métaux	(Zaidi et al., 2022)
<i>Leucozonia nassa</i> , <i>Stramonita brasiliensis</i>	Imposex	TBT	(Otegui et al., 2019)
<i>Stramonita haemastoma</i>	Imposex	TBT	(El Ayari et al., 2018)
<i>Patella ferruginea</i>	CAT, SOD, GST	Métaux	(Espinosa et Rivera-Ingraham, 2016)
<i>Patella caerulea</i>	GnRH	Xénoestrogènes	(De Lisa et al., 2013)
<i>Cymbulla nigra</i>	CAT, SOD, GST, α -tocophérol, β -carotène	Métaux	(Rivera-Ingraham et al., 2013)
<i>Patella caerulea</i>	P450	HAP	(Bonacci et al., 2007)
<i>Cronia contracta</i>	ACHE	Métaux + HCP	(Gaitonde et al., 2006)
<i>Patella vulgata</i>	Induction des Métallothionéines (MT)	Métaux	(Brown et al., 2004)
<i>Nucella lapillus</i>	Imposex	TBT	(Oehlmann et al., 1998)
<i>Littorina littorea</i>	Intersex	TBT	(Oehlmann et al., 1998)
<i>Littorina littorea</i>	Incidence et/ou intensité des infiltrations d'hémocytes et des granulocytes dans la glande intestinale et la muqueuse de l'intestin	TBT	(Watermann et al., 1996)
<i>Littorina littorea</i>	Intersex	TBT	(Bauer et al., 1995)
<i>Ocenebra erinaceus</i> , <i>Hinia reticulata</i> <i>Nucella lapillus</i> ,	Imposex	TBT	(Huet et al., 1995)
<i>Littorina littorea</i>	MT	Métaux	(Bebianno et al., 1992)
<i>Patella caerulea</i>	EROD, NADPH, P450	PCB	(Yawetz et al., 1992)
<i>Patella vulgata</i> , <i>Patella intermedia</i>	MT	Métaux	(Howard et Nickless, 1977)

II. Les métaux trace dans les systèmes aquatiques

II.1 Généralités

Les métaux sont naturellement présents dans la croûte terrestre. Ce sont de bons conducteurs de chaleur et d'électricité. Généralement malléables et ductiles, ils se combinent aisément avec d'autres éléments pour former des alliages utilisés par l'homme depuis l'Antiquité. Si les métaux sont souvent indispensables au déroulement des processus biologiques (« oligo-éléments » ou « essentiels »), nombre d'entre eux peuvent devenir toxiques pour diverses formes de vie, lorsque leur concentration dépasse une valeur seuil, elle-même dépendante de l'état physico-chimique (spéciation) de l'élément considéré. C'est le cas du chrome (Cr), du cuivre (Cu), du fer (Fe), du manganèse (Mn), du molybdène (Mo), du Nickel (Ni), du sélénium (Se), du vanadium (V) et du zinc (Zn) (Miquel 2001; Calabrese et Baldwin 2003). D'autres éléments semblent moins essentiels et ne sont pas nécessaires à la vie et peuvent être même préjudiciables à de très faibles concentrations comme l'argent (Ag), l'arsenic (As), l'antimoine (Sb), le cadmium (Cd), le mercure (Hg), le plomb (Pb) et le titane (Ti). Ces derniers, anciennement nommés « métaux lourds » de par leur masse volumique supérieure à 5000 kg/m^3 , sont regroupés actuellement sous le terme « éléments trace métalliques » (ETM) ou par extension « éléments trace ». Enfin, certains éléments sont considérés comme « métaux pauvres » car ils ont une faible densité comme l'aluminium (Al) (Casas, 2005; Chiffolleau, 2001; Pavlaki et al., 2016).

Dans les milieux aquatiques, les métaux se trouvent généralement en faibles concentrations, de l'ordre du nanogramme par litre. Cependant, en raison de diverses activités anthropogéniques, les métaux sont devenus les contaminants les plus ubiquistes à la surface de la Terre (Wang et al., 2013 ; Kaste et al., 2018 ; La Colla et al., 2021). Par exemple, des concentrations élevées de Cd, Cu, Fe, Pb et Zn sont couramment signalées dans les sédiments, l'eau et les composants des écosystèmes biotiques (Ansari et al., 2004; Ayari et al., 2016; Mezghani-Chaari et al., 2015).

II.2 Sources des métaux dans le milieu marin

Les métaux qui se trouvent dans l'environnement aquatique proviennent soit de sources naturelles liées à l'érosion de la croûte terrestre et de l'activité volcanique ; soit de sources anthropiques telles que la libération d'effluents industriels et d'eaux résiduaires industrielles déversés directement dans les fleuves, de ruissellement agricole, de déchets liquides ou solides

résultant des extractions minières et des déchets domestiques (ruissellement, dépôt). Les canaux, rivières, fleuves, mer et océans, sont malheureusement depuis longtemps l'exutoire des déchets terrestres (Ifremer, 1995; Miquel, 2001).

II.3 Domaines d'utilisation des métaux

Aujourd'hui les métaux sont utilisés pour de multiples applications : additifs au plomb dans les carburants, nickel ou cadmium dans les batteries d'accumulateur, sels d'argent de l'industrie photographique, câbles électriques en cuivre, gouttières en zinc, aciers inoxydables chromés, ou des produits phytosanitaires riches en arsenic (Casas, 2005; Chiffolleau, 2001). L'usage des métaux sous forme de nanoparticules a récemment accentué leurs usages (antifongique, désinfectant, adjuvant aux vaccins,...) (Shnoudeh et al., 2019).

II.4 Incorporation des métaux dans la biomasse

II.4.1 Répartition et devenir des métaux dans l'environnement marin

Une fois arrivés dans l'environnement marin, les métaux se répartissent entre les différents compartiments (eau, matière en suspension, sédiments et biote) sous des formes physico-chimiques variées. Dans la phase soluble, les métaux peuvent être présents sous forme d'ions hydratés, de complexes organiques et inorganiques, ou associés à la phase colloïdale (Batley, 1989). En revanche, dans la phase particulaire (matière en suspension ou sédiments), les métaux peuvent être adsorbés sur les argiles des sédiments, liés à la matière organique particulaire ou associés aux carbonates (Geffard et al., 2001). Ainsi, la majeure partie des métaux présents dans les eaux de surface s'accumule finalement dans les sédiments où ces métaux se lient à des ligands inorganiques et organiques, réduisant ainsi leur mobilité et biodisponibilité. Divers facteurs abiotiques (pH, salinité, température, potentiel d'oxydoréduction...), qui régissent la circulation de l'eau dans l'hydrosphère, peuvent conditionner la répartition et la dispersion des ETM dans l'eau favorisant ou non leur assimilation par les organismes vivants (figure 2). Cette remobilisation des métaux peut être à l'origine des modifications physico-chimiques du milieu aqueux (Ramade, 2007).

Les organismes vivants, étant en interaction avec leur environnement, vont incorporer toute substance qui contamine le milieu naturel, y compris les métaux, au travers de leurs processus métaboliques. Les métaux incorporés vont ainsi être transférés dans les réseaux trophiques des divers écosystèmes, s'intégrer ainsi au cycle de la matière dans les biocénoses et exercer une action néfaste sur d'innombrables espèces vivantes. L'existence d'organismes

migrateurs (poissons, tortues...) facilite considérablement la contamination des réseaux trophiques appartenant à des biocénoses géographiquement éloignées des zones de rejet (Ramade, 2007).

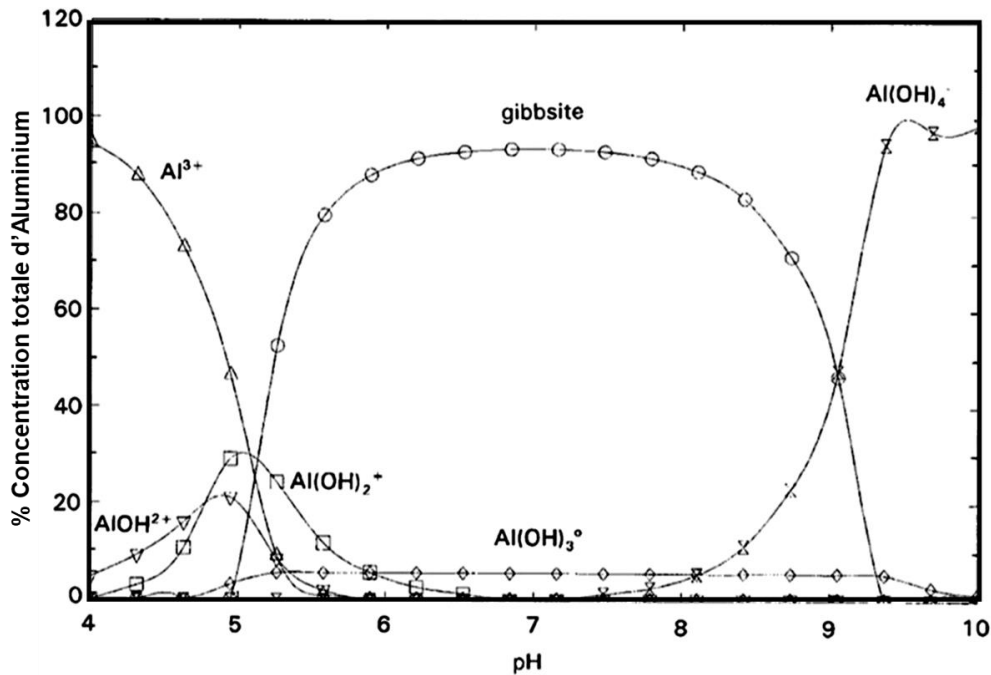


Figure 2: Modification de la répartition des différentes espèces chimiques de l'aluminium en fonction du pH (D'après Gensemer et Playle, (1999))

II.4.2 Influence de la dégradabilité :

Le comportement de toute substance introduite dans les écosystèmes et leurs biocénoses est conditionné tout d'abord par leurs caractéristiques physico-chimiques qui conditionnent sa stabilité ou bien sa (bio)dégradabilité. Fort heureusement, un grand nombre de polluants dispersés dans l'environnement sont instables. Ils sont très vite neutralisés par des processus abiotiques sous l'action des facteurs physico-chimiques conduisant à leur transformation et/ou destruction en dérivés de toxicité atténuée voire nulle. Parmi ces processus, la photodégradation, la photolyse, l'hydrolyse et l'oxydation ainsi que les réactions acido-basiques jouent un rôle important pour les composés inorganiques. En outre, dans bien des cas, les bactéries aquatiques joueront un rôle actif dans la décomposition des contaminants, dénommée alors : biodégradation, permettant ainsi d'accélérer leur élimination des biotopes aquatiques contaminés. Malheureusement, il existe diverses familles de contaminants pas ou peu biodégradables : c'est le cas de certaines formes chimiques de métaux ou de métalloïdes toxiques (Ramade 2007; Chrzanowski et Ławniczak 2020).

III. Bioaccumulation et bioconcentration :

III.1 Notion de biodisponibilité :

En écotoxicologie, la valeur de la concentration « inerte » d'un contaminant ou d'un métal dans l'écosystème n'a aucune signification tant qu'elle n'apporte aucune information sur la fraction réellement absorbable par les organismes vivants et donc disponible pour ces derniers. La biodisponibilité d'un contaminant est donc la fraction de la quantité totale de ce dernier présente dans le biotope qui est absorbable par les organismes vivants (producteurs, consommateurs ou décomposeurs) et qui peut être transférée, stockée et métabolisée par ces derniers (Kordel et al., 1997 ; Ramade, 2007). Certains auteurs considèrent qu'un métal est biodisponible s'il est assimilable par les organismes (Wang, 1987) , pour d'autres il faut en plus qu'il soit susceptible d'induire un effet (Campbel, 1995). La biodisponibilité des métaux ingérés dans la nourriture dépend des processus de digestion du consommateur et aussi de la concentration et de la nature du métal dans la nourriture. Ceux-ci varient selon le pH digestif et selon l'activité enzymatique digestive en relation avec les substrats présents dans la nourriture. De plus, l'absorption et la toxicité des métaux sont également influencées par les paramètres physico-chimiques de l'eau (alcalinité, dureté, pH, taille des particules de sédiment, température, ...etc), la taille de l'organisme vivant, les stades de développement, le sexe, l'espèce et les habitudes alimentaires (Wang 1987; Schäfer et al., 2015; Rumisha et al., 2017a). Elle est aussi dépendante de l'état chimique (spéciation) des métaux ainsi que tous facteurs gouvernant la spéciation. Ainsi, le Cr^{3+} est beaucoup moins toxique que le Cr^{6+} ; de même une concentration identique de plomb présentera sous forme de nitrate une toxicité 10^{-4} fois plus faible pour les animaux marins que si elle est sous forme de plomb tétraéthyle (Ramade, 2007).

III.2 Bioconcentration, bioaccumulation et bioamplification

La bioconcentration est l'accumulation par un organisme d'un contaminant à partir de l'eau uniquement par les voies cutanées et d'inhalation.

La bioaccumulation est l'accumulation d'une substance à partir de l'eau et de la nourriture. L'apport de contaminant par voie alimentaire implique donc qu'il y ait eu bioconcentration aux niveaux trophiques inférieurs.

La biomagnification (bioamplification) traduit l'augmentation de la contamination d'un niveau trophique à l'autre (Hédouin et al., 2006 ; Ramade, 2007 ; Bordbar, 2015).

Les animaux aquatiques piégeront les ETM par deux voies principales : par transfert cutané, à partir de l'eau (voie directe), et par ingestion, à partir de la nourriture (voie trophique)

(Gourlay-Francé et al., 2010). Cette dernière est constituée de particules inertes sous forme de sédiments et des particules vivantes (ex : les algues unicellulaires). Les métaux franchiront donc les structures biologiques comme l'épithélium branchial et l'ensemble du tractus digestif (Batley 1989; Deb et Fukushima 1999). Un être vivant qui a accumulé des métaux dans son organisme va servir de nourriture à d'autres espèces qui accumuleront à leur tour les fractions métalliques qui n'ont pas été métabolisées (bioamplification) (Burger, 2008; Fatima et al., 2020). De ce fait, il va se produire une contamination de proche en proche, de tout le réseau trophique de l'écosystème initiée par les producteurs primaires qui « pompent » les polluants dispersés dans l'environnement (Ramade, 2007). Ainsi, les métaux trace accumulés peuvent menacer la santé publique, surtout si les métaux s'accumulent dans la faune comestible. Pour cette raison, différents pays et organisations ont élaboré des directives pour limiter la quantité de métaux nocifs contenus dans la faune comestible (EC, 2011; EFSA, 2011; WHO, 2011).

III.3 Régulation et détoxification :

Quelle que soit la voie qui a permis l'absorption de l'élément, l'ion métallique sera souvent complexé à un transporteur ou ligand (acide aminé ou protéine), et « acheminé » ainsi vers des sites de stockage ou d'excrétion. Les organismes marins sont dotés de nombreux mécanismes physiologiques et biochimiques qui leurs confèrent la capacité de détoxifier et d'empêcher l'accumulation des ETM dans leur corps. Il existe en effet des mécanismes de régulation physiologique qui équilibrent les taux d'excrétion des métaux avec leur absorption (soit par leur élimination rapide de l'élément absorbé, soit par le rejet de conjugués suite à sa biotransformation), des mécanismes de séquestration intracellulaire qui impliquent la liaison aux métallothionéines et l'élimination par le système endomembranaire lysosomal et des processus de séquestration intracellulaire impliquant des vacuoles spécifiques produisant des granules métalliques solides de phosphore ou de soufre qui subissent ensuite une exocytose pour assurer leur élimination (Mason et Nott 1981 ; Deb et Fukushima 1999 ; Ahearn et al., 2004 ; Rumisha et al., 2017b). Des effets toxiques se produisent lorsque les métaux dépassent le seuil de concentration « tolérable », celui-ci correspond à la concentration dépassant le taux combiné maximal d'excrétion et de détoxification des métaux métaboliquement disponibles (Louzon et al., 2020; Rainbow, 2002).

IV. Toxicités aiguë et chronique.

La toxicité intrinsèque d'une substance définit son degré de dangerosité. Cette toxicité est évaluée en laboratoire à l'aide de tests sur différents organismes de la chaîne trophique, et permet de déterminer une concentration en dessous de laquelle la substance n'a pas d'effets nocifs sur l'organisme testé (NOEC ; *No Observed Effect Concentration*).

Il existe deux types de toxicité qui se distinguent selon la rapidité d'apparition, la sévérité et la durée des symptômes, ainsi que la rapidité d'absorption de la substance toxique (figure 3) :

1/ Toxicité aiguë : elle apparaît suite à une exposition de courte durée. Les effets observés sont rapides et parfois mortels. Les polluants peuvent être toxiques à des doses de l'ordre du microgramme par litre (Boucheseiche et al., 2002).

2/ Toxicité chronique : les effets apparaissent après une exposition prolongée à la substance mais sont imperceptibles sur une courte échelle de temps. Elle se produit lors d'une absorption de très faibles concentrations d'une substance toxique. On dit que la substance présente des effets toxiques cumulatifs. Les effets toxiques s'expriment donc après un temps de latence relativement long. La substance peut également provoquer, à de faibles concentrations, de légers symptômes (figure 3). Lorsque ces symptômes se prolongent dans le temps, ils entraînent un dysfonctionnement de l'organisme plus important. La dose seuil à dépasser pour observer une toxicité aiguë est toujours plus élevée que celle liée au déclenchement d'une toxicité chronique (figure 3) (Boucheseiche et al., 2002).

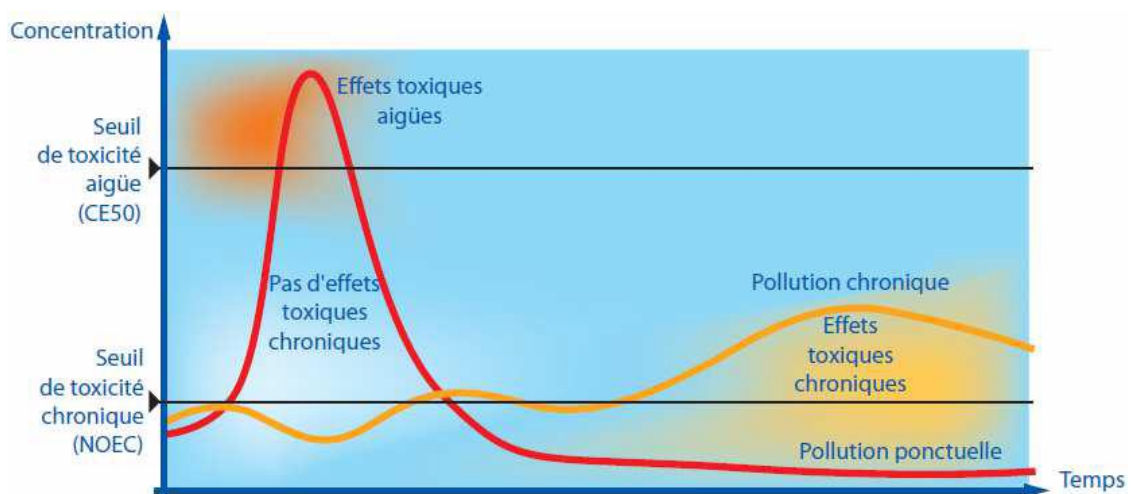


Figure 3: Principes des toxicités aiguë et chronique

Pour évaluer la toxicité d'une substance, des tests standardisés en laboratoire peuvent être développés (Forbers et al., 1997). Des organismes sont alors mis en contact avec un polluant dont on veut estimer la toxicité afin d'appréhender les niveaux de concentration provoquant des effets toxiques (baisse de reproduction, baisse de respiration, mortalité...). Ces tests sont menés dans des conditions contrôlées de lumière, température, milieu de culture ou support d'élevage. Ils ont un rôle préventif dans la gestion des risques environnementaux (Boucheseiche et al., 2002).

V. Evaluation des risques de contamination des écosystèmes

Analyser les concentrations des polluants dans la composante abiotique de l'écosystème renseigne sur la qualité de cette ressource (Li et al., 2010), mais ne permet pas de révéler d'éventuelles perturbations perpétrées en dehors des périodes de mesures ponctuelles. En écotoxicologie, la démarche de chimie analytique bien qu'elle constitue un outil incontournable, n'est en aucun cas la finalité même. De même, se limiter à la connaissance de la concentration d'un polluant dans le milieu inerte n'apporte aucune information sur l'état des organismes qui y habitent ni sur les conséquences écologiques engendrées par les changements survenus dans cet écosystème (Ramade, 2007; Zhou et al., 2008). Cela ne permet donc pas de quantifier la biodisponibilité réelle des polluants pour les organismes vivants (Wells et al., 1997), ce qui est pourtant une information importante pour définir des mesures à développer pour améliorer l'état de santé des écosystèmes et protéger leur intégrité et leur biodiversité (Touze et al., 1997 ; Ramade 2007). Par exemple, dans le cas d'une pollution métallique, la mesure des concentrations des métaux dans le biotope (eau, sédiment) peut révéler l'existence d'une pollution, mais ne renseigne pas sur le degré d'accumulation des métaux par les individus, ni la toxicité engendrée sur les organismes et l'écosystème (Zhou et al., 2008). En conséquent, ces dernières années, les études en écotoxicologie se sont développées afin de mettre en place le concept appelé « *biomonitoring* » ou *monitoring* de l'environnement ou encore biosurveillance destiné principalement à évaluer la nature et l'importance des effets écotoxicologiques des polluants dans l'environnement. Cet outil constitue l'autre facette incontournable de la surveillance de la pollution environnementale, tout aussi essentielle que le *monitoring* chimique (Ramade, 2007; Al Kaddissi, 2012; Zaidi et al., 2022).

V.1 La mesure de la contamination des organismes - Les bioindicateurs de contamination

La mesure de la contamination des organismes représente la première démarche du *monitoring* de l'environnement et relève du *monitoring* chimique. La plupart des polluants, qu'ils soient organiques ou minéraux se présentent à des concentrations bien supérieures dans les êtres vivants par suite des phénomènes de bioconcentration et/ou de bioamplification. Ainsi, l'analyse des organismes vivants mesure la disponibilité réelle des polluants pour la biomasse, ce qui est beaucoup plus significatif que la simple connaissance de la concentration d'un polluant dans le milieu inerte. Cette démarche permet de s'assurer que des polluants ne sont pas rejetés dans l'environnement au-delà de certaines concentrations seuils ou encore que certaines espèces d'intérêt économique ne sont pas contaminées au-delà des concentrations maximales admissibles pour la santé humaine. Cela s'effectue grâce à l'évaluation des quantités et de la distribution de certains polluants dans des individus d'espèces choisies pour leurs particularités bioécologiques appelés indicateurs biologiques de pollution ou encore dénommés bioindicateurs.

Les degrés d'assimilation et d'accumulation des métaux chez les organismes vivants sont souvent des processus assez complexes qui varient d'une espèce à une autre (Casas, 2005) et qui dépendent des formes chimiques de chaque élément (Bowen, 1966). Selon Phillips et Rainbow (1994), Ramade (2007) et Zhou et al. (2008), pour constituer un bon « bioindicateur quantitatif », l'espèce animale utilisée doit présenter idéalement les caractéristiques requises suivantes :

- ✓ Être capable d'accumuler les polluants à des niveaux élevés, sans effet létal, aux concentrations rencontrées dans le milieu.
- ✓ Avoir une mobilité réduite (sédentaire) afin d'être représentatif d'une contamination localisée dans son milieu.
- ✓ Être abondant et présenter une grande distribution pour un échantillonnage répétitif et pour favoriser les comparaisons entre zones distinctes.
- ✓ Avoir une durée de vie assez longue pour permettre un échantillonnage sur plusieurs classes d'âge si nécessaire et de disposer de preuves expérimentales sur les effets à long terme.
- ✓ Avoir une taille suffisante afin de donner une quantité de tissus adéquate pour analyse.
- ✓ Être facilement échantillonné et maintenu au laboratoire.
- ✓ Occuper une position importante dans la chaîne trophique.

La fiabilité d'un bioindicateur dans l'estimation de la concentration des polluants dépend de nombreux facteurs qui peuvent être regroupés en deux catégories : la première correspond aux facteurs propres aux caractéristiques de l'espèce bioindicatrice donc intrinsèques, la seconde aux facteurs extrinsèques, c'est-à-dire abiotiques environnementaux (tableau 2). Il est important aussi de tenir compte des éventuelles interactions physio-toxicologiques entre polluants lorsque l'on étudie des espèces bioindicatrices (Ramade, 2007).

Tableau 2: Facteurs qui influencent la fiabilité des bioindicateurs (Ramade, 2007)

Facteurs intrinsèques	Facteurs extrinsèques
-l'état écophysiologique des individus -la dynamique des populations étudiées -les taux d'accumulation et de dégradation/excrétion -le niveau trophique des organismes	-la température -les précipitations -le pH -la salinité

V.2 Bioindicateurs d'effets : *monitoring* d'espèces « sentinelles » ou encore d'altération des communautés par les polluants

Dans une démarche de *monitoring des changements produits par les polluants*, il est possible de mettre en évidence dans chaque écosystème un ensemble d'espèces « sentinelles », attestant d'un effet écotoxicologique de polluants, même s'ils sont présents à très faible concentration (Ramade, 2007). Blandin (1986) indique que ce sont « *un organisme ou un ensemble d'organismes qui, par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques, permet, de façon pratique et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un éco-complexe et de mettre en évidence, aussi précocement que possible, leurs modifications naturelles ou provoquées* ».

Certains organismes peuvent être utilisés, selon l'objectif, comme bioindicateurs quantitatif de l'accumulation des contaminants et/ou comme bioindicateurs d'effets ou d'altération de communautés par les polluants (« sentinelles »). En fait, certaines espèces bioindicatrices d'accumulation sont d'excellents exemples de « sentinelles », par exemple les lichens qui servent depuis longtemps à estimer la pollution atmosphérique par le dioxyde de soufre (SO₂). Par ailleurs, rien n'empêche de rechercher des paramètres au niveau biochimique, cytologique ou moléculaire chez des espèces bioindicatrices d'accumulation pour mieux caractériser la qualité du milieu (Rivière, 1993).

V.3 Les biomarqueurs

Toute substance introduite dans l'environnement peut affecter différents niveaux d'organisation biologique (figure 4). Il est désormais possible de mesurer les modifications des réponses biologiques induites par l'exposition des organismes à des xénobiotiques et identifier les mécanismes moléculaires de leur action toxique, c'est le concept des biomarqueurs. La figure 5 met en évidence la place des biomarqueurs dans les différents domaines d'investigation de l'écotoxicologie et l'importance des méthodes basées sur des observations qualitatives et/ou quantitatives (surveillance biologique) pour pallier les insuffisances des méthodes chimiques. Ces derniers représentent des processus physio-toxicologiques qui caractérisent la réaction d'un organisme face à son exposition à un polluant. Parmi les définitions concernant les biomarqueurs qui ont été énoncées au cours de ces dernières années, nous retiendrons la suivante : « *Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental révélant l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant* » (Amiard et Amiard-Triquet, 2008).

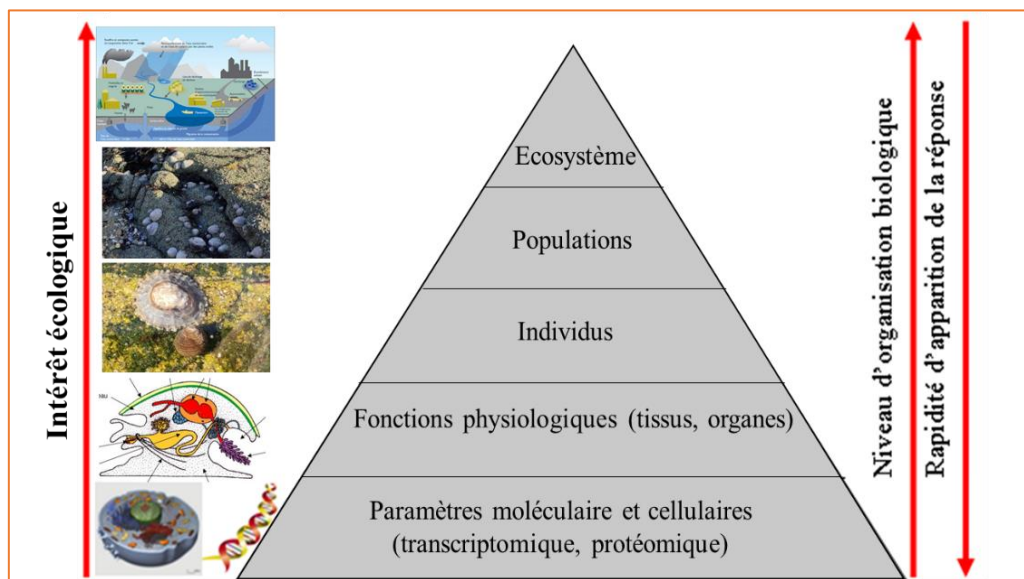


Figure 4: Les différents niveaux d'organisation pouvant être affectés par les polluants et la rapidité de la réponse. Ce schéma illustre aussi l'intérêt écologique des différents niveaux dans la recherche.

Modifié d'après Snape et al., (2004) et Al Kaddissi (2012)

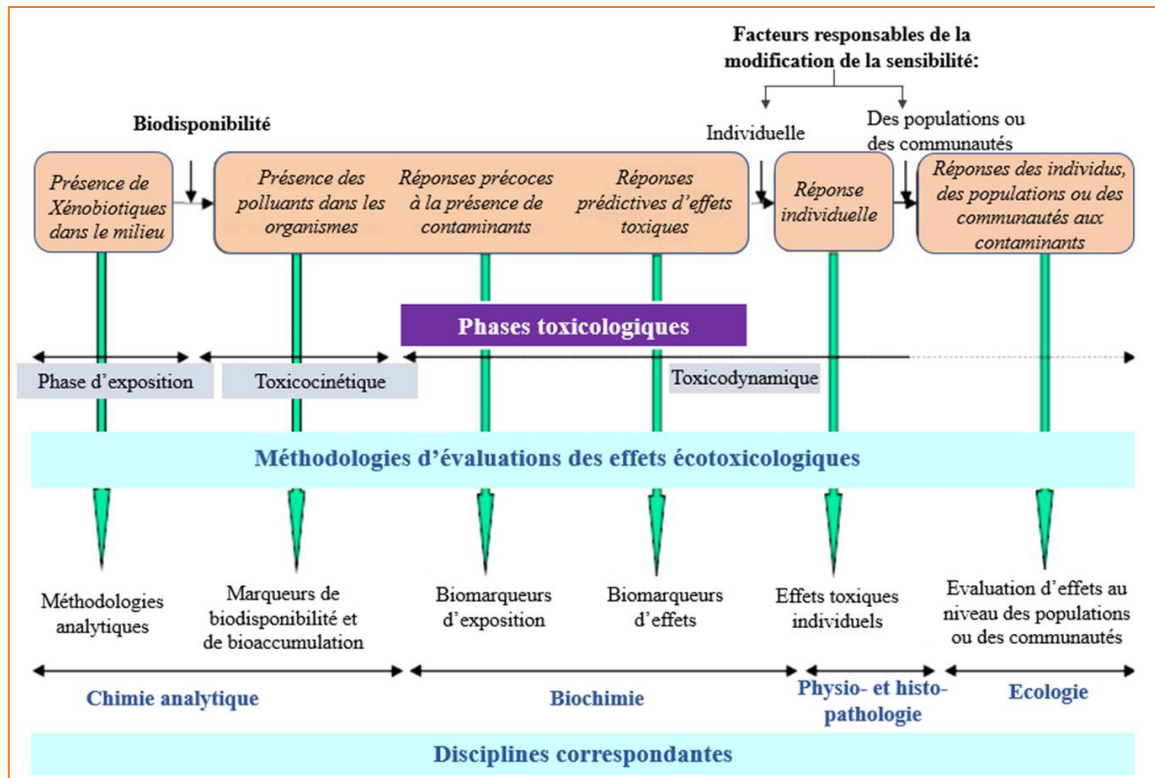


Figure 5: Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques (modifiée d'après Lagadic et al., 1997)

Il existe une relation entre l'importance de l'exposition ou l'état de santé d'un organisme et le type de biomarqueurs impliqués (Depledge, 1994; Garric et al., 2010). La figure 6 montre qu'un organisme est considéré en « bonne santé », dans un état d'homéostasie en absence de toute contamination. En fonction de l'accroissement de la contamination ou de la durée d'exposition, cet organisme va présenter des altérations fonctionnelles visibles pouvant entraîner sa mort à plus ou moins long terme. Des réactions de compensation vont apparaître pour neutraliser, jusqu'à un certain seuil, les effets toxiques des polluants (dégradation/détoxification). D'autres biomarqueurs, dits de non-compensation, interviennent une fois la limite des réactions compensatrices atteinte, indiquant que les dommages pathologiques deviennent irréversibles. Toutefois, si le contaminant est retiré rapidement de l'environnement, l'organisme pourrait retrouver son état normal (l'altération est alors réversible). La santé des individus est en somme compromise par des altérations physio-toxicologiques d'abord réversibles puis irréversibles entraînant inéluctablement leur mort (figure 6).

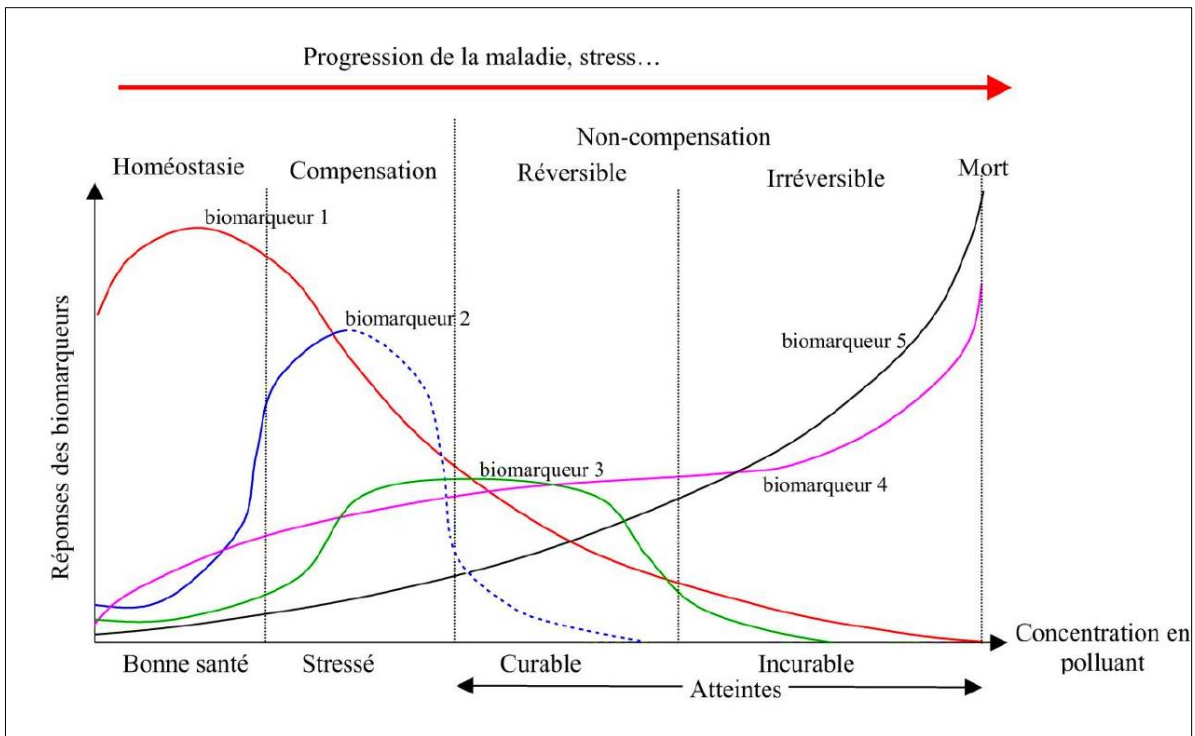


Figure 6: L'évolution du rôle des biomarqueurs en fonction de l'accroissement de la concentration d'un polluant ou de la durée d'exposition (Icarus et Moore, 2004)

V.4 Les catégories de biomarqueurs

Les biomarqueurs ont été classifiés en trois catégories : 1/ Les biomarqueurs de défense ou d'adaptation, 2/ ceux d'effet ou de dommage et 3/ ceux de susceptibilité/sensibilité ou de génotoxicité (López-Barea, 1995; van der Oost et al., 2003; Ramade, 2007; Al Kaddissi, 2012).

V.4.1 Les biomarqueurs de défense ou d'adaptation

Les biomarqueurs de défense signalent l'exposition des systèmes biologiques à un (des) polluant(s) et donc témoignent de la biodisponibilité de ces derniers pour les organismes. Ils correspondent à la phase I de l'action d'un contaminant xénobiotique (biomarqueurs de 1 à 3 dans la figure 6). Ils s'expriment pour contrecarrer la présence des polluants et leurs effets. Par exemple, ils correspondent aux divers antioxydants (catalase, GPx, SOD), de biotransformation (P450, GST) et de réponses générales aux stress (HSP...).

V.4.2 Les biomarqueurs de dommage ou d'effet

Les biomarqueurs d'effet traduisent les altérations physio-pathologiques (féminisation, inhibition enzymatique, peroxydation lipidique) suite à l'exposition à un polluant. Ils correspondent à la phase II de l'action d'un contaminant xénobiotique (les biomarqueurs 4 et 5

dans la figure 6). On peut citer par exemple l'expression anormale de vitellogénine et l'inhibition des estérases.

V.4.3 Les biomarqueurs de susceptibilité/sensibilité ou de génotoxicité

Les biomarqueurs de sensibilité illustrent l'atteinte à l'intégrité du support génétique (ADN, chromatine). Cela peut inclure les études des modifications épigénétiques, formation de micro-noyaux et de fragmentation de l'ADN.

VI. Généralités sur le stress oxydatif

Les métaux biodisponibles peuvent induire directement, dans les cellules vivantes des organismes marins, la production de espèces réactives de l'oxygène (ERO), ou « *Reactive oxygen species* » (ROS) en anglais (Vlahogianni et al., 2007) (tableau 3) par la voie mitochondriale due à une activité accrue de la chaîne de phosphorylation oxydative permettant la formation d'ATP accentuée pour répondre au stress cellulaire. Les principales ERO générées incluent des radicaux libres, l'oxygène singulet ($\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Bartosz, 2003). H_2O_2 est considéré comme un précurseur cellulaire primaire du radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) et constitue une forme très réactive et toxique de ROS. Son retrait est considéré comme une importante stratégie de défense contre le stress oxydatif chez organismes marins (Regoli et al., 2002a ; Vlahogianni et al., 2007). Ces produits, de par leurs concentrations dans les cellules, vont perturber l'intégrité protéique et induire des altérations sur l'ADN et les membranes cellulaires en attaquant les lipides constitutifs par oxydation lipidique (Favier, 2003; Sarker et al., 2018). Aux radicaux oxygénés libres, se rajoutent les radicaux dérivés d'acides gras insaturés [exp : le radical lipidique peroxy ($\text{LOO}\cdot$), le peroxy-nitrite ($\text{ONOO}\cdot$) et le monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$)] (Bartosz, 2003; Meziti, 2009).

Tableau 3: Les différents radicaux libres oxygénés (Valko et al., 2006 ; Vlahogianni et al., 2007)

Radicaux libres réactifs à l'oxygène	
$\text{O}_2\cdot^-$	Radical superoxyde
$\text{HO}_2\cdot$	Radical perhydroxyle
$\cdot\text{OH}$	Radical hydroxyle
$\text{RO}_2\cdot$	Radical peroxy (exp : $\text{HOO}\cdot$, le radical hydroperoxyde)
$\text{RO}\cdot$	Radical alkoxy (où R est une chaîne carbonée)

VI.1 Les mécanismes antioxydants

Les mécanismes antioxydants reposent essentiellement sur l'expression d'enzymes capables de prendre en charge et d'éliminer les ERO (Beauchamp et Fridovich 1971; Dinis et al., 1994). Les organismes disposent d'un arsenal de défenses antioxydantes à la fois enzymatiques et non enzymatiques afin de lutter contre un excès de concentration de ERO (Fernández et al., 2010a).

VI.1.1 Le système antioxydant enzymatique

Le système antioxydant enzymatique est principalement formé par des molécules dont les actions s'effectuent en cascade (figure 7), comme les catalases (CAT), les superoxydes dismutases (SOD) et les glutathions peroxydases (GPx).

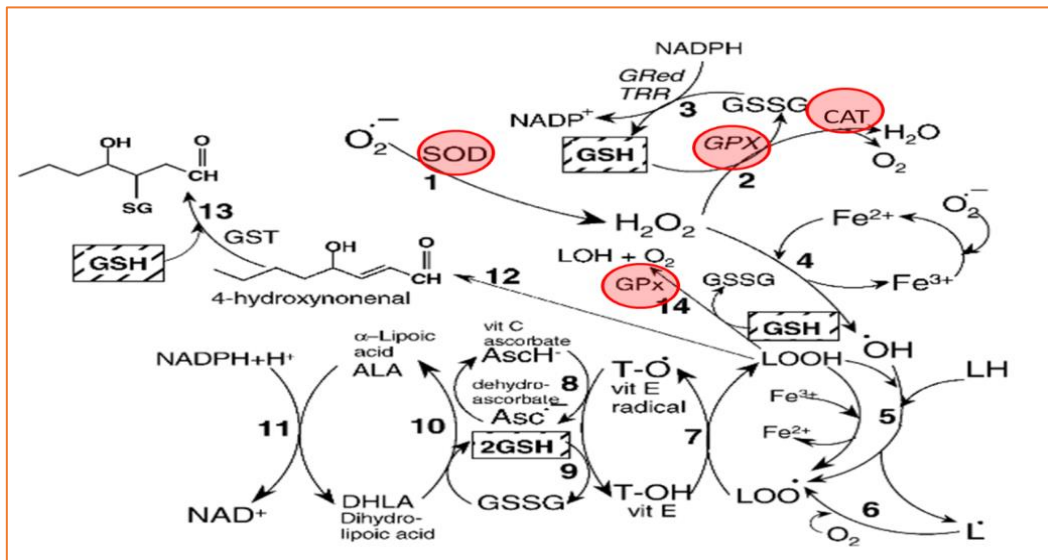


Figure 7: Systèmes enzymatiques et non enzymatiques impliqués dans la défense contre le stress oxydant (adaptée d'après Valko et al., (2006)). Les enzymes encadrées en rouge sont celles qui seront étudiées dans ce travail de thèse.

VI.1.1.1 La catalase (CAT)

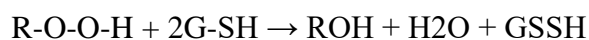
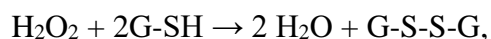
La catalase (CAT) est une enzyme hémique (qui contient du fer hémique au niveau des sites actifs de la protéine) localisée majoritairement dans les peroxysomes. Son activité antioxydante a une grande importance, car elle empêche la conversion du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en ion hydroxyde (OH^-), très nocif pour les cellules, en catalysant sa décomposition en eau et oxygène selon la réaction simplifiée : $2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$ (Cutler, 1984; Michiels et al., 1994). Cette réaction est une stratégie importante des organismes marins contre le stress oxydatif (Regoli et al., 2002a, 2002b).

VI.1.1.2 La superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme souvent présente chez les organismes aérobiques. C'est une métalloprotéine à Cu et à Zn présente dans le cytosol des eucaryotes (Cu/Zn SOD) et à Mn dans les mitochondries (Mn SOD). L'action de la SOD consiste à catalyser la dismutation du radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), très réactif avec les molécules biologiques, en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), moins toxique, selon la réaction : $2H^+ + O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} \rightarrow O_2 + H_2O_2$ (Michiels et al., 1994 ; Silvestre, 2005 ; Aschner et Jiang, 2009). Le H_2O_2 demeurant toutefois toxique pour la cellule, sera neutralisé par d'autres enzymes : la catalase et la glutathion peroxydase (Kono et Fridovich, 1982; Michiels et al., 1994).

VI.1.1.3 La glutathion peroxydase (GPx)

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme localisée dans le cytosol et les mitochondries. Elle intervient avec la catalase dans la neutralisation de l' H_2O_2 par le glutathion (tripeptide constitué de glutamate, cystéine et glycine) (Blum et Fridovich, 1985; Labrot et al., 1996) et aussi dans la destruction des hydroperoxydes lipidiques issus de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Valko et al., 2006) selon les réactions respectives :



VI.1.2 Le système antioxydant non enzymatique

Le système antioxydant non enzymatique est composé principalement par des molécules antioxydantes hydrosolubles (la glutathion, la vitamine C, l'acide urique) et liposolubles (la bilirubine, la vitamine E, les caroténoïdes) qui interviennent dans la régulation des taux des ERO et des ions métalliques au niveau des membranes cellulaires et des lipoprotéines plasmatiques (Michiels et al., 1994 ; Favier, 2003 ; Meziti, 2009). Le but de ces mécanismes étant de maintenir la balance oxydants/pro-oxydants en équilibre. En cas de production excessive des ERO ou d'action insuffisante par les mécanismes de défense antioxydants, un déséquilibre de l'homéostasie redox survient et le « stress oxydant » dont les dommages cellulaires sont parfois irréversibles, prend malheureusement place (Jensen, 2003) (Figure 8).

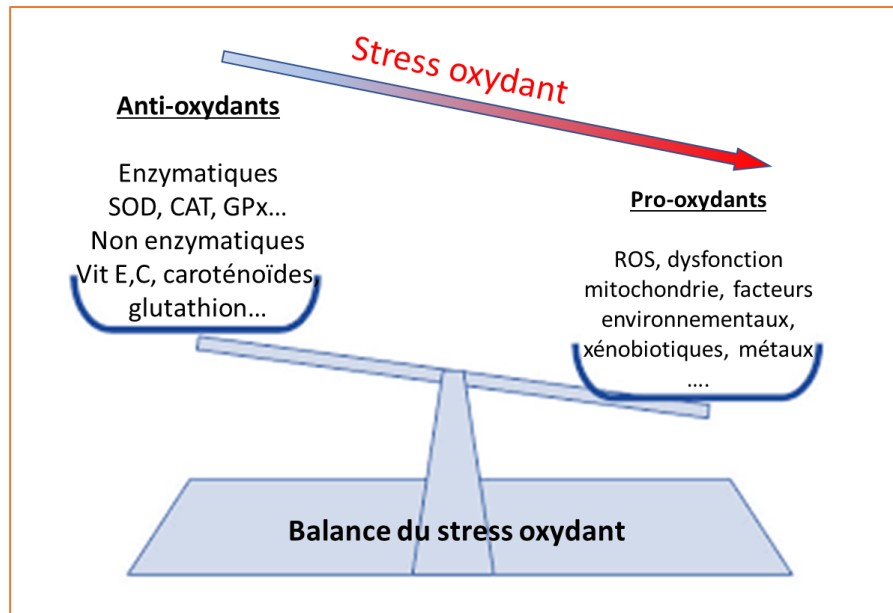


Figure 8: Schématisation de la balance du stress oxydant (Barillet et al., 2010)

VI.1.3 La peroxydation lipidique

Le stress Oxydatif peut également entraîner une peroxydation des lipides, qui peut être utilisé comme biomarqueur (Mylonas et Kouretas, 1999). Le malondialdéhyde (MDA) est le principal aldéhyde actif résultant de la peroxydation des acides gras polyinsaturés des membranes et, par conséquent, est utilisé pour prédire les dommages cellulaires causés par les ERO (Vlahogianni et al., 2007).



CHAPITRE II

Chapitre II : Caractérisation d'éléments relatifs à la diversité génétique des trois espèces étudiées : *Patella caerulea*, *Patella vulgata* et *Littorina littorea*

I. Exploration des modèles d'études

I.1 Les patelles

Les patelles du genre *Patella* (Linnaeus 1758) sont des mollusques gastéropodes prosobranches brouteurs définissant la famille Patellidae (Rafinesque, 1815) (Ridgway et al., 1998). La patelle ou arapède ou bernique possède une coquille épaisse, univalve, de forme conique qui lui a valu le surnom de "chapeau chinois". On la rencontre dans la zone intertidale le long des côtes rocheuses de l'Atlantique Nord-Est et de la Méditerranée (Poppe et Goto, 1991), mais également sur les substrats artificiels tels que les plateformes et les digues en béton des structures portuaires (Kallouche, 2018). La famille est représentée par les principaux genres suivants (Ridgway et al., 1998; Sá-Pinto et al., 2005) :

- *Cymbula*
- *Helcion*
- *Patella*
- *Scutellastra*

Les patelles se distinguent des autres mollusques gastéropodes par certains caractères morphologiques tels que la géométrie de la coquille en forme de chapeau chinois, qui leur permet de résister à la fois aux chocs, aux vagues et à la dessiccation grâce à leur pied musclé et adhérent, la forme de la radula ainsi que par la morphologie de leurs branchies (Ridgway et al., 1998; Sá-Pinto et al., 2008). Elles peuvent vivre plus de 5 ans. Lorsqu'elles sont sur les rochers calcaires elles s'y fixent très solidement à la manière d'une ventouse très puissante et creusent des dépressions pour y être plus à l'abri de la dessiccation lors des périodes d'exondation et pour résister aux chocs des vagues (Nakhlé, 2003; Kallouche, 2018).

I.1.1 Position systématique

D'après les manuels de la macrofaune méditerranéenne et atlantique (Perrier, 1930; Fischer et al., 1987) ainsi que divers travaux spécifiques aux patelles (Ridgway et al., 1998; Sá-Pinto et al., 2008), la position systématique des deux espèces de patelles qui ont fait l'objet de la présente étude est la suivante : Mollusca (phylum) / Gastropoda (Classe) / Patellogastropoda (ordre) / Patelloidea (Superfamille) / Patellidae (Famille) / *Patella* (Genre) lequel inclut nos deux espèces d'étude *P. caerulea* et *P. vulgata*. / Espèce (contient 9 espèces).

I.1.2 Les différentes espèces reconnues de patelles

Neuf espèces ont été identifiées par Ridgway et al. (1998) comme appartenant au genre *Patella* (tableau 4) : *Patella candei* (d'Orbigny, 1839) ; *Patella caerulea* (Linnaeus, 1758) ; *Patella depressa* (Pennant, 1777) ; *Patella ferruginea* (Gmelin, 1791) ; *Patella pellucida* (Linnaeus, 1758) ; *Patella rustica* (Linnaeus, 1758) ; *Patella ulyssiponensis* (Gmelin, 1791) et *Patella vulgata* (Linnaeus, 1758). Cinq espèces sont présentes en Méditerranée à savoir : *P. caerulea* (Linnaeus, 1758), *P. ferruginea* (Gmelin, 1791), *P. lugubris* (Gmelin, 1791), *P. rustica* (Linnaeus, 1758) et *P. ulyssiponensis* (Lamarck, 1819) (da Costa, 1771) (Cretella et al., 1994). Parmi ces espèces, *P. caerulea* et *P. ferruginea* sont considérées comme espèces endémiques des côtes méditerranéennes (Espinosa et al., 2008). *P. caerulea* se trouve en densité élevée (Nakhlé, 2003) alors que *P. ferruginea* est considérée comme une espèce menacée (Annexes II de la convention de Barcelone et la convention de Berne). En parallèle *P. vulgata* est considérée comme endémique des côtes atlantiques ; sa distribution marque l'océan Atlantique : du Nord de la Norvège (Tromsø) jusqu'au détroit de Gibraltar au Sud (Pope et Goto, 1991).

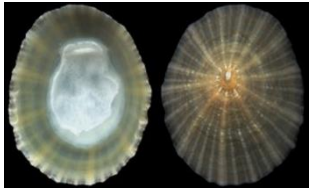
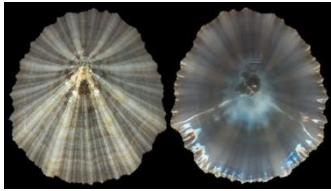


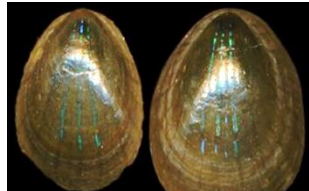



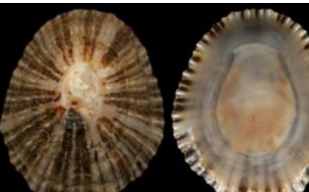
I.1.3 Répartition géographique

La distribution des patelles s'étend sur la façade Atlantique, de la Norvège jusqu'aux Açores (Tableau 4 ; figure 9). On les trouve également sur les côtes Ouest des Îles Britanniques, ainsi qu'en Manche, en Mer du Nord, en Méditerranée et en Afrique du Sud (Sá-Pinto et al., 2005). Selon les régions où elles sont observées, on leur attribue en français différentes appellations : "arapèdes", "berniques" "bernicles", "bernaches" ; et "lapa" en espagnol.

Tableau 4: Distribution des espèces *Patella* spp. En océan Atlantique et mer Méditerranée (<https://www.sealifebase.se/>).

Espèce	Distribution géographique
<i>Patella caerulea</i> Linnaeus, 1758	Açores, Canaries, Madère, Mer Méditerranée
<i>Patella candei</i> d'Orbigny, 1839	Açores, îles Canaries, Madère
<i>Patella depressa</i> Pennant, 1777	Océan Atlantique N-E et Mer Méditerranée
<i>Patella ferruginea</i> Gmelin, 1791	Mer Méditerranée
<i>Patella lugubris</i> Gmelin, 1791	Açores, Cap Vert, Mer Méditerranée
<i>Patella pellucida</i> Linnaeus, 1758	Océan Atlantique N-E
<i>Patella rustica</i> Linnaeus, 1758	Océan Atlantique N-E, Mer Méditerranée
<i>Patella ulyssiponensis</i> Gmelin, 1791	Océan Atlantique N-E, Mer Méditerranée, Mer noire
<i>Patella vulgata</i> Linnaeus, 1758	Océan Atlantique N-E

Tableau 5: Tableau récapitulatif des différentes espèces de patelles avec quelques caractères indicatifs ainsi que des photos de morphologie interne et externe de la coquille (Ridgway et al., 1998) Source des photos : http://idscaro.net/sci/01_coll/plates/gastro/pl_patellidae_1.htm#apatella

Morphologie externe et interne de la coquille					
Nom de l'espèce	<i>Patella vulgata</i>	<i>Patella caerulea</i>	<i>Patella candei</i>	<i>Patella rustica</i>	<i>Patella pellucida</i>
Caractères distinctifs	Face interne tapissée d'une couche lamelleuse faiblement nacré et lisse de couleur jaunâtre. Apex central ou légèrement antérieur.	Face interne irisée bleu irisé. Coquille conique en forme de chapeau chinois assez aplatie et à base arrondie denticulée et l'apex est assez nettement excentré et est déporté du côté de la tête de l'animal.	Face interne nacrée. Coquille assez étroite avec bords dentelés, lignes radiales concentriques visibles sur la coquille.	Face interne luisante foncée, marqué de rayons alternés et symétriques par rapport à l'axe antéro-postérieur. Coquille épaisse, en cône haut et pointu, striée, souvent marquée de points noirs.	Apex légèrement excentré et recourbé vers l'avant. Forme ovale aplatie. Coquille lisse translucide avec une tache foncée. 2 à 8 lignes radiales discontinues bleu métallique.
					
	<i>Patella ulyssiponensis</i>	<i>Patella lugubris</i>	<i>Patella ferruginea</i>	<i>Patella depressa</i>	
	Intérieur blanc porcelaine souvent avec des reflets bleus. Impression musculaire jaune ou orange. La coquille a une forme ovale à pentagonale ou triangulaire très fine et aplatie avec un apex sensiblement antérieur à la ligne médiane.	Face interne grisâtre faiblement nacré avec présence de reflets bleu au niveau des bords internes. Apex central et coquille de couleur foncée.	Face interne luisante et blanchâtre avec parfois un reflet bleuâtre. Bord plus ou moins dentelé, extérieur couleur rouille donnant avec des lignes ferrugineuses concentriques.	Face interne gristare. Coquille assez petite, bien bosselée de couleur jaunâtre-blanc avec des raies brunes marginales. La coquille est cannelée avec un bord arrière carré. Apex central.	

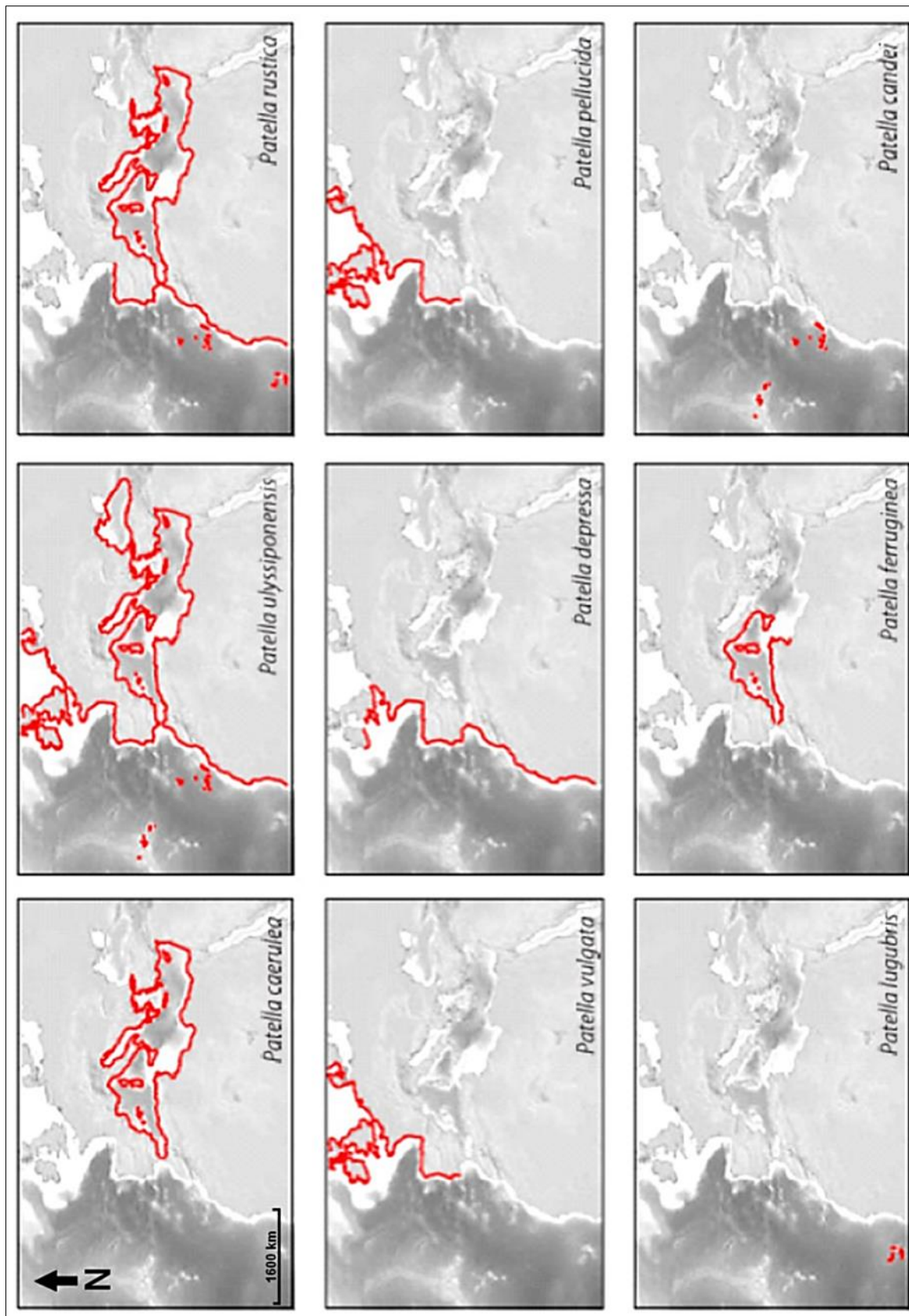


Figure 9: Aires de répartition géographique des neuf espèces du genre *Patella* définies par Ridgway et al. (1998) (Bouzaza, 2018). (L'échelle des cartes est la même que celle indiquée sur la carte de *P. caerulea*)

I.1.4 Un comportement alimentaire particulier ?

A marée haute, la patelle quitte son gîte pour aller brouter les algues macroscopiques (ascophylles, fucus et ulves) et microscopiques (diatomées et cyanophycées) ou des débris divers (Nakhlé, 2003; Silva et al., 2008) grâce à sa langue râpeuse ou *radula* en forme de ruban à petites dents. Cette langue est dotée des mouvements allant d'avant en arrière, laissant des traces caractéristiques en zigzag (figure 10) (Didierlaurent et Noël, 2021). Elle peut effectuer deux déplacements par jour si les conditions hydrodynamiques sont favorables en exploitant à chaque fois un territoire de quelques décimètres de diamètre qui peut atteindre les 1,5 m³. A marée descendante, elle retourne à son gîte d'origine sans jamais se tromper (en général) et réoccupe la même dépression qu'elle a creusé au niveau de la roche. Les anglais appellent ce comportement très particulier le « *homing* » ou « *home finding* », autrement dit « le retour à la maison » (Scoupe et al., 2021a). Ce mécanisme de retour à l'abri d'origine se fait grâce à un odorat très développé et à la présence des récepteurs chimiques qui permettent à la patelle de remonter sur ses pas, en captant la traînée muqueuse qu'elle a secrété aux alentours de son abri pour lubrifier la roche durant ses déplacements (Branch, 1985). Cependant, sur les roches lisses, ou lorsque la nourriture se fait rare, certaines patelles ont un comportement beaucoup plus vagabond et peuvent parcourir des distances de plusieurs mètres sans revenir à leur emplacement (Fischer-Piette, 1948).



Figure 10: Image représentant des traces de broutage (Le Roux, 2008)

I.1.5 Reproduction

Les patelles sont des espèces hermaphrodites protandres (Orton, 1928). La jeune patelle née de sexe mâle puis devient femelle dès sa deuxième année (figure 11). Il n'y a pas de copulation, l'émission des gamètes dans l'eau se produit depuis l'automne jusqu'à l'hiver et la

fécondation est donc externe. La fécondation des gamètes donne naissance à une larve ciliée pélagique appelée trochophore. La phase larvaire peut durer jusqu'à deux semaines (Hawkins et al., 2000) puis le juvénile se pose, souvent dans une flaque d'eau sur le médiolittoral (Boaventura et al., 2002). En devenant adulte, la patelle se déplace sur une roche exposée à l'air. Ainsi, les larves dans la colonne d'eau sont soumises à des processus de transport physique qui peuvent les disperser du site de reproduction (Cowen et al., 2006). Le nombre de recrues sur un site spécifique peut donc être indépendant de la production locale de larves et influencé par la circulation des courants. Les populations de patelles ne peuvent donc pas être considérées comme complètement ouvertes ou complètement fermées, car une certaine rétention larvaire locale est susceptible de se produire malgré la dispersion (Johnson, 2005; Schmitt et al., 1999).

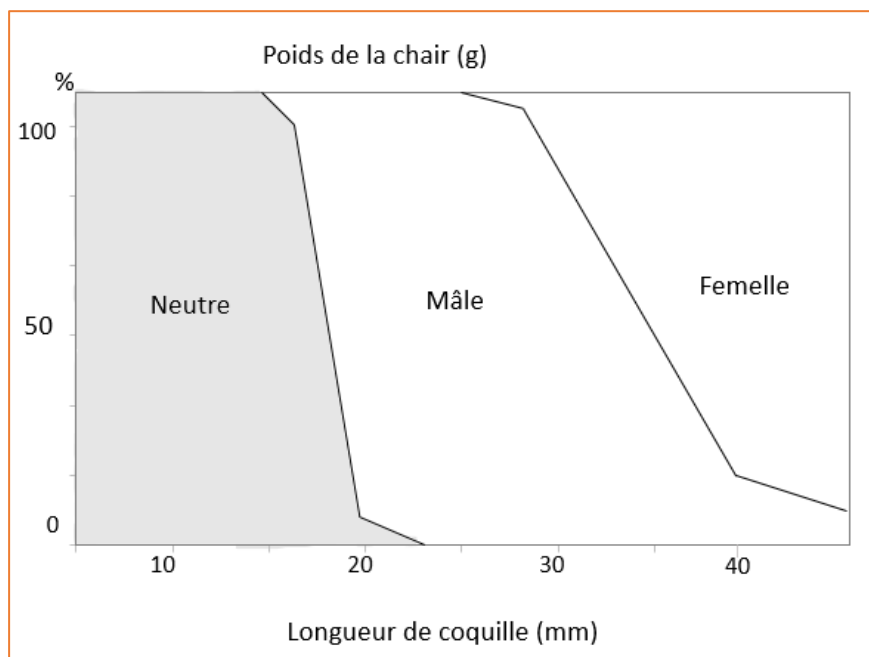


Figure 11: Changement de sexe chez les patelles en relation avec l'âge (D'après Branch, 1985)

I.1.6 Exploitation des patelles

Les patelles ont été collectées par les populations humaines depuis le paléolithique (Turrero García et al., 2014) comme nourriture et appât pour la pêche dans plusieurs parties du monde, tels que le Mexique, les États-Unis, Hawaï, Australie, Afrique du Sud, Chili et Macaronésie (Moreno et al., 1984; Keough et al., 1993; McCoy, 2008; Henriques et al., 2017). Elles sont choisies car elles constituent une source facilement accessible et riche en protéines, glucides et lipides (Fischer et al., 1987). Il a été démontré aussi que les *Homo neanderthalensis* consommaient la chair des patelles et utilisait aussi les coquilles pour orner leurs bijoux et accessoires (Hoffmann et al., 2018). L'augmentation de la densité de la population humaine

le long de la côte, le progrès technologique dans les méthodes de collecte, de conditionnement, de conservation et de transport ont abouti à la transformation de cette activité de subsistance en une exploitation commerciale. Par conséquent, les effets de l'exploitation humaine ajoutés à ceux des processus naturels qui influencent la taille des populations des patelles exploitées affectent le stock de certaines espèces qui sont de nos jours devenues protégées (Henriques et al., 2017). C'est le cas pour les espèces *P. ferruginea* en Algérie (Espinosa, 2009) et Espagne (Espinosa et al., 2008; María et al., 2021), ainsi que *P. candei* aux Canaries (Riera et al., 2003; Ramírez et al., 2009) et aux Açores (Martins et al., 2008).

I.1.7 Intérêt écologique des patelles

Les patelles sont des herbivores brouteurs qui se nourrissent, en raclant le substrat rocheux avec la radula, du biofilm microbien qui est principalement composé de cyanobactéries et de microalgues, y compris les diatomées, les spores et autres propagules de macro-algues (Jenkins et al., 2001; Coleman et al., 2006). Les habitudes alimentaires des patelles sont essentielles dans la structuration des communautés intertidales (Hawkins et Hartnoll, 1983; Jenkins et al., 2001) puisque le pâturage des patelles est un processus clé impliqué dans la dynamique de recouvrement des macro-algues et dans la modification de la stabilité de l'écosystème des côtes rocheuses. Ceci agit indirectement sur l'amélioration ou l'inhibition de l'installation d'autres organismes (Coleman et al., 2006). Boaventura et al. (2002) ont rapporté qu'un déclin au niveau de la densité de population des patelles pourrait entraîner un développement anormal de la communauté algale ou l'occupation de leur niche écologique par des organismes concurrents comme les balanes ou les oursins (Arrontes et al., 2004; Henriques et al., 2017).

Cependant, l'effet de ces brouteurs ne se limite pas à l'élimination des algues et, très souvent, ils peuvent affecter d'autres espèces animales par le biais d'interactions compétitives et en fournissant des habitats secondaires pour d'autres invertébrés qui s'installent au-dessus ou en dessous de leur coquille (Hawkins and Hartnoll, 1983; Branch, 1985; Henriques et al., 2017). Ils peuvent également affecter le taux de succession ou provoquer le développement de différents assemblages. Ainsi, les patelles sont à juste titre considérées comme des espèces clés dans les communautés intertidales (Henriques et al., 2017).

I.1.8 Problème taxonomique

La distinction des espèces de patelles est principalement basée sur des critères morphologiques de leur coquille ou de leur radula (Christiaens, 1973). Cependant, parfois il s'avère quasiment impossible de différencier deux espèces en se basant uniquement sur ces caractères morphologiques vu la grande plasticité (Fischer-Piette et Gaillard, 1959). D'autres caractères ont ainsi été étudiés pour différencier les espèces tels que la coloration des pieds et des tentacules palléales (Cretella et al., 1990), la morphologie des spermatozoïdes (Hodgson et al., 1996), la configuration des boucles des intestins (Ridgway et al., 1998) et l'analyse du nombre de chromosomes (Cervella et al., 1988). Ces critères ne sont malheureusement pas suffisants et certains nécessitent beaucoup de temps pour être étudiés.

I.2 Les littorines

Les littorines du genre *Littorina* (Férussac, 1822) sont des mollusques gastéropodes prosobranches brouteurs définissant la famille Littorinidae (Children, 1834) qui compte plus de 200 espèces vivant dans des milieux très variés, allant des régions tempérées aux zones tropicales et que l'on retrouve communément sur les côtes françaises (Williams et al., 2003). Le genre a donné son nom à la mer à Littorines qui est le dernier stade de développement de la mer Baltique, depuis la dernière glaciation, existant entre 7500 – 4000 ans av. J.-C. Cette mer est nommée ainsi vu que les littorines y étaient prévalentes et étaient indicatrices de la salinité de ses eaux.

Les littorines se distinguent par une coquille conique, spiralée et légèrement bombée se terminant par un apex pointu et fermée par opercule paucispiral. Elles peuvent vivre en moyenne environ 5 à 6 ans mais la longévité peut être réduite par le parasitisme dû surtout à des trématodes et par la prédation humaine (Daguzan, 1975). On les rencontre dans la zone de balancement des marées au niveau de la ceinture à *Fucus* et/ou sous les blocs et galets. Il existe des espèces dites algales, d'autres sont dites lithales (cachées dans les interstices de roches) et d'autres sont dites mixtes (vivant aussi bien sous les blocs et galets que parmi le *Fucus spiralis*). Le milieu algal ou lithal joue un rôle de « tampon thermique » pour les individus. Ils permettent selon la saison de maintenir une température inférieure et un taux d'humidité supérieur à ceux du milieu ambiant assurant la survie des littorines lors des périodes d'exondation. Pour lutter contre la dessiccation à marée basse, les littorines s'abritent plus ou moins parmi les algues, sous les roches, se rétractent dans leur coquille, ferment leur opercule et entrent dans un état de vie ralentie ou quiescence leur permettant de survivre (Moore, 1937; Newell, 1958).

I.2.1 Position systématique

D'après les manuels de la macrofaune atlantique et méditerranéenne (Locard, 1886; Perrier, 1930; Fischer et al., 1987) ainsi que divers travaux spécifiques aux littorines (Jeffreys et al., 1862; Daguzan, 1975; Reid and Greenwood, 1989), la position systématique de la famille Littorinidae Children, 1834 est la suivante : Mollusca (Phylum)/ Gastropoda (classe)/ Littorinimorpha (ordre)/ Littorinoidea (Superfamille). Elle comprend les sous familles : Lacuninae Gray, 1857 (6 genres), Laevilittorininae Reid, 1989 (5 genres) et Littorininae Children, 1834 (20 genres) (<https://www.marinespecies.org>). Le genre *Littorina* Férussac, 1822, lequel inclut notre espèce d'étude *L. littorea* (bigorneau), comprend 18 espèces.

I.2.2 Les différentes espèces de littorines reconnues en France

Les espèces les plus communes de littorines sur les côtes françaises, réparties selon leurs préférences alimentaires et écologiques (figure 12) ; Dans les étages medio-littoral et supralittoral, parmi *Pelvetia canaliculata* et *Fucus spiralis* (soit 4,10 m à 4,75 m), se trouve l'espèce *L. saxatilis* (Olivier, 1792) qui supporte bien l'exondation. Au niveau du medio-littoral, parmi *F. spiralis* ou sous les blocs de roche (soit 3,50 m à 4,25 m), se trouve le bigorneau commun *L. littorea* (Linnaeus, 1758). La dernière espèce, *L. littoralis* (Linnaeus 1767), se trouve inféodée au *Fucus vesiculosus*, au *Ascophyllum nodosum* et au *F. serratus* (soit 2,15 m à 3,50 m). Des individus de *L. littorea* sont rencontrés au niveau du *F. vesiculosus* (soit 2,85 à 3,50 m), ce sont exclusivement des jeunes individus qui migreront par la suite vers l'étage medio-littoral.

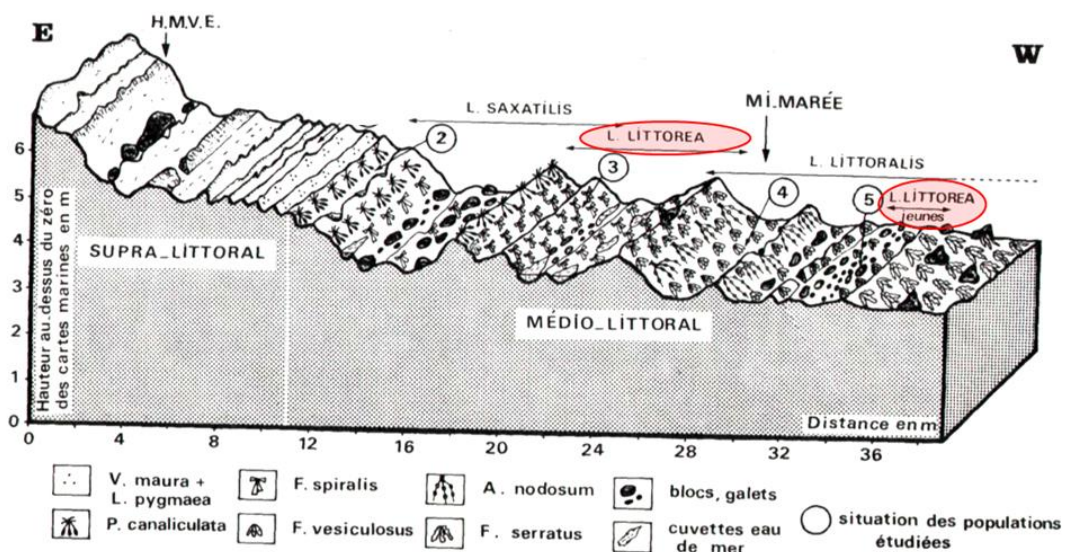


Figure 12 : Répartition verticale des littorines (D'après Daguzan, 1975)

I.2.3 *Littorina littorea*

Du latin *litoralis* et *litus* = rivage, littoral. L'espèce *Littorina Littorea* (Linnaeus, 1758), appelée aussi bigorneau commun, est une espèce comestible à coquille conique spiralée légèrement bombée se terminant par un apex pointu. Des stries parallèles sombres et claires alternées sont observables sur la coquille qui est généralement d'un gris foncé à noir. L'intérieur de l'ouverture de la coquille est sombre, ovale, avec une légère pointe vers le haut et se ferme hermétiquement par un opercule corné. La bouche des bigorneaux est dotée d'une radula pour assurer le broutage et est cernée par deux tentacules céphaliques marbrés de lignes noires ayant chacun un œil à sa base.

Son aire de répartition dans la zone intertidale est large puisqu'elle s'étend, selon le stade de développement, du bas de l'étage médiolittoral à l'étage infralittoral (Daguzan, 1975) avec *Fucus spiralis*, représentant le biotope préférentiel des adultes. Pendant les périodes d'exondation, les individus de *L. littorea* montrent une distribution dite au hasard en se trouvant éparpillés en groupes de 2 à 5 individus. Si les conditions du milieu deviennent défavorables, les bigorneaux empruntent une distribution de type *agrégat* en se regroupant par petites populations sous les *Fucus*, les blocs de roche grâce à la sécrétion de phéromones capables d'attirer d'autres individus de la même espèce (Dinter et Manos, 1972).



Figure 13: Morphologie externe de *Littorina littorea* adulte (Doris, 2022)

I.2.3.1 Distribution géographique

L'espèce *Littorina littorea* se rencontre de manière native autochtone dans le Nord-Est de l'océan atlantique : de la Norvège jusqu'au Nord-Ouest de l'Espagne (figure 14). Elle représente une espèce exotique aux Etats Unis et Canada où elle aurait été introduite avec les eaux de ballast vers le XIX^{ème} siècle (Abbott, 1974).



Figure 14: Répartition mondiale de l'espèce *Littorina littorea* (MNHN et OFB, 2022)

I.2.3.2 Comportement alimentaire

Littorina littorea est un brouteur herbivore. Elle râpe les algues vertes, qu'elle recherche en rampant sur son pied, grâce à sa radula. Elle se nourrit aussi bien d'algues vertes comme les ulves et les entéromorphes mais aussi d'algues microscopiques se développant à la surface des algues brunes, des zostères ou des roches. Le phénomène de retour au gîte ou « homing » a été démontré chez les littorines aussi grâce aux propriétés adhésives du mucus permettant de concentrer des microalgues. La littorine est ainsi capable de puiser sa nourriture dans son mucus (Daguzan, 1975; Davies and Beckwith, 1999).

I.2.3.3 Reproduction

Le bigorneau est une espèce gonochorique ovipare à capsules ovigères planctoniques. La maturité sexuelle s'établit au bout d'environ 2 ans pour une taille d'environ 12 à 14 mm. La période d'activité sexuelle débute en hiver et la ponte s'effectue en général au printemps (Daguzan, 1975). La fécondation est interne. La ponte s'effectue de façon intermittente durant plusieurs mois et elle se produit à marée haute, à deux heures après l'unique copulation. La femelle libère environ 500 capsules gélatineuses par émission (Fretter and Graham, 1972), renfermant chacune en moyenne de 1 à 5 œufs et qui seront entraînées par les courants vers le large et mèneront par la suite une vie planctonique (Moore, 1937). Ainsi, une femelle peut pondre jusqu'à 5 000 capsules ovigères au cours d'une année. *Littorina littorea* est donc capable de pondre toute l'année et la période d'émission maximale des capsules varie selon la latitude et même la localité. L'éclosion des capsules ovigères a lieu 5 à 6 jours après la ponte (Tattersall, 1920) donnant naissance à des larves véligères qui mènent une vie planctonique de durée

variable, de 4 à 7 semaines (Williams, 1964; Chang et al., 2011). Cette vie planctonique peut être plus longue si les conditions du milieu sont défavorables. Les larves véligères se métamorphosent en formes juvéniles (coquille de 0,25 mm environ de hauteur) puis tombent au fond de la mer et sont capables de se déplacer par reptation (Smith et Newell, 1955). En essayant de comprendre et d'interpréter la migration des jeunes individus de *L. littorea* des côtes françaises, Daguzan, (1975) suggère que les jeunes individus continuent à mener une vie pélagique jusqu'à ce que leur taille devienne assez importante (hauteur de la coquille $h > 2,5$ mm), afin de pouvoir affronter les courants et l'assaut des vagues. Puis, à marée haute, lors de grandes marées de vive eau, ils sont entraînés par les courants vers les niveaux moyens à *Fucus vesiculosus*. La turbulence des eaux étant particulièrement importante en mode battu, les jeunes se réfugient dans la moulière, cachés entre les byssus des moules, dans les balanes vides ou dans les infractuosités du rocher. En mode semi-battu, ils s'abritent sous les roches situées parmi *F. vesiculosus* et poursuivent leur croissance à ce niveau. Ensuite, par vagues successives à marée haute, les jeunes individus grimpent graduellement, rejoignant les adultes regroupés dans *F. spiralis*. La taille des adultes est d'environ 25 à 30 mm. Les déplacements importants effectués par les juvéniles pour atteindre le biotope des adultes est une caractéristique propre à *L. littorea*. Un véritable repos sexuel avec régression de la gonade et chute du pénis chez le mâle s'établit en dehors des périodes de reproduction (Mai-Août).

I.2.3.4 Exploitation des littorines

Il s'agit tout d'abord d'une espèce commerciale à forte incidence économique (Lee et Boulding, 2009). Le bigorneau commun est largement consommé, surtout en Europe du Nord et sur les rives du Saint-Laurent au Canada. Elle est même directement vendue dans les rues de certaines villes de Belgique comme Bruxelles et sur quelques plages irlandaises. La France en commercialise plus de trente tonnes annuellement, mais ceci s'avère insuffisant pour satisfaire la demande ; surtout en périodes de fêtes de fin d'année où les bigorneaux sont alors importés d'Irlande, d'Ecosse ou des Pays-Bas (Scoupe et al., 2021b). Mise à part leur qualités organoleptiques qui font des bigorneaux un aliment très apprécié, ces organismes présentent une teneur élevée en protéines mais faibles en gras (Abbott, 1974). Des tentatives d'élevage de bigorneaux en France n'ont jamais pu aboutir en raison des basses températures en hiver qui ont rendu cette activité très aléatoire (Scoupe et al., 2021b). Enfin, les bigorneaux peuvent également être utilisés comme appât de pêche.

I.2.3.5 Intérêt écologique des littorines

Selon Scoupe et al. (2021a), les habitudes alimentaires du bigorneau lui confèrent une place importante dans l'écobiologie d'autres espèces. En effet, en broutant les algues vertes et les microalgues, il évite le colmatage des branchies et donc l'étouffement des jeunes filtreurs comme les huîtres. Il peut également fournir des habitats secondaires pour d'autres organismes ; des algues, des balanes et même des vers tubicoles peuvent occasionnellement se fixer sur sa coquille. Les coquilles abandonnées servent de refuge à plusieurs espèces de bernard-l'ermite. C'est aussi la proie de certains animaux tels que des goélands, de crustacés comme le crabe vert (*Carcinus maenas*), de certaines étoiles de mer et de poissons. L'espèce a également prouvé son efficacité dans la lutte biologique contre le tunicier *Ciona intestinalis* colonisant des huitres (Carver et al., 2003). Elle a également été proposée dans le contrôle du tunicier invasif *Didemnum vexillum* (Carman et al., 2009; Valentine et al., 2007).

II. Les marqueurs moléculaires analysés

Afin d'appréhender la diversité génétique de nos trois modèles d'étude (*P. caerulea*, *P. vulgata* et *Littorina littorea*) et de comprendre les flux géniques entre les populations le long de l'ensemble de leurs aires de répartition, nous avons analysé la variabilité de marqueurs mitochondriaux (COI, D-Loop) et ribosomiques (ITS1, ITS2). Cette approche nous a permis également de vérifier l'identité de l'espèce de chaque individu utilisé lors de ce travail de thèse.

II.1 Les marqueurs mitochondriaux

II.1.1 Le cytochrome oxydase I (COI)

Le gène de la cytochrome oxydase sous unité 1 (COI), faisant partie de la chaîne respiratoire mitochondriale, est un marqueur utilisé en routine pour le *metabarcoding* des animaux (Coissac et al., 2012). Ce marqueur est également utilisé dans des études de génétique des populations. Il a l'avantage d'être présent en de nombreuses copies, facilitant le séquençage. Tous les individus d'une espèce présentent des séquences très proches, ce qui permet la différenciation interspécifique très fiable (Hebert et al., 2003).

II.1.2 La région contrôle (D-Loop)

L'ADN mitochondrial comporte une seule région non codante : la région D-Loop (*Displacement Loop, control region*). Cette région est un site essentiel pour la réplication et la transcription du génome mitochondrial. Elle contient le point d'origine de la réplication de

l'ADN mitochondrial (ADNmt), les sites de fixation de la majorité des promoteurs de la transcription ainsi que certains facteurs de transcription (Sharma et al., 2005). Il a été démontré que la région de contrôle ou *D-loop* contient plus de variations interspécifiques, par rapport aux gènes de COI. Ainsi, cette région est devenue un marqueur privilégié pour l'identification des espèces animales (Chuang et al., 2012; Kumar et al., 2012). Elle est également utilisée pour l'étude des populations (Viñas and Tudela, 2009).

II.2 Les marqueurs nucléaires ribosomiques (ITS1-ITS2)

Parallèlement aux fragments mitochondriaux, nous nous sommes également intéressés à une région de l'ADN nucléaire codant des éléments ribosomiques. Au sein de la cassette « 18S-ITS1-5,8S-ITS2-28S » (nommée également 35S ou InterGenic Spacer, IGS) : les fragments ITS, pour *Internal Transcribed Spacer*, correspondent à des parties de l'ADN ribosomique transcrites mais non traduites située entre les éléments de la sous unité 40S (18S) et ceux de la grande sous unité 60S (5,8S ; 28S). Ces ITS sont caractérisés par un taux de mutations sensiblement plus élevé sous l'effet d'insertions, de délétions et de mutations ponctuelles, ce qui rend leur utilisation courante pour des problématiques d'étude de diversité intraspécifique. En fonction de la polymorphisme, ils peuvent être parfois utilisés avec succès pour des analyses phylogénétiques entre espèces proches (Cheng et al., 2006; Grajales et al., 2007; Chow et al., 2009)

III. Méthodes moléculaires utilisées pour l'analyse de la diversité génétique

III.1 Extraction des acides nucléiques (ADN)

Les tissus mous des individus des diverses espèces ont été détachés de leur coquille. Ils ont ensuite été broyés dans des mortiers stériles (préalablement désinfectés avec de l' H_2O_2 à 3%) et contenant de l'azote liquide. L'extraction des ADN est effectuée suivant le protocole CTAB (CétylTriméthyl Ammonium Bromide) adapté de Doyle et Doyle, (1987) (Protocole détaillé en annexe). Les ADN sont ensuite visualisés sur un gel d'agarose 1% et leurs concentration et pureté sont évaluées à l'aide d'un spectrophotomètre de type NanoDrop Thermo scientific (2000). Le rapport DO (260) / DO (280) traduit la contamination par des protéines ; tandis que le rapport DO (260) / DO (230) permet d'estimer la contamination par les produits utilisés lors de l'extraction (éthanol, chloroforme...).

III.2 Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Dans le but d'amplifier les marqueurs mitochondriaux (COI, D-loop) et ribosomiques désirés (ITS1, ITS2), des PCR spécifiques pour chaque marqueur ont été effectuées sur tous nos échantillons. Toutes les PCR ont été réalisées à l'aide d'un kit GoTaq flexi DNA polymerase®promega. Chaque PCR a été réalisée dans 25µL contenant 5 µL de tampon, 1.5 µL de MgCl₂, 2 µL de dNTP 2mM, 2 µL d'amorces *Forward*, 2 µL d'amorces *Reverse*, 0.12 µL d'enzyme GoTaq et 1 µL d'ADN à 200 ng de concentration. Le volume a été ensuite complété à 25 µL avec de l'eau « *nuclease free* ». Les séquences et les températures d'hybridation des amorces utilisées pour les PCR sont détaillées en annexe.

III.3 Extraction, ligation et clonage des fragments amplifiés

Une fois les PCR réalisées, les résultats sont visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% à l'aide d'un marqueur de taille (DNA ladder 100 pb Biolabs). Pour l'amplification des marqueurs mitochondriaux, les produits de PCR sont directement envoyés au séquençage, tandis que l'amplification des ITS ribosomiques a nécessité un clonage. Les bandes d'ITS jugées intéressantes (reflétant une taille attendue) lors des amplifications étaient alors excisées du gel d'agarose. L'extraction des bandes a été effectuée à l'aide du kit QIAEX II (Quiagen). La ligation des bandes extraites en utilisant des bactéries rendues compétentes a été effectuée à l'aide du kit pGEM®-T Vector System I (Promega) (protocole en annexe). Deux clones positifs pour chaque amplicon recherché étaient ensuite envoyés *via* DHL au séquençage chez GENEWIZ (Allemagne). Les réponses avec les séquences sont obtenues dans un délai de 3-4 jours après la date d'envoi.

III.4 Analyse génétique

Les séquences obtenues ont été alignées grâce au logiciel Clustal Omega puis visualisées à l'aide de Genedoc viewer, permettant de vérifier la qualité des lectures obtenues. Les diversités haplotypique (H_d) et nucléotidique (π), le nombre d'haplotypes (h) et le nombre moyen de nucléotides différents (k) ont été obtenus à partir du logiciel DnaSP v6. Pour ces analyses, les individus non identifiés ne sont pas pris en compte. Deux tests de neutralités : le test de Tajima (D) (Tajima, 1993) et le test de Fu (F_s) (Fu et Li, 1993), ont été réalisés afin d'évaluer l'histoire démographique des espèces. Une valeur significativement négative ($p < 0,05$) de D et F_s indique une expansion des espèces. Un réseau d'haplotypes a été créé à l'aide du logiciel Network 10 en utilisant la méthode du median-joining (Bandelt et al., 1999)

ou PopArt 1.7. Le logiciel MEGA X (Kumar et al., 2018) a été utilisé afin de définir le modèle évolutif le mieux adapté au jeu de données et pour la reconstruction phylogénétique en utilisant la méthode de Maximum de Parsimonie avec un test de robustesse de type bootstrap (1000 tirages aléatoires avec remise).

IV. Résultats et discussion

Les rapport DO (260) /DO (280) et DO (260) /DO (230) obtenus au Nanodrop pour tous les ADN extraits dans cette étude ont été supérieurs à 1.8 ; ce qui reflète une bonne qualité avec l'absence de traces d'éthanol dans les précipités d'ADN. Le dépôt des ADN sur gel n'a pas montré de dégradation sauf pour deux échantillons de *P. caerulea* qui ont été exclus et remplacé par deux autres échantillons qui n'ont révélé aucune dégradation. La dégradation d'ADN peut être lié à des facteurs intrinsèques propre à l'organisme mais aussi à des facteurs extrinsèques concernant surtout les modalités de conservation de l'échantillon en question (degré d'éthanol, transport, ...).

IV.1 Diversité génétique de *Patella Caerulea*

Des individus de *P. caerulea* ont été prélevés à la main au niveau de quatre sites le long des côtes tunisiennes (2018) Bizerte (B), Chebba (C), Gabés (G) et Kerkennah (G) (figure 15), puis conservés dans de l'éthanol 70% (Pereira et al., 2011) afin d'être transportés jusqu'en France pour être analysées au laboratoire Mer Molécule Santé (MMS devenu en 2021 BIOSSE) à l'université du Mans.

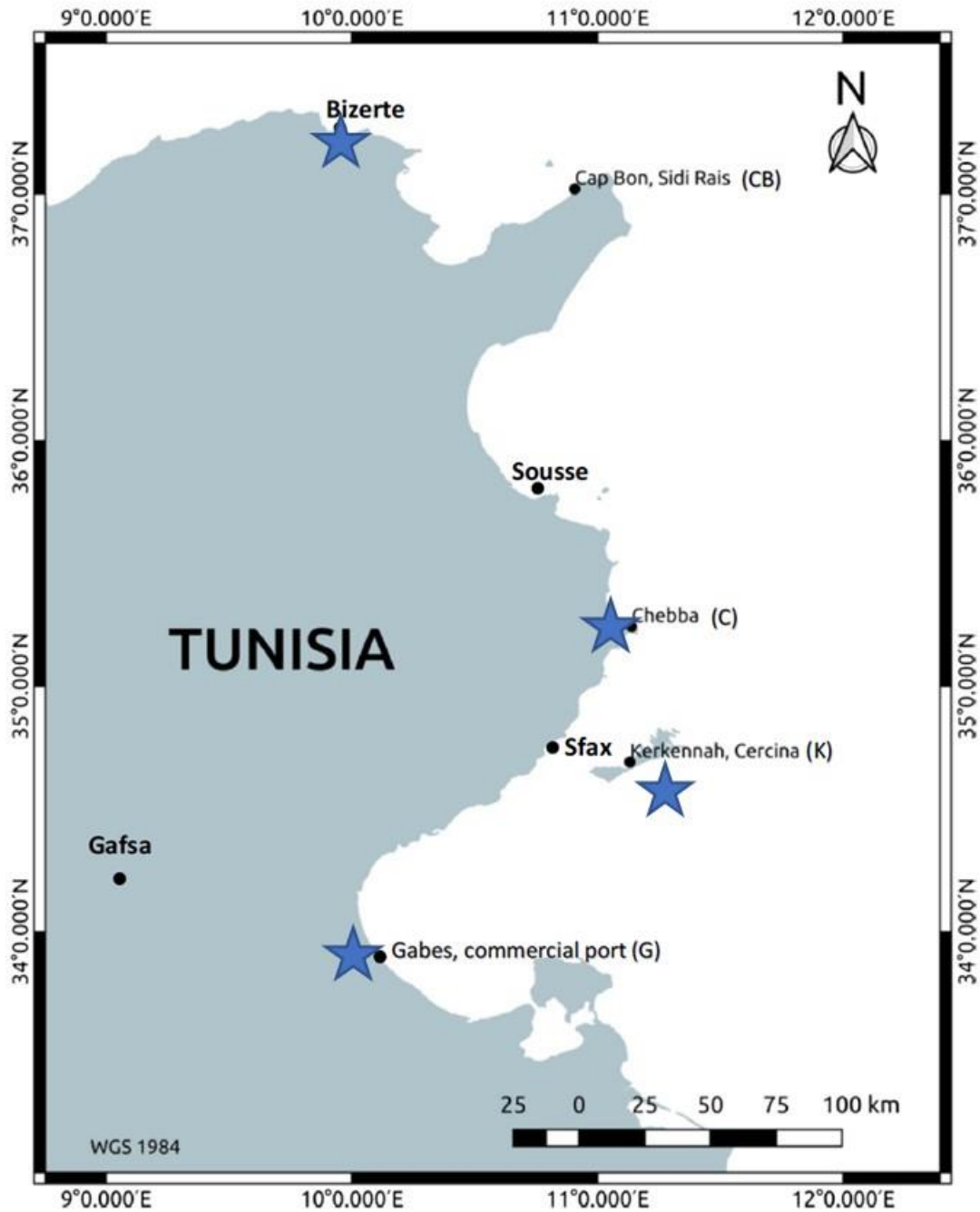


Figure 15: Carte indiquant les sites de prélèvement des patelles de Méditerranée en Tunisie

Le COI mitochondrial (560 pb) ainsi que la portion ITS1-5.8S-ITS2 ribosomique (1000 pb) ont été amplifiés. Huit individus par population ont été analysés par PCR. Deux séquences ont été clonées (pour servir de séquences de référence) et six produits de PCR purifiés ont été envoyés en complément, par population.

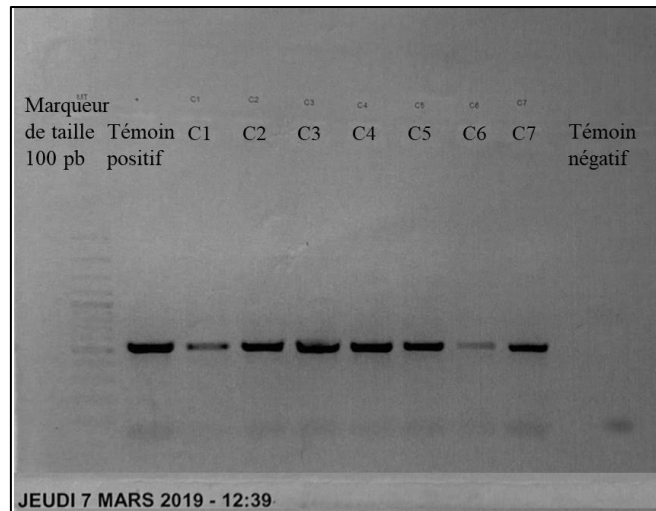


Figure 16: Exemple d'un profil PCR (COI) obtenu sur *P. Caerulea* (site C)

Les analyses ont porté tout d'abord sur la vérification de l'identité de l'espèce *Patella caerulea* dans les échantillons prélevés. Pour savoir cela, la phylogénie des *Patella* spp a été établie en incluant les séquences COI acquises avec celles disponibles sous NCBI. La figure 17 présentée ci-après comprenant 75 séquences (348 pb) de 10 espèces de patelles révèle clairement que tous les échantillons prélevés en Tunisie sur les sites B, C, G et K en 2018 sont bien intégrés dans le clade regroupant les *Patella caerulea* (trait noir épais dans la figure).

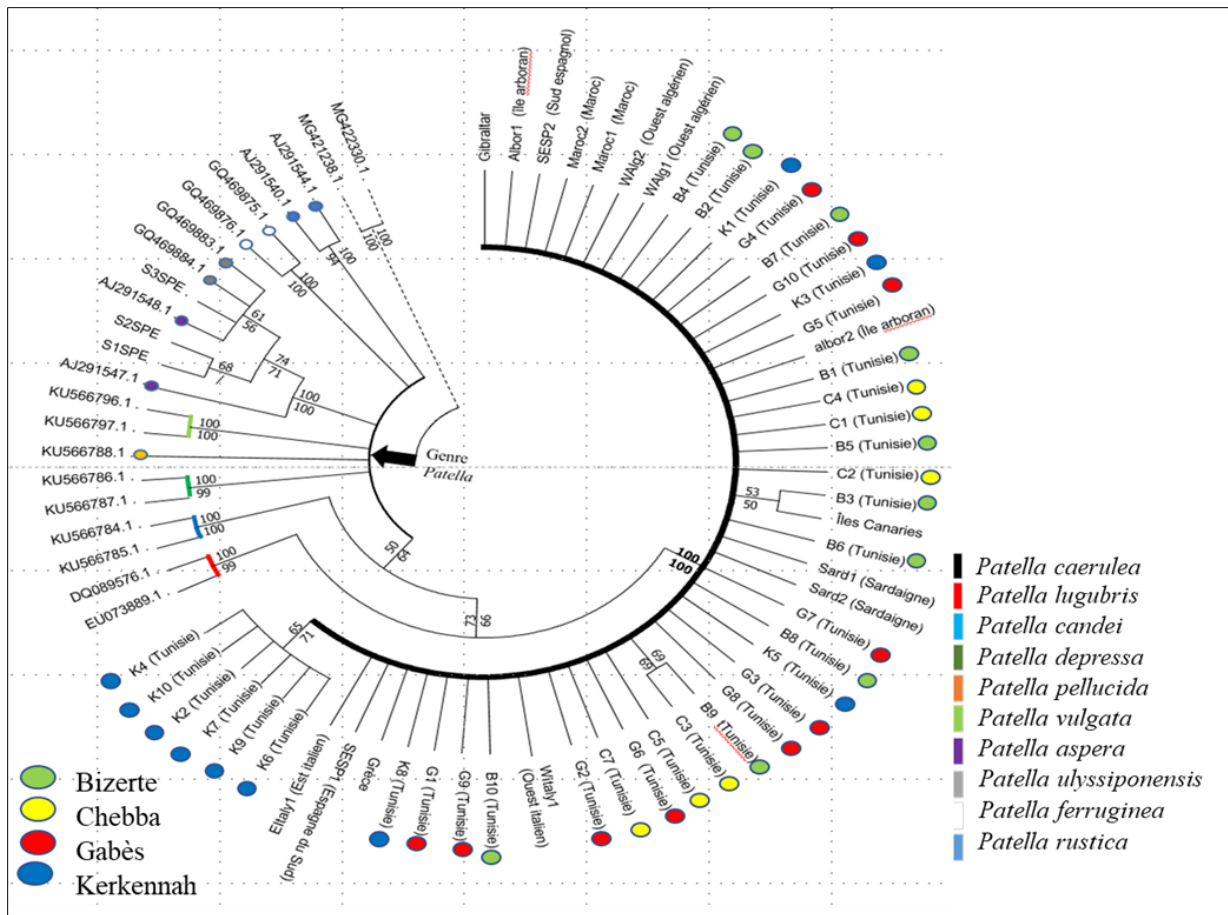


Figure 17: Analyse phylogénétique moléculaire basée sur le COI mitochondrial (348 pb) en utilisant l'approche de maximum de vraisemblance basée sur le modèle évolutif HKY95+G+I sous MEGA7. Une distribution gamma a été utilisée pour modéliser le taux évolutif de différences entre les sites (+G, paramètre = 0,6201). Le taux de variation I était de 54% sites. Le test de robustesse appliqué a été le « bootstrap ». Les valeurs indiquées au-dessus des branches sont celles du ML, celles en dessous d'une analyse par Neighbor-Joining. Les chiffres après les lettres B, C, G et K indiquent le numéro de l'échantillon analysé (n=10).

Ces données de COI nous ont permis également de définir les liens d'interconnexion entre les populations de *P. caerulea* prélevées le long de côtes méditerranéennes de divers pays (Algérie, Espagne, Italie, Maroc, Sardaigne, Tunisie). Le réseau d'interconnexion obtenu est présenté dans la figure 18.

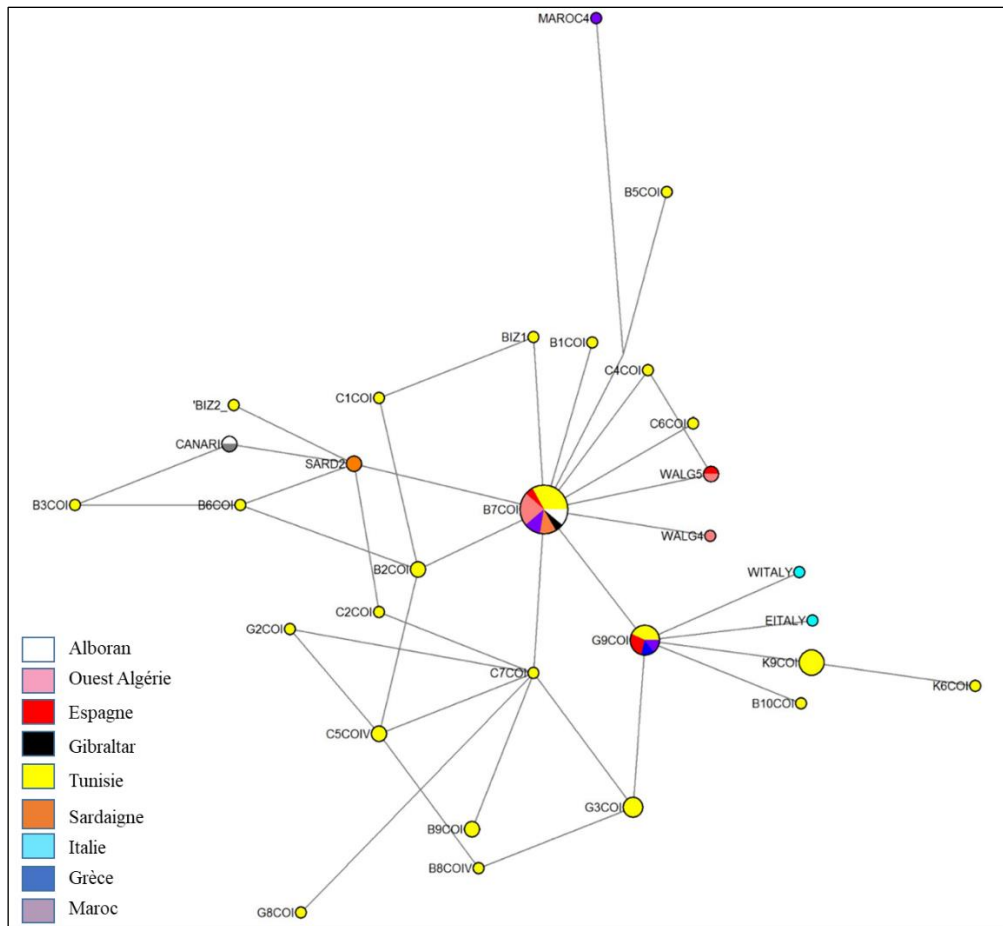


Figure 18: Réseau d'interconnexions entre diverses populations de *Patella caerulea* (Algérie, Canaries, Espagne, Italie, Maroc, Sardaigne, Tunisie) basé sur le COI mitochondrial (481 pb) réalisé avec Networks 10. Les petits cercles représentent les haplotype présents dans un seul individu

Trente haplotypes ont été identifiés lors de l'analyse inter-populationnelle de *P. caerulea* endémique de la Méditerranée. L'haplotype le plus fréquent inclut des individus de presque toutes les régions à l'exception du Maroc et l'Italie. Des séquences de patelles marocaines sont toutefois partagées dans le deuxième haplotype le plus fréquent ensemble avec l'Espagne, la Grèce et la Tunisie. Cependant, les échantillons issus de l'Italie, précisément en Sicile, ne partagent aucun haplotype avec les autres populations. Ainsi, à l'exception des échantillons siciliens, des haplotypes partagés entre au moins quatre pays ont été enregistrés dans le réseau d'interconnexion (figure 18) soulignant l'absence de toute structuration biogéographique. Les patelles tunisiennes ont été représentées par des haplotypes partagés dans les deux haplotypes les plus fréquents mais définissent aussi de nombreux haplotypes spécifiques.

L'absence de structuration des *P. caerulea* démontre un grand brassage des populations au sein de ce milieu semi-fermé qu'est la Méditerranée. Toutefois, supposant que le marqueur

COI puisse manquer de diversité fine pour révéler la variabilité intraspécifique, nous avons analysé le polymorphisme de la cassette ribosomique ITS1-5.8S-ITS2 reconnus comme étant des portions riches naturellement de diversité nucléotidique chez les animaux) (figure 19).

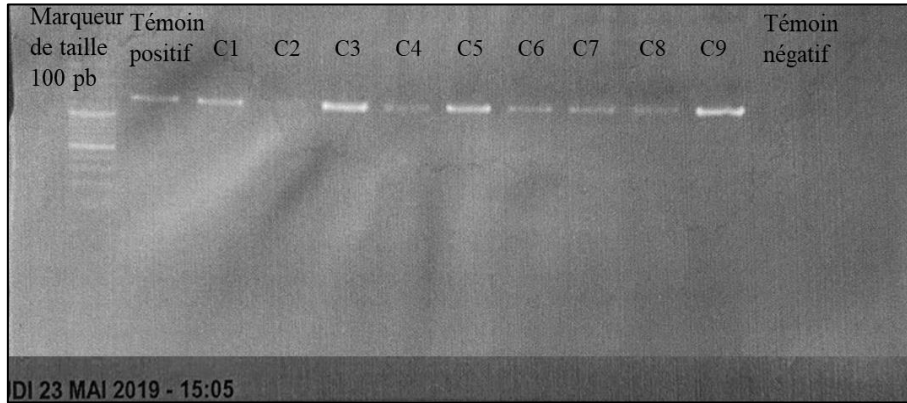


Figure 19: Exemple d'un profil PCR (ITS) obtenu sur *P. caerulea* (site C)

L'analyse du réseau d'interconnexions (figure 20) basé sur les ITS1 et ITS2 a permis de confirmer le fort brassage inter-populationnel au niveau de la Tunisie. Seule une légère particularité génétique semble exister entre les individus des îles Kerkennah (points bleus) et les patelles des 3 autres sites tunisiens. A l'aide du logiciel DNAsp nous avons estimé la différenciation inter populationnelle (F_{st}) et le nombre de migrants par génération (N_m) entre les sites tunisiens (Tableau 6). Les F_{st} restent faibles allant de 0.03679 à 0.13602.

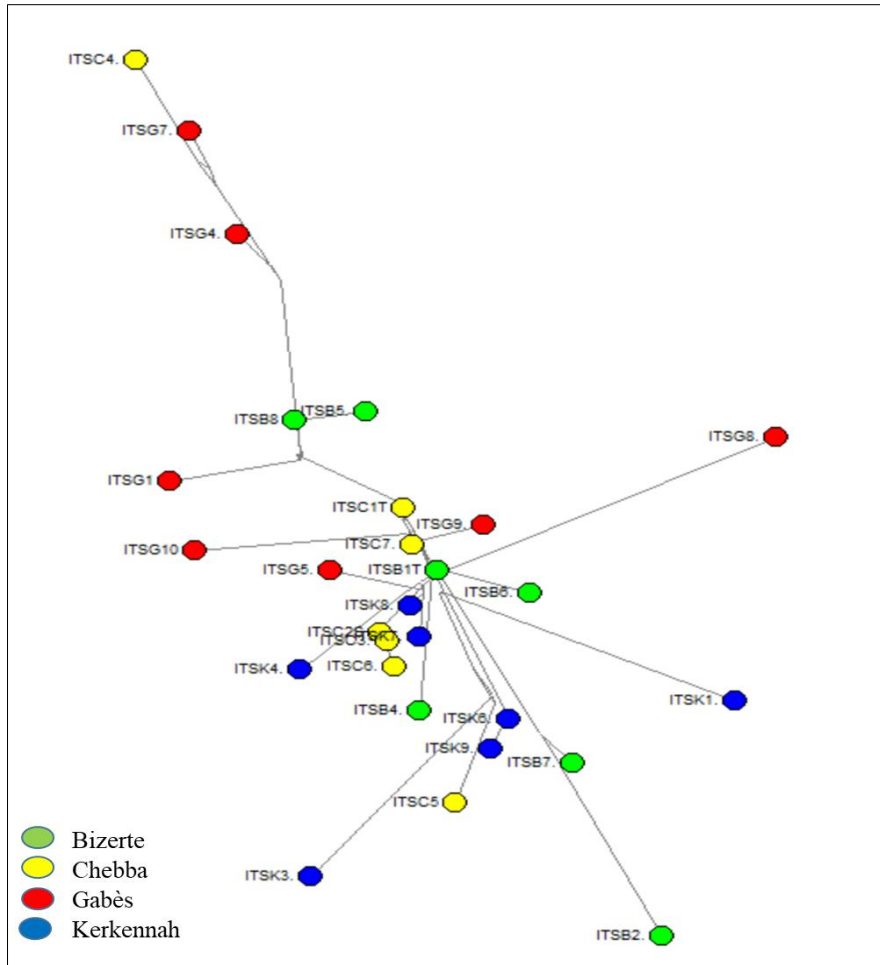


Figure 20: Réseau d'interconnexions entre 4 différentes populations tunisiennes de *Patella caerulea*, basé sur les informations de l'ITS1 (518 pb) et l'ITS2 (337 pb) ribosomiques utilisant Networks 10.

Tableau 6: Différentiation inter populationnelle estimée avec le logiciel DNAsp. Moyenne du nombre de différences nucléotidiques entre populations (K_{xy}), L'indice de différenciation inter populationnelle (F_{st}) estimé utilisant le calcul de Hudson, Slatkin et Mad.

	Ks	K_{xy}	Fst	Nm
Bizerte-Chebba	72.28571	77.12245	0.06272	3.74
Bizerte-Kerkennah	88.57143	98.30612	0.09902	2.27
Bizerte-Gabès	88.19048	93.67347	0.05853	4.02
Chebba-Kerkennah	75.28571	82.08163	0.13602	1.59
Chebba-Gabès	74.90476	78.42857	0.04493	5.31
Gabès-Kerkennah	91.19048	94.67347	0.03679	6.55
B/C/K/G	81.73810	86.25661	0.05225	4.53

IV.1.1 Discussion

Les patelles du genre *Patella* sont connues pour leur grande plasticité morphologique, ce qui rend leur identification difficile à cause de leur diversité morphologique et leur répartition géographique (Sa Pinto et al., 2008). L'espèce *P. caerulea* ne fait pas exception à cette

ambiguïté taxinomique. L'arbre phylogénétique basé sur le COI (figure 17) a montré que la patelle de méditerranée (*P. caerulea*) est proche de *P. lugubris* présente aux Azores, Cap vert et en Méditerranée, puis vient l'espèce *P. candei* localisée à Madère et aux îles canaries. Ceci est étonnant car il est possible en Méditerranée de rencontrer 5 espèces : *P. aspera* (= *P. ulyssiponensis*), *P. caerulea*, *P. lugubris*, *P. ferruginea*, et *P. rustica*. Il semblerait donc que *P. caerulea* et *P. lugubris* soient issues d'un ancêtre provenant de l'Atlantique, ce qui ne serait pas le cas des autres espèces de Méditerranée (Bouzaza, 2018). Selon Sá-Pinto et al., (2008). Il est probable que ces trois espèces aient émergé d'un ancêtre commun duquel auraient divergé deux ensembles génétiques : l'un aurait été isolé dans ce qui a donné la Méditerranée et l'autre serait resté dans l'Atlantique. Après la fermeture du détroit de Gibraltar l'isolement génétique se serait amplifié entre les deux ensembles aboutissant à des espèces différentes en Atlantique (*P. candei*) et en Méditerranée (*P. caerulea*, *P. lugubris*). Ce scénario serait en accord avec le fait que lors du dernier maximum glaciaire (-18 000 ans), le niveau de la mer était d'environ 100 m en dessous du niveau actuel. Au cours des 10 000 dernières années suivante la Méditerranée a été inondée, entraînant ainsi une colonisation des organismes provenant de l'Atlantique (Hewitt, 2000).

La constitution des réseaux d'interconnexions populationnelles révèle des haplotypes partagés entre les populations du Sud-Ouest de la Méditerranée avec un fort brassage génétique (figure 18). La présence des gyres et des tourbillons du large (« *eddies* ») en Atlantique induit une dispersion des masses d'eau de l'Atlantique via le détroit de Gibraltar, en Méditerranée. Ces masses d'eau avancent progressivement au niveau du bassin méditerranéen et prennent des déviations différentes selon les forçages, les gyres, les tourbillons, les veines et les branches qui vont les transporter en passant (figure 21) (Doglioli, 2020). Les courants principaux en Méditerranée respectent un sens anticyclonique (figure 22) (sens inverse des aiguilles d'une montre) ce qui favorise une dispersion larvaire du Nord vers le Sud-Est (El-Geziry et Bryden, 2010). Tous ces phénomènes complexes de circulation seraient sans doute responsables de l'homogénéité génétique de *P. caerulea*.



Figure 21: Carte des sous-bassins, les principaux passages et détroits de la Méditerranée (les traits blancs indiquent les fronts) (Ayache, 2016)

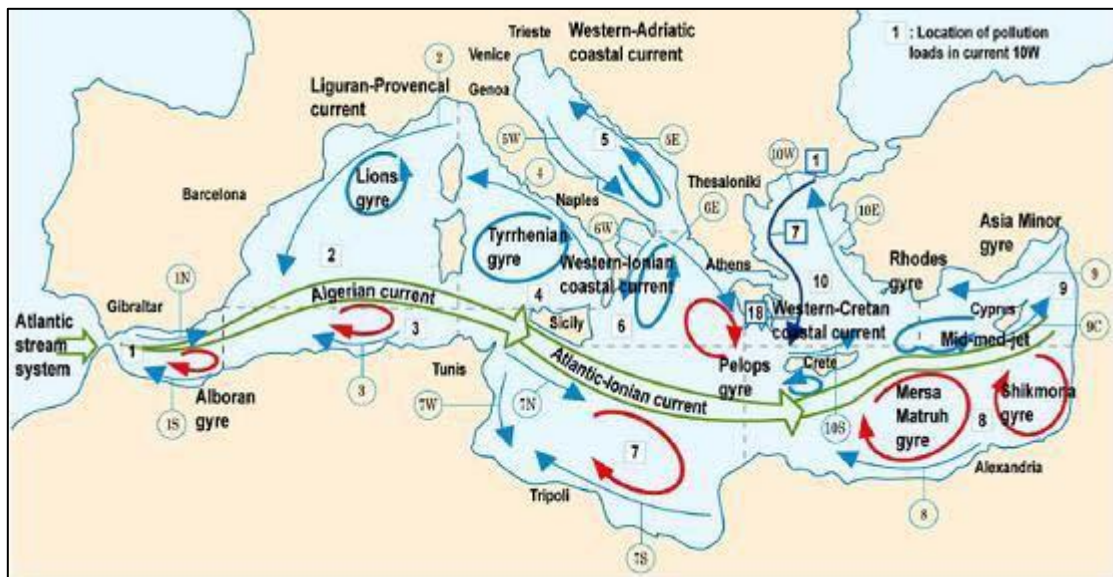


Figure 22: Circulation générale en mer Méditerranée (Stamou et Kamizoulis, 2008)

Ce phénomène a été suggéré par Cowen et al. (2006), Sá-Pinto et al. (2008) et Bouzaza (2018) qui ont indiqué que les larves pourraient ainsi parcourir plus de cent kilomètres. Wesselmann et al. (2018) a également souligné l'importance des courants océaniques sur la dispersion des larves pélagiques du bivalve *Pinna nobilis*. Ce brassage génétique a également été décrit pour plusieurs espèces de poissons méditerranéens (Galarza et al., 2009) et pour *P. ferruginea* le long des côtes algériennes par Bouzaza (2018). En revanche ce phénomène de brassage à grande échelle n'a pas été observé pour les espèces d'Atlantique : *P. rustica*, *P. candei* et *P. vulgata* (Côrte-Real et al., 1996b; Sá-Pinto et al., 2008).

Les populations de *P. caerulea* qui présentent le plus d'interconnexions sont celles de Tunisie et d'Italie (Sicile). Kallouche (2018) a fait la même observation. Le « front Almeria-Oran » (AOF) (figure 23), considéré par Sá-Pinto et al. (2012) comme barrière aux flux de gènes au sein de la Méditerranée, ne semble pourtant pas limiter la dispersion de *P. caerulea*. Par contre, d'après la carte représentant les différentes barrières ou fronts au niveau de la mer Méditerranée (figure 23), il semblerait que les fronts SSF, NTF, NAF, AF, OF, IF et TF seraient à l'origine de l'isolement de la population provenant de Sicile (Kallouche, 2018). Les populations italiennes seraient ainsi isolées des autres populations de Méditerranée. En revanche, les patelles de Tunisie partagent des haplotypes avec des patelles originaires du Maroc, de Grèce et d'Espagne (figure 18). Cela semble montrer un grand brassage populationnel au sein du milieu semi-fermé que forme la Méditerranée.

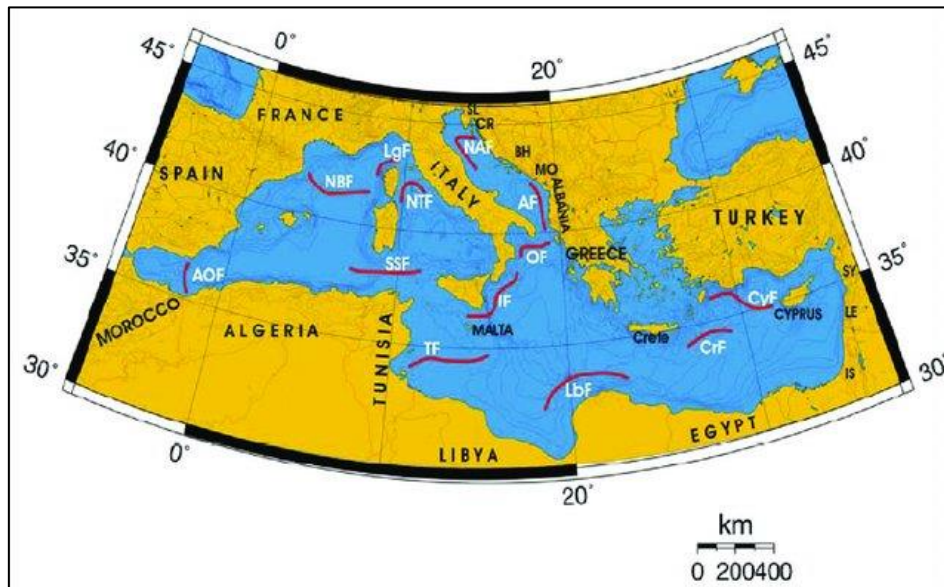


Figure 23: Les fronts de la mer Méditerranée d'après Bazairi et al. (2010) et Sá-Pinto et al. (2012) (AF=Albanian Front, AOF=Almeria-Oran Front, CrF=Crete Front, CyF=Cyprus Front, LbF=Libyan Front, LgF=Ligurian Front, NAF=North Adriatic Front, NBF=North Balearic Front, NTF=North Tyrrhenian Front, OF=Otranto Front, SSF=Sardinia-Sicily Front, TF=Tunisian Front)

Le network (basé sur les ITS1 et ITS2) mettant en évidence les connexions entre les patelles tunisiennes ainsi que l'analyse F_{st} ont montré qu'il existe un fort brassage moléculaire entre les populations. Ceci serait dû également aux courants marins qui longent toutes les côtes tunisiennes et qui seraient responsables d'une redistribution aléatoire des larves de patelles le long du littoral. Seules les îles Kerkennah qui se situent au large de Sfax sembleraient n'être que peu impactées par ces courants côtiers et auraient donc moins de migrants provenant du Nord, expliquant ainsi un début de différenciation génétique des individus de ces îles. Ce phénomène de divergence génétique au niveau des îles a également été remarqué dans d'autres études portant sur l'effet de l'insularité de certains crustacés marins (Radulovici et al., 2010).

Des études futures basées sur les microsatellites et la région D-loop pourraient permettre d'avoir une meilleure résolution sur la structure génétique de cette espèce dans l'archipel des Kerkennah.

Tous les résultats acquis sur la diversité génétique de *P. caerulea* ont fait l'objet d'une communication affichée lors de la 30^{ème} édition du congrès international SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) à Dublin (SETAC SciCon 2020).

IV.2 Diversité génétique des modèles atlantiques *P. vulgata* et *L. littorea*

IV.2.1 Diversité génétique de *Patella vulgata*

Des individus de *P. vulgata* ont été échantillonnés tout au long de l'aire de répartition de l'espèce : Norvège (2018), Ecosse (2019), France (2019) et Irlande (2019). Nous avons également pu disposer de séquences de Cytochrome oxydase-sous unité I (COI) accessibles sur NCBI provenant de patelles d'Angleterre, d'Espagne, d'Italie et du Portugal (figure 24).

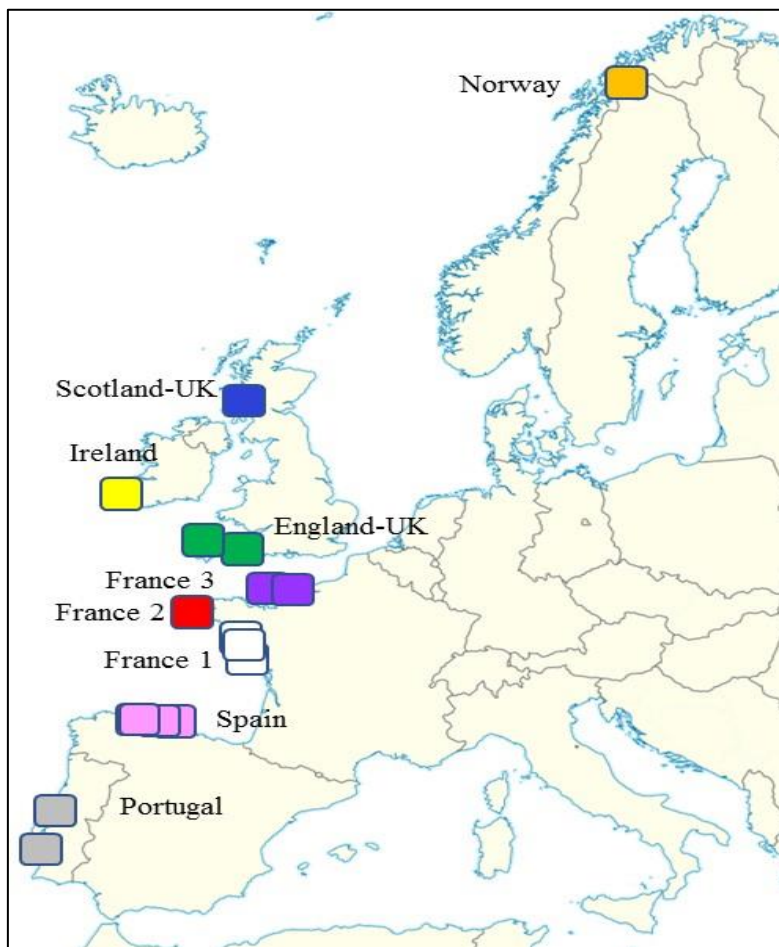


Figure 24: Carte de répartition des échantillons de *P. vulgata*.

(Note : England-UK : Millport/Plymouth, France 1 : Bailleron/La Turballe/Noirmoutier, France 2 : Le Dellec, France 3 : Granville/Luc sur mer, Ireland : Portmagee; Portugal : Monte Clérigo/Molego, Norway:Tromsø, Spain : Figueras, Gijón, La Atalaya, La franca, Luarda, Porcia, San Pedro; Scotland-UK: Oban)

Utilisant des amorces spécifiques définies au laboratoire pour une amplification sélective du COI (fragment de 560 pb) nous avons pu tout d'abord, comme pour *P. caerulea* précédemment, vérifier le statut de l'espèce de tous les échantillons que nous avons utilisé. L'analyse phylogénétique obtenu (figure 25) a révélé que tous les individus étaient bien inclus dans le clade regroupant toutes les séquences de *P. vulgata* provenant de NCBI. Seul l'individu N7 de Noirmoutier n'était pas une *Patella vulgata* mais une *P. depressa*.

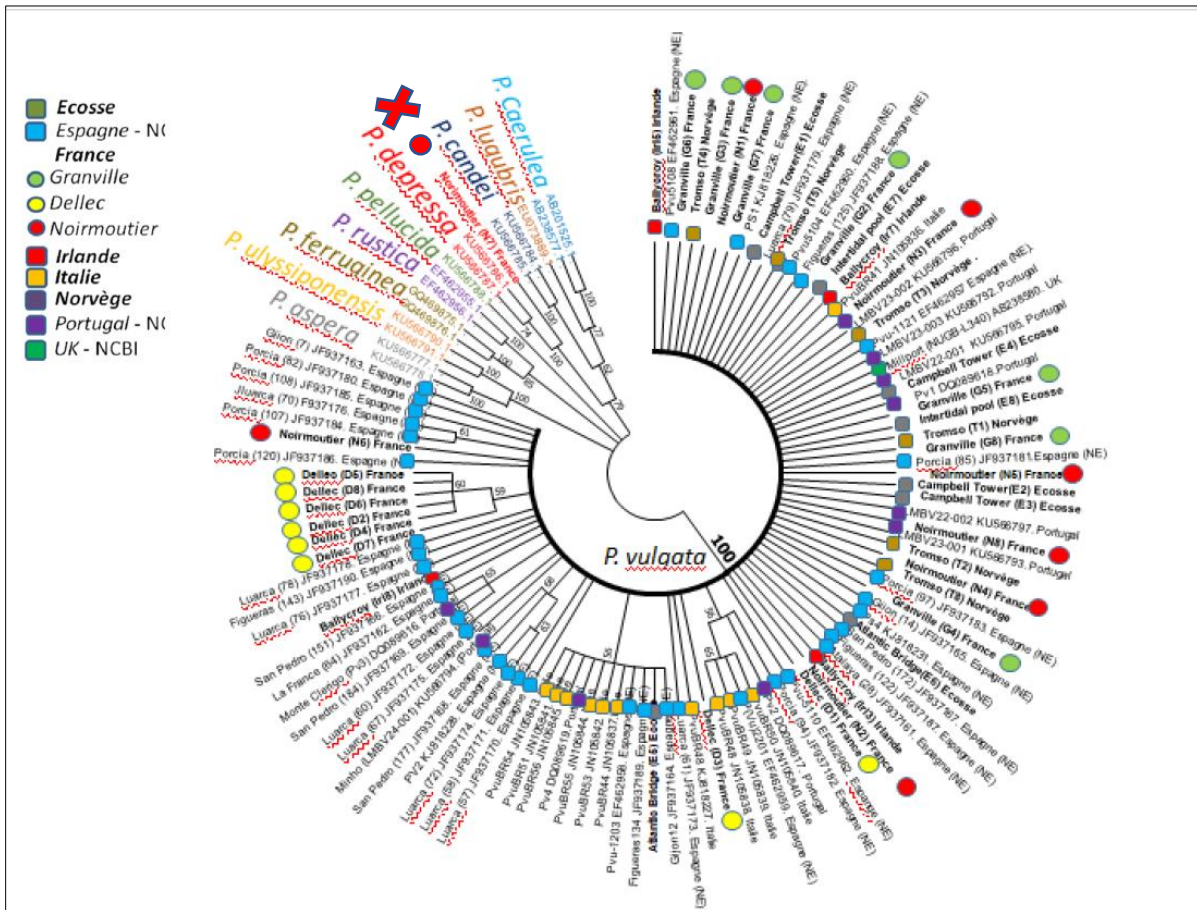


Figure 25: Analyse moléculaire phylogénétique (Maximum Likelihood, model : Kimura-2 parameter+I, MEGA7) basée sur le COI (436 pb retenues) de diverses espèces de patelles. Les paramètres de l'arbre sont : log likelihood (-1832.23), Maximum Composite Likelihood (MCL), [+I] = 68.22% sites. Les cercles externes représentent les individus français (personnellement échantillonnés) ; tandis que les formes internes matérialisent des individus d'autres pays dont les séquences sont issues de NCBI.

Ces données de COI (125 séquences) de *P. vulgata* nous ont également permis également de définir les liens d'interconnexions entre les populations (figure 26). Au total, 30 haplotypes ont été identifiés avec une structure en étoilée caractéristique d'une espèce en expansion (Jenkins et al., 2018) (figure 25). On note la présence de sept haplotypes fréquents dont deux sont observés en fréquence majoritaire, les autres sont moins représentés.

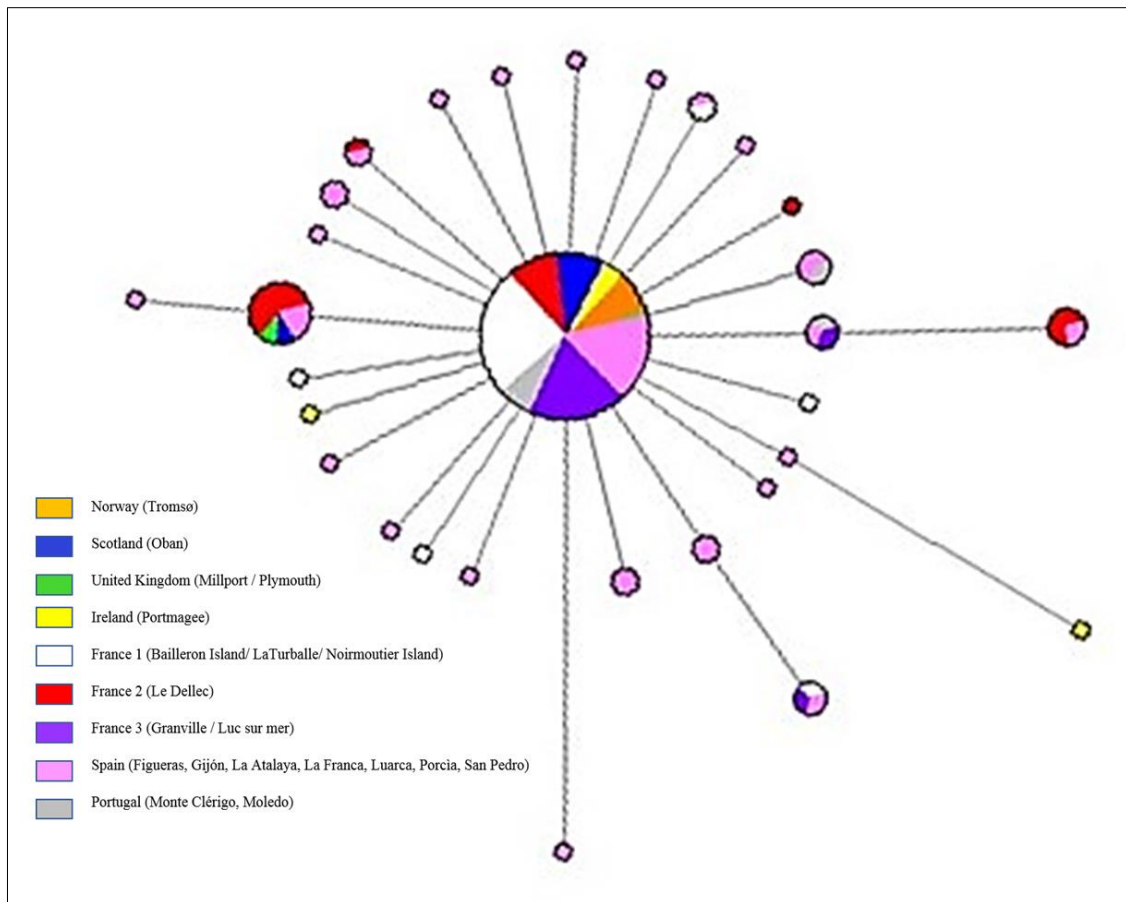


Figure 26: Arbre d'interconnexion entre toutes les populations de *Patella vulgata* basé sur le COI mitochondrial (436 pb, 125 séquences) réalisé avec Networks. Les petits cercles représentent les haplotype présents dans un seul individu

L'examen de la répartition des haplotypes majoritaires confirme un fort brassage au sein de l'Atlantique (figure 27).

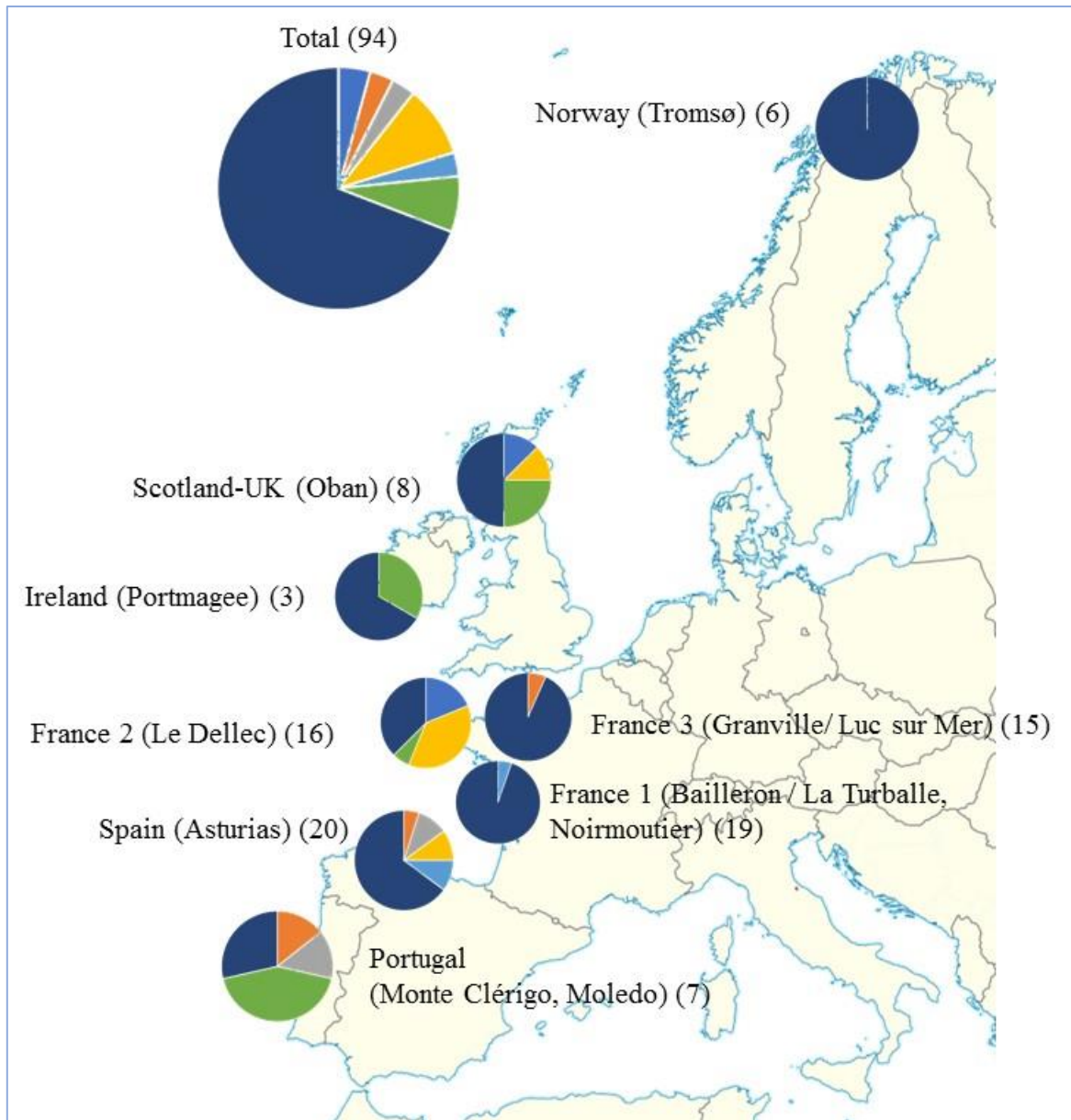


Figure 27: Structure de la population à grande échelle chez *Patella vulgata*. Les sept haplotypes COI les plus fréquents (total : 30 haplotypes notés) ont été présentés sur cette figure. Chaque haplotype a été observé au minimum chez 3 individus. Les séquences (436 pb) de 94 individus ont été analysées.

Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre total d'individus analysés par site

L'analyse du polymorphisme a révélé une variation hétérogène de la valeur de diversité haplotypique allant de 0 (Norvège) à 0.909 ± 0.040 (Espagne) et une valeur faible pour la diversité nucléotidique et comparable entre toutes les populations allant de 0.00031 ± 0.00026 (France 3) à 0.00550 ± 0.00267 (Irlande) (tableau 7). Les haplotypes rares révélés dans le réseau d'interconnexion sont représentés par les indices de diversité faisant parti des plus faibles ($\pi = 0.00057 \pm 0.00041$ et $H_d = 0.250 \pm 0.180$ pour la Grande Bretagne) voire nul ($H_d=0$ pour les haplotypes norvégiens avec absence de tout polymorphisme nucléotidique). Ceci indique que

les populations d'Espagne et du Portugal sont plus fortement diversifiées, présentant notamment plus d'haplotypes.

Ces résultats sont supportés par les valeurs de test de neutralité négatives et significatives de D et F_s (p < 0,001) (tableau 7) avec une diversité haplotypique globale de 0.653±0.049 et une très faible diversité nucléotidique (π = 0.00232±0.00029).

Tableau 7: Indices de neutralité et de diversité de *P. vulgata* basé sur les données de COI (436 pb)

Origine	N	S	$\pi \pm SD$	K	h	Hd \pm SD	F _s	D
France 1	23	6	0.00120±0.00046	0.522	6	0.395±0.128	-4.206	-2.07807*
France 2	18	5	0.00294±0.00054	1.281	5	0.745±0.064	-0.630	0.37589
France 3	15	1	0.00031±0.00026	0.133	2	0.133±0.112	-0.649	-1.15945
Ireland	5	6	0.00550±0.00267	2.400	3	0.700±0.218	0.952	-1.14554
Norway	6	0	No polymorphism	0	1	0	/	/
Portugal	8	3	0.00172±0.00061	0.750	4	0.643±0.184	-1.832	-1.44751
Scotland-UK	8	1	0.00057±0.00041	0.250	2	0.250±0.180	-0.182	-1.05482
Spain	40	24	0.00372±0.00042	1.622	24	0.909±0.040	-29.937	-2.40324**
<i>P. vulgata</i>	125	33	0.00232±0.00029	1.013	30	0.653±0.049	-40.477	-2.50005 ***

(N= nombre de séquences ; S : nombre de sites polymorphes, π : diversité nucléotidique ; K : Moyenne des différences nucléotidique ; h : nombre d'haplotypes ; Hd : diversité haplotypique. Différence statistique : *P<0.05, **P<0.01, *** P < 0.001

Cette moindre diversité des populations du Nord pourrait être en accord avec un scénario d'isolement géographique lors de la dernière glaciation, séparant les populations du Nord de *P. vulgata* (Norvège, Angleterre, Irlande) gardées dans un climat plus rude (plus froid) induisant un goulot d'étranglement puis un effet fondateur ; alors que les populations du Sud en Europe de l'Ouest (Espagne, Portugal) auraient eu moins de pression de sélection par la présence d'un climat plus tempéré.

Nous avons voulu préciser cette approche de la diversité génétique de *P. vulgata* en abordant la variabilité de la région D-loop mitochondriale. Des amorces spécifiques ont été définies à partir du génome partiel disponible sous NCBI (MH916653). Deux PCR spécifiques ont alors été entreprises avec des amorces au sein des gènes encadrants la D-loop localisées dans la région comprise entre le 12S et le COIII (figure 28).

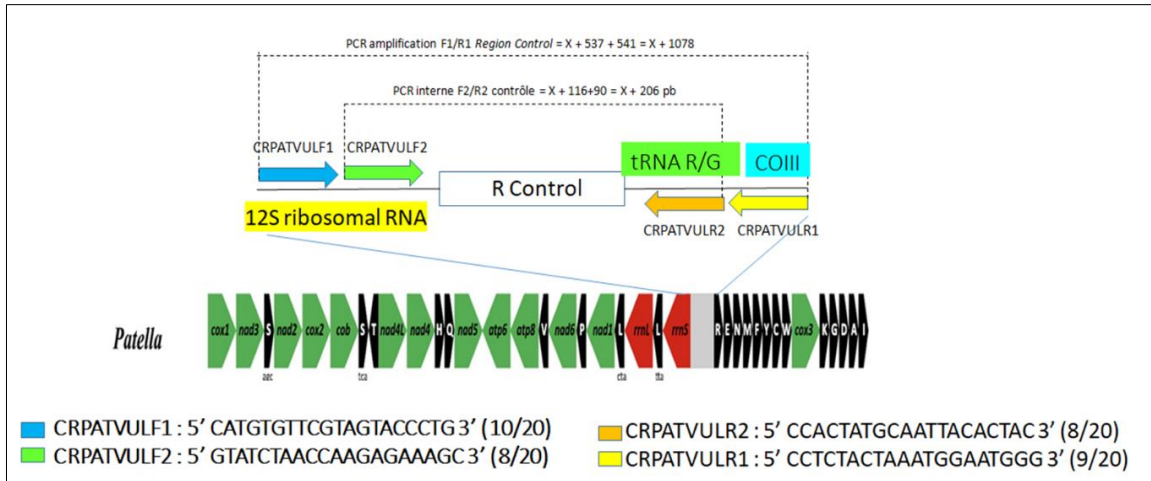


Figure 28: Mitogénome partiel de *P. vulgata* (MH916653) et localisation et séquences des amorces définies pour amplifier la région contrôle (D-loop) mitochondriale

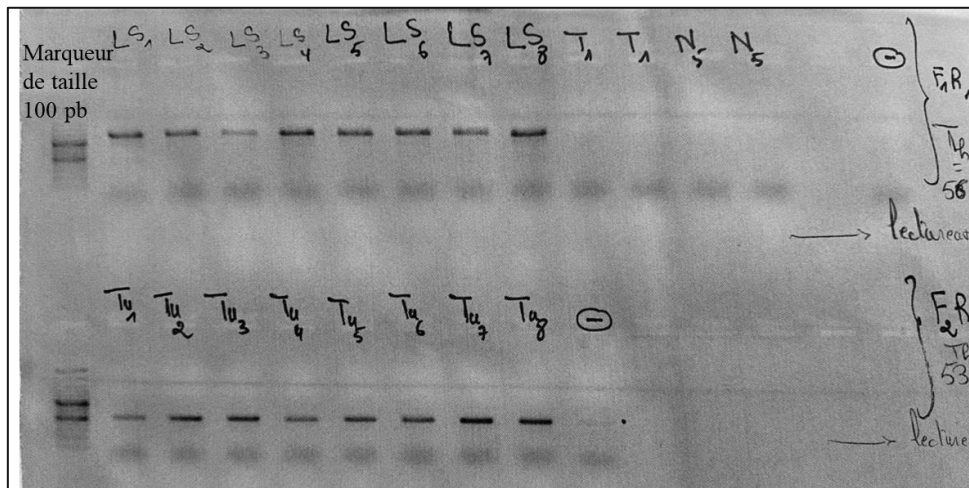


Figure 29 : Exemple de profile de PCR (D-Loop) sur des individus de *P. vulgata*

L'analyse de la D-Loop (figure 29) confirme les résultats du COI et montre que peu de mutations ont été notées entre les différents individus quelle que soit leur origine. Il est à noter que nous ne disposons pas d'échantillons provenant d'Espagne ou du Portugal. Comme le montre la figure 30 ci-dessous aucune structuration forte des populations de *P. vulgata* n'est visible excepté par un haplogroupe incluant que les individus norvégiens (couleur orange sur la figure). Cela nous rappelle ce qui a été observé pour cette même population pour l'analyse du COI. Il y a également une expansion de deux groupes incluant soit les individus prélevés en Nord-Ouest en France (Normandie), soit en Centre-Ouest (Loire Atlantique, Vendée), séparés tous deux par un regroupement comprenant notamment les individus collectés en Bretagne (Dellec). Cette séparation génétique respecte donc une répartition géographique des populations françaises analysées.

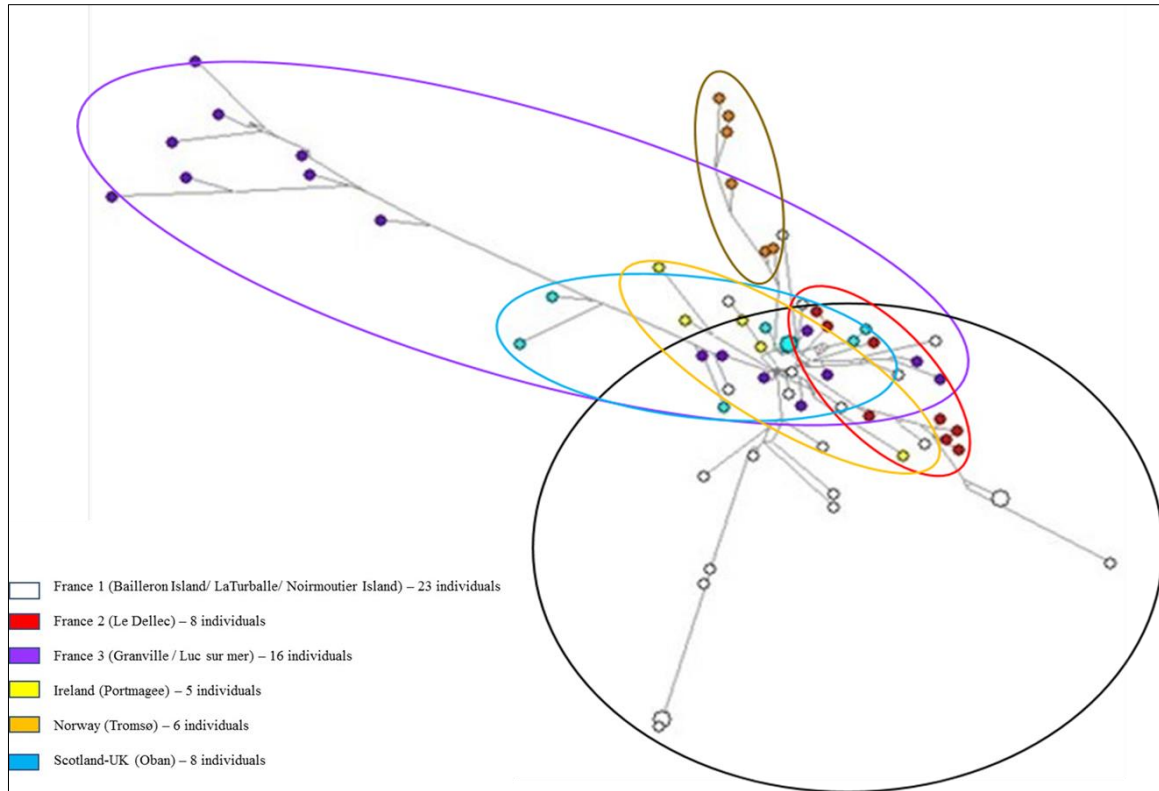


Figure 30: Réseau d'interconnexion d'haplotypes basé sur le gène D-loop (548 pb, 66 séquences) de différentes populations de *Patella vulgata* réalisé avec Network. Les petits cercles représentent les haplotypes présents chez un individu

L'analyse du polymorphisme a révélé une valeur élevée de diversité haplotypique globale ($Hd = 0.991 \pm 0.006$) et une valeur faible pour la diversité nucléotidique ($\pi = 0.03365 \pm 0.00353$) ; ce qui correspond à ce qui a été observé pour le COI en termes de diversité globale (tableau 8). Ces résultats sont supportés par les valeurs négatives des tests D de Tajima et FS de Fu (-1.35238 et -35.452, respectivement) (tableau 8). La diversité haplotypique entre populations est homogène avec un léger maximum au niveau de la Norvège, France 2 et Irlande et une diversité nucléotidique comparable aux autres populations (elle est la plus faible au niveau de la population France 2). Ces résultats justifient davantage la tendance des haplotypes à se regrouper formant des groupes un peu isolés comme on l'a vu pour la population de *P. caerulea* des îles Kerkennah en Tunisie.

Tableau 8: Indices de neutralité et de diversité de *P. vulgata* basé sur les données de D-Loop (548 pb)

Origine	N	S	$\Pi \pm SD$	K	H	$Hd \pm SD$	Fs	D
France 1	16	65	0.04485±0.00425	22.875	14	0.975±0.035	-1.135	0.42811
France 2	8	19	0.01249±0.00237	6.607	8	1.000±0.063	-3.143	-0.96153
France 3	23	59	0.02944±0.00284	14.957	21	0.992±0.015	-6.851	-0.74473
Ireland	5	22	0.02115±0.00513	11.000	5	1.000±0.126	-0.213	-0.88356
Norway	6	31	0.02500±0.00348	13.400	6	1.000±0.096	-0.528	-0.27829
Scotland	8	38	0.02558±0.00481	13.429	7	0.964±0.077	0.084	-0.57322
<i>P. vulgata</i>	66	113	0.03365±0.00353	16.655	57	0.991±0.006	-35.452	-1.35238

Le nombre de différences nucléotidiques entre populations (Kxy), le niveau de différenciation inter populationnelle (Gst de Nei) et le nombre de migrant par population (Nm) ont été calculés à l'aide du logiciel DNAsp (tableau 9). Leurs estimations confirment les résultats du Network (basé sur le COI) indiquant que la population de la Norvège est distante génétiquement des autres populations avec les nombres de migrants les plus élevés (Nm= 330).

Tableau 9: Indices de génétique de populations entre les populations de *Patella vulgata* calculés à partir de la D-loop (région contrôle, 548 bp) 66 séquences

Population 1	Population 2	Kxy	Dxy	Da	Gst	Nm
Scotland	Norway	14.95833	0.03022	0.00703	0.01031	24.00
Scotland	Ireland	10.05	0.0203	0.00162	0.03709	19.28
Scotland	France 2	9.23438	0.01866	0.00221	0.00901	27.50
Scotland	France 1	20.03125	0.04047	0.00752	0.01874	13.09
Scotland	France 3	14.40217	0.0291	0.00342	0.01801	13.63
Norway	Ireland	12.8	0.02586	0.00599	0.02604	330.00
Norway	France 2	11.70833	0.02365	0.00602	0.00149	168.00
Norway	France 1	24.28125	0.04905	0.01492	0.01661	14.80
Norway	France 3	16.44928	0.03323	0.00637	0.01899	12.91
Ireland	France 2	6.275	0.01268	-0.00045	0.00431	57.78
Ireland	France 1	19.2625	0.03891	0.00929	0.01309	18.84
Ireland	France 3	11.75652	0.02375	0.0014	0.03973	6.04
France 2	France 1	18.82031	0.03802	0.01063	0.00026	23.02
France 2	France 3	10.82065	0.02186	0.00128	0.00921	26.91
France 1	France 3	23.67935	0.04784	0.01122	0.00886	27.98

(Kxy : Les nombres moyens de différence nucléotidique ; Dxy : Nombres moyens de substitutions nucléotidiques par site ; Da : Nombres moyens net de substitution nucléotidiques par site)

Pour mieux appréhender les distances génétiques qui existent entre les différentes populations, une matrice de comparaison par paires a été établie utilisant ARLEQUIN (tableau 10). En comparant deux à deux les populations analysées on note que les populations irlandaise et norvégienne sont les plus distantes génétiquement avec la différenciation génétique la plus élevée comparée aux autres populations (Fst= 42%) traduisant une structuration modérée. Une structuration modérée est aussi enregistrée entre la population issue de la Norvège et celle du

Dellec (France 2) avec un F_{st} de 36%. Pour toutes les autres populations, une absence de subdivision génétique significative est notée ($F_{st} < 0,3$) (les indications des valeurs des F_{st} sont présentées en annexes).

Tableau 10: Matrice de comparaison par paires de la distance génétique : F_{st} (en dessus de la diagonale) et Kimura-2P (en dessous de la diagonale) entre les différentes populations de *P. vulgata* basé sur la D-Loop (ARLEQUIN)

	Norway	Ireland	Scotland	France1	France2	France3
Norway		0.42052	0.28517	0.29990	0.36215	0.25952
Ireland	0.28129		0.23243	0.20722	0.25136	0.07654
Scotland	0.31751	0.08063		0.13670	0.17312	0.11438
France1	0.31553	0.14055	0.16357		0.22848	0.23226
France2	0.32802	0.11353	0.10722	0.24329		0.08546
France3	0.22085	0.02489	0.08763	0.24562	0.06574	

Significativité statistique : * $P < 0.05$

Un test de Mantel ne montre toutefois pas de relation linéaire entre la distance géographique entre les populations et leur différenciation génétique (figure 31). Ceci pourrait être lié à un fort pouvoir de dispersion des larves qui, comme cité précédemment, pourraient via les courants parcourir plus de 100 km à partir de leur lieu d'éclosion.

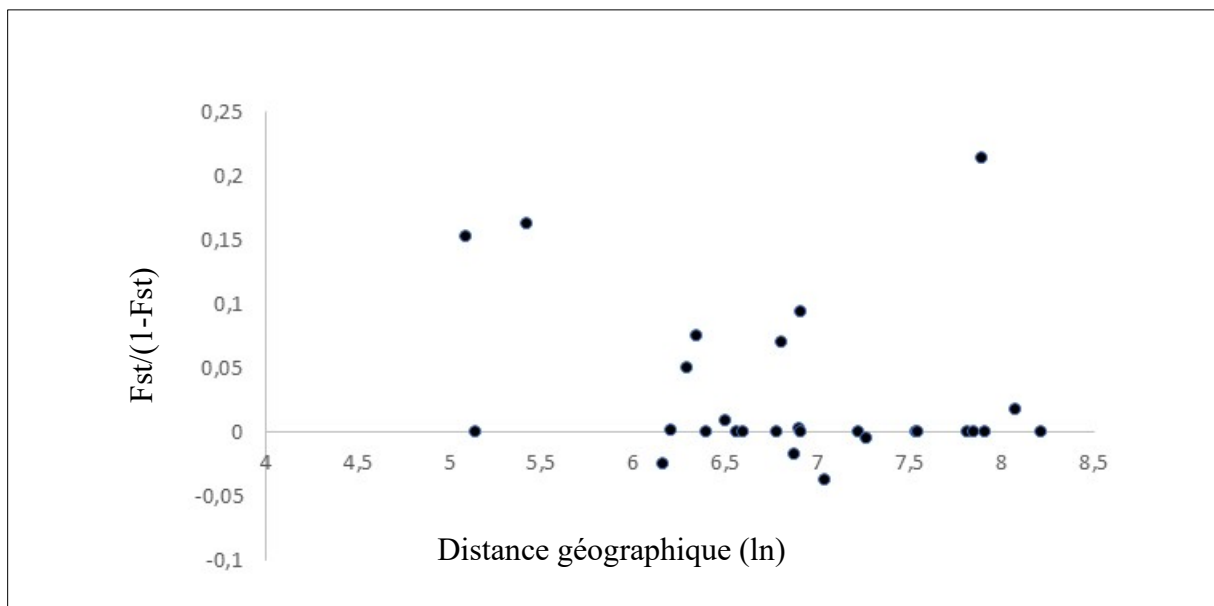


Figure 31: Relations entre le F_{st} transformé et le logarithme de la distance géographique pour les populations de *P. vulgata*

En conclusion, l'espèce *P. vulgata* dont l'aire de répartition s'étend de la Norvège au Portugal montre une moindre diversité dans la population norvégienne par rapport à celles plus au Sud ; ceci pouvant être probablement mis en relation avec les effets d'isolement lors de la dernière période glaciaire et induisant un fort goulot d'étranglement génétique. De plus, les populations du Sud (Espagne, Portugal) se sont avérées les plus riches en diversité. La différenciation entre les populations du Nord et celles diversifiées du Sud serait en lien avec les courants marins en Atlantique.

IV.2.2 Diversité génétique de *Littorina littorea*

Littorina littorea (bigorneau) est un gastéropode dont l'aire de répartition native s'étend de la Norvège à l'Espagne (<https://www.sealifebase.ca/summary/Littorina-littorea.html>). Nous avons pu disposer de séquences de COI acquises chez des individus provenant d'Angleterre, de Belgique, du Danemark, d'Espagne, de France, d'Irlande, de Norvège, des Pays-Bas et de Suède (figure 32). Bien que présente en Amérique du Nord, nous n'avons pas pris en considération des séquences provenant d'animaux du Canada et des USA car cela ne relève pas de l'aire native de l'espèce. En effet, l'espèce semble avoir été introduite en Amérique du Nord via des populations provenant très probablement d'Irlande. Au total, 391 séquences ont été utilisées pour cette analyse globale de diversité génétique.

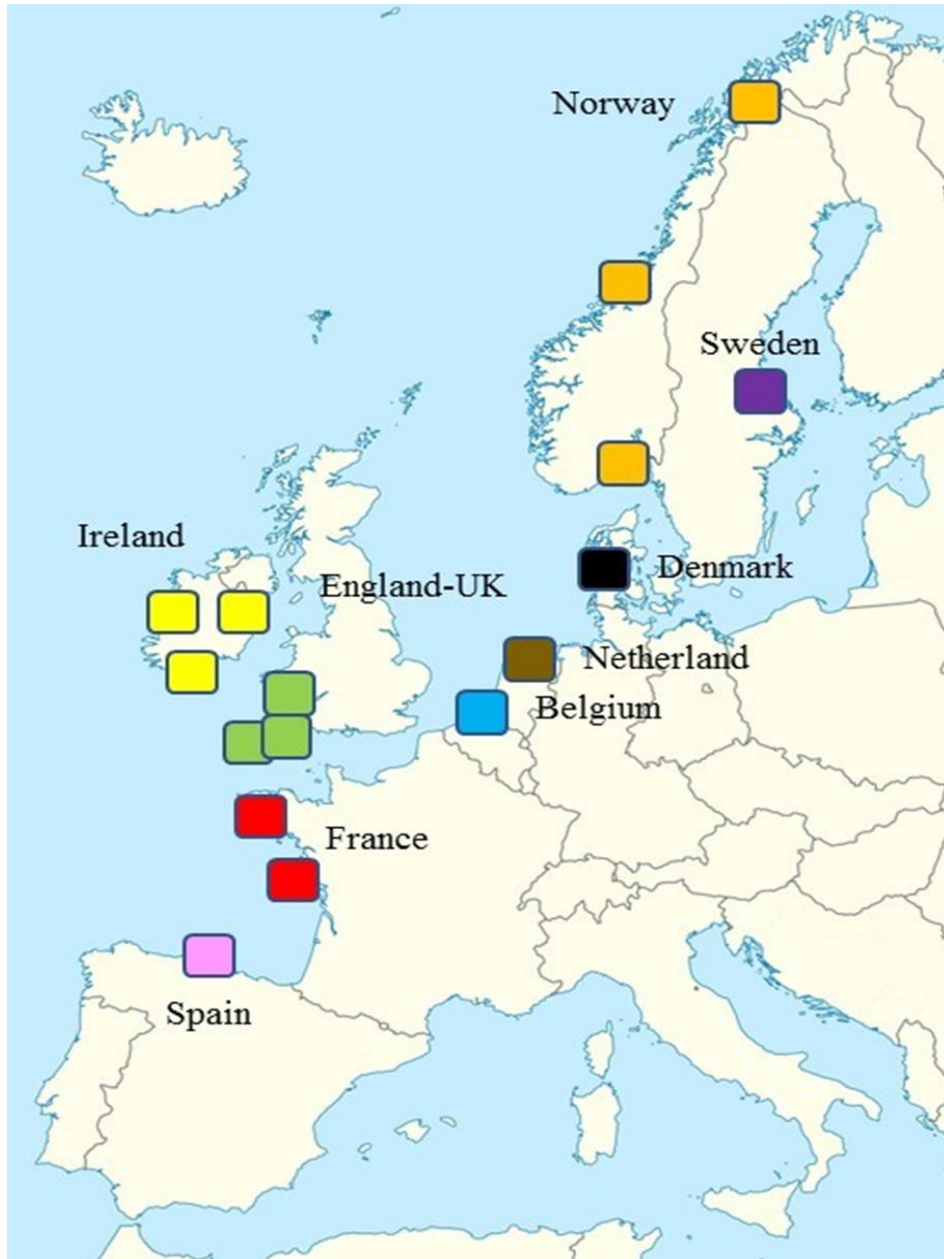


Figure 32: Les différentes populations de *Littorina littorea* couvrant toute son aire native

La constitution du réseau d'interconnexions pour *L. littorea* montre une structure en étoile similaire à celle observée chez *P. vulgata* (figure 33) dans laquelle apparaissent deux haplogroupes majoritaires dont l'un regroupe une majorité d'individus provenant de la Norvège. Il semble donc exister une structuration plus accentuée chez le bigorneau par rapport à la *P. vulgata*.

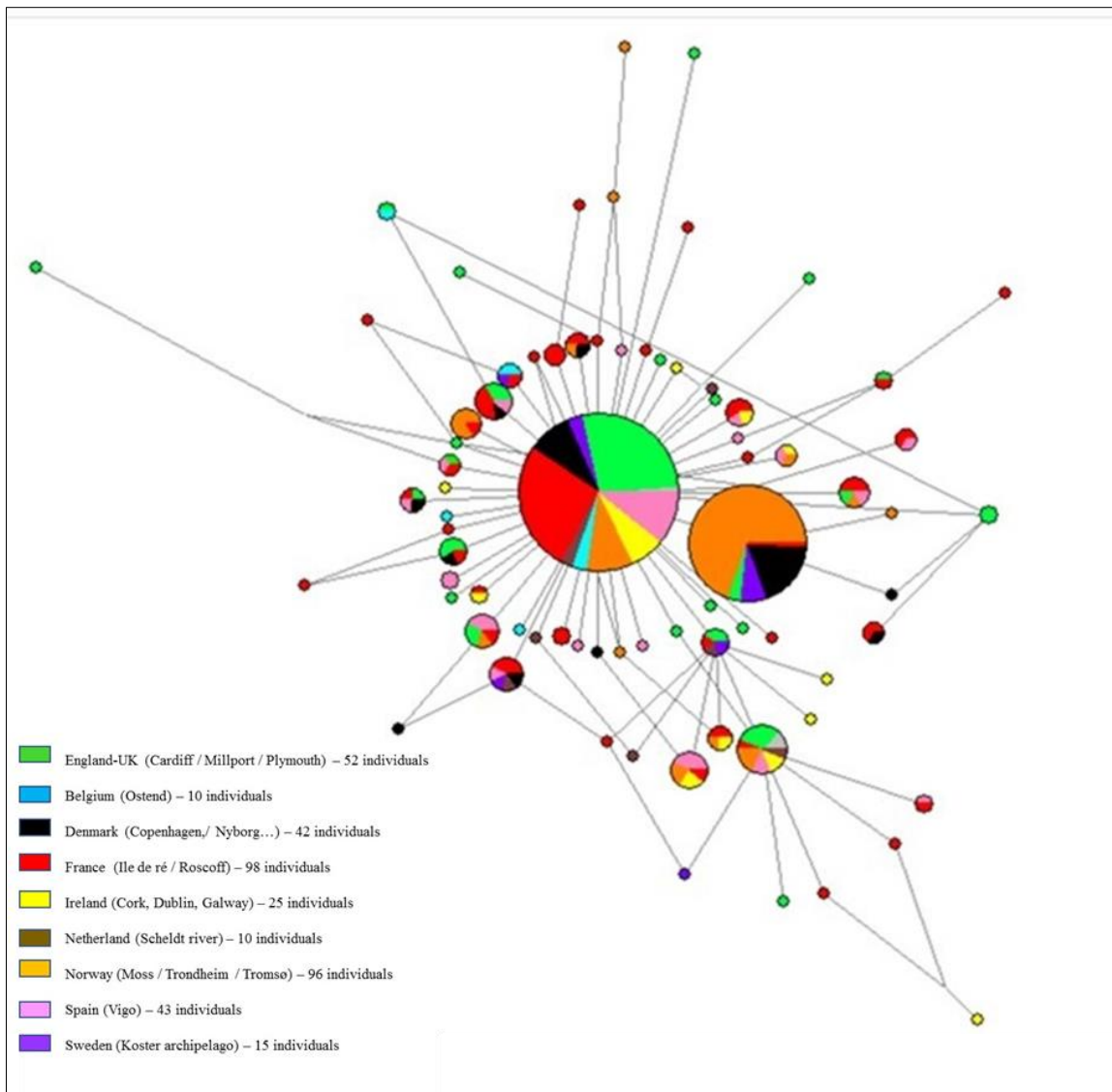


Figure 33: Arbre d'interconnexion entre toutes les populations de *Littorina littorea* basé sur le COI mitochondrial (416 pb, 391 séquences) réalisé avec Networks 10. Les petits cercles représentent les haplotypes présents dans un seul individu

Les diversités nucléotidique et haplotypique montrent une différence entre les populations. Les populations de Norvège sont moins variables que les autres (Tableau 11). L'analyse de neutralité nous indique également un indice D de neutralité sélective fortement négatif et significatif ($p < 0,001$) typique de populations en expansion.

Tableau 11 : Indices de neutralité et de diversité de *L. littorea* basé sur les données de COI (416 pb)

Origine	N	S	$\pi \pm S.D.$	K	h	Hd $\pm S.D.$	Fs	D
Tromsø (No)	32	8	0.00277 \pm 0.00056	1.151	8	0.601 \pm 0.096	-3.231	-1.25855**
Trondheim (No)	54	11	0.00243 \pm 0.00045	1.012	10	0.574 \pm 0.070	-5.162	-1.66856*
Moss (No)	10	3	0.00208 \pm 0.00093	0.867	3	0.511 \pm 0.164	0.206	-0.65748
Sweden	15	5	0.00307 \pm 0.00075	1.276	6	0.762 \pm 0.081	-2.072	-0.57372**
Denmark	42	12	0.00280 \pm 0.00043	1.166	12	0.733 \pm 0.052	-8.133	-1.82341*
Netherland	10	4	0.00321 \pm 0.00072	1.333	6	0.833 \pm 0.127	-3.329	-0.38227
Belgium	10	5	0.00028 \pm 0.00080	1.156	5	0.756 \pm 0.130	-1.896	-1.38818
Dublin (Ir)	10	8	0.00502 \pm 0.00149	2.089	6	0.778 \pm 0.137	-1.719	-1.12745
Galway (Ir)	9	5	0.00307 \pm 0.00093	1.278	5	0.722 \pm 0.159	-1.886	-1.29379
Cork (Ir)	6	5	0.00449 \pm 0.00098	1.876	5	0.933 \pm 0.122	-2.263	-0.82582
England-UK	52	28	0.00287 \pm 0.00043	1.195	25	0.667 \pm 0.061	-29.276	-2.44647**
Roscoff (Fr)	66	27	0.00394 \pm 0.00050	1.640	29	0.794 \pm 0.054	-35.142	-2.34778**
Ile de Ré (Fr)	32	14	0.00261 \pm 0.00049	1.084	13	0.735 \pm 0.086	-11.676	-2.28955**
Spain (Asturias)	43	17	0.00333 \pm 0.00049	1.383	17	0.791 \pm 0.065	-15.582	-2.12009*
<i>L. littorea</i>	391	61	0.00348 \pm 0.00017	1.448	76	0.797 \pm 0.017	-32.786	-2.43017***

(n= nombre de séquences; S: nombre de sites polymorphes, π : diversité nucléotidique; K: Moyenne des différences nucléotidique; h: nombre d'haplotypes; Hd: diversité haplotypique. Différence statistique : *P<0.05, **P<0.01, *** P < 0.001
*P<0.05, **P<0.01, *** P < 0.001

Pour mieux appréhender les distances génétiques qui existent entre les différentes populations de littorines, une matrice de comparaison par paires est établie grâce au logiciel ARLEQUIN (tableau 12). En comparant deux à deux les populations analysées on note que les distances génétiques les plus élevées sont notées entre les populations du Nord et celles du Sud avec un indice de Fst maximal de 32% entre une population en Norvège (Mors) et une autre en mer du Nord (Pays Bas) traduisant une structuration génétique modérée entre les deux populations.

Tableau 12: Matrice de comparaison par paires de la distance génétique : Fst (en dessus de la diagonale) et Kimura-2P (en dessous de la diagonale) entre les différentes populations de *L. littorea* basées sur les données de COI

	Tromsø	Trondheim	Moss	Sweden	Denmark	Netherland	Belgium	Dublin	Galway	Cork	England	Roscoff	Ile de Ré	Spain
Tromsø		-0.01283	-0.04217	0.01975	0.01958	0.26814	0.264487	0.26186	0.23240	0.25884	0.22083	0.19663	0.25618	0.22746
Trondheim	-0.01351		-0.03972	0.05127	0.03235	0.32946	0.30248	0.33239	0.29367	0.32411	0.25113	0.23130	0.28843	0.27159
Moss	-0.03481	-0.03512		0.03028	0.02303	0.32128	0.32593	0.26136	0.29905	0.29109	0.25571	0.20929	0.30756	0.25917
Sweden	0.01758	0.0427	0.03764		-0.01878	0.09816	0.11237	0.11115	0.08306	0.10665	0.08968	0.06623	0.11603	0.09341
Denmark	0.01971	0.03155	0.0356	-0.02048		0.18504	0.14205	0.20612	0.14225	0.18251	0.11292	0.10334	0.13694	0.13125
Netherland	0.25619	0.29989	0.31724	0.0967	0.17395		0.09843	-0.02886	-0.02662	-0.01884	0.05224	0.01625	0.07525	0.01838
Belgium	0.26478	0.2898	0.32593	0.11466	0.14261	0.09677		0.09975	0.04057	0.07539	0.01480	-0.00585	0.02769	0.02688
Dublin	0.21689	0.25648	0.26111	0.09864	0.16045	-0.02667	0.09877		-0.02602	-0.02655	0.08631	0.04331	0.10458	0.04541
Galway	0.22445	0.26983	0.29562	0.08302	0.13532	-0.0267	0.03947	-0.02365		-0.05124	-0.00253	-0.01811	0.01828	-0.03729
Cork	0.20408	0.24051	0.25455	0.08163	0.13034	-0.02857	0.05556	-0.02299	-0.06125		0.06220	0.01767	0.08150	0.00114
England	0.2227	0.25463	0.28653	0.08634	0.11347	0.04482	0.0164	0.04669	-0.00598	0.01888		-0.00237	0.00627	0.00792
Roscoff	0.20785	0.2354	0.26074	0.07671	0.10852	0.02695	0.00827	0.02912	-0.00754	0.007	-0.00276		0.00055	0.00130
Ile de Ré	0.25647	0.28635	0.32364	0.11067	0.13758	0.06333	0.02497	0.0686	0.01066	0.0338	0.00734	0.00407		0.01152
Spain	0.22977	0.26636	0.29467	0.09642	0.13129	0.02004	0.03464	0.02466	-0.03456	-0.02094	0.0068	0.00214	0.01248	

Une représentation de répartition des haplotypes majoritaires révèle une répartition clinale du Nord vers le Sud (figure 34). Nous avons donc un ensemble assez homogène des populations du Danemark, Norvège et Suède, tandis que l'autre ensemble est constitué par les populations d'Angleterre, Belgique, Espagne, France, Irlande et Pays bas. On observe ainsi un haplotype orange majoritaire dans le Nord et un haplotype bleu majoritaire dans le Sud. Cette répartition clinale des haplotypes n'induit pas d'isolement reproductif au sein de l'espèce, ce qui est visible par les valeurs faibles de F_{st} . Il est noté également que les populations du Sud sont plus riches en haplotypes majoritaires que celles du Nord.

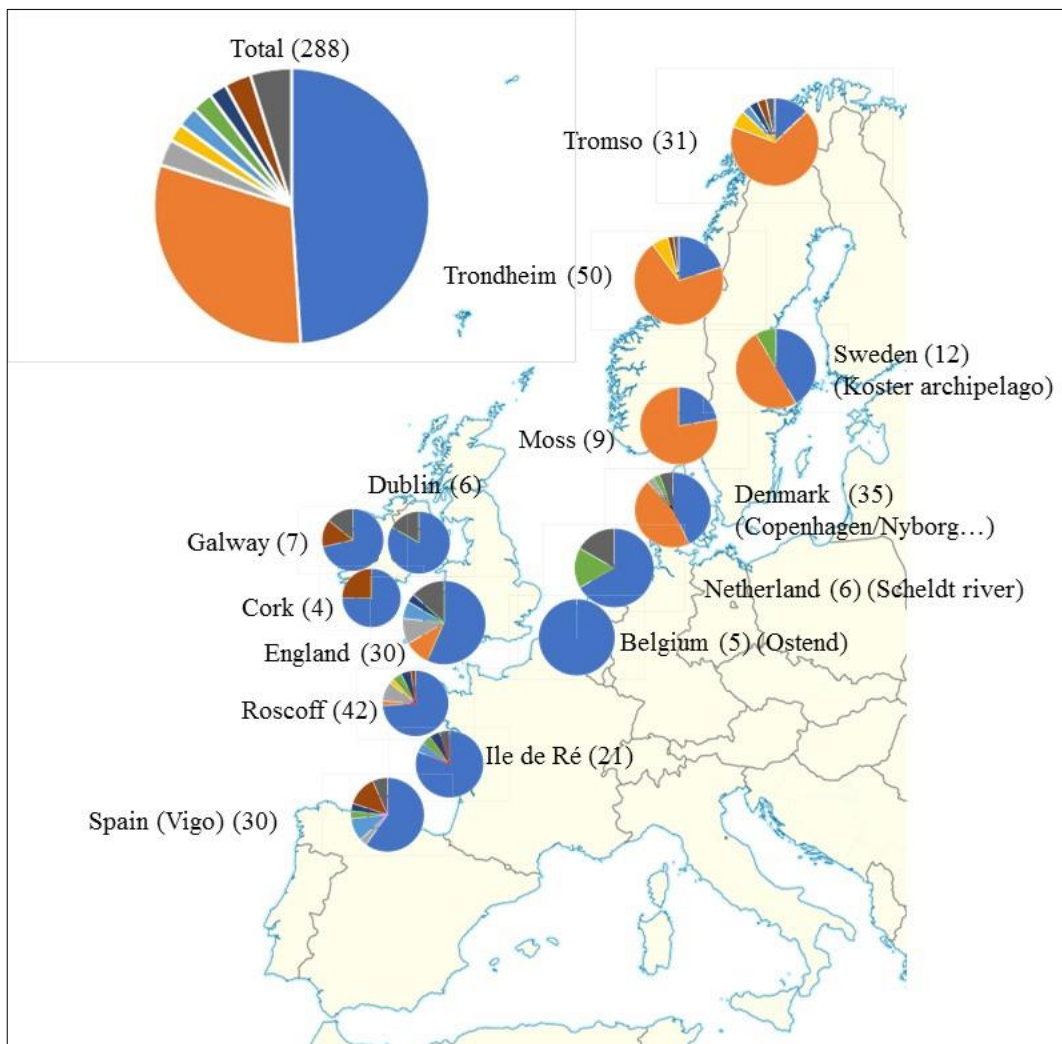


Figure 34: Structure de la population à grande échelle chez *L. littorea*. Les sept haplotypes COI les plus fréquents (total : 30 haplotypes notés) ont été présentés sur cette figure. Chaque haplotype a été observé au minimum chez 6 individus. Les séquences (416 pb) de 288 individus ont été analysées. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre total d'individus analysés par site

IV.2.3 Discussion

La structure génétique observée pour la littorine (*L. littorea*) à travers la constitution du réseau d'interconnexions et de répartition des haplogroupes majoritaires indique une répartition

clinale du Nord vers le Sud avec une augmentation du nombre d'haplotypes au fur et à mesure que l'on descend le long des côtes Atlantiques. Ces observations sont en accord avec le scénario de l'effet de la dernière période glaciaire, montrant une expansion rapide des populations via la recolonisation lorsque les glaciers ont commencé à se retirer de leurs positions maximales (Hewitt, 2000). Les calottes glaciaires s'étendaient jusqu'au niveau de la Grande-Bretagne et l'Irlande, laissant une zone libre de glace dans le centre-sud de l'Angleterre, avec peut-être une petite zone libre de glace dans le sud-ouest de l'Irlande (Chiverrell et Thomas, 2010). L'avancée des calottes glaciaires a entraîné une baisse drastique du niveau de la mer dans la Manche, entraînant l'émersion complète du canal entre l'Angleterre et la France, à l'exception d'un paléo-fleuve qui s'étendait sur la marge continentale (Ménot et al., 2006). Cela suggère que les communautés côtières existantes habitant ces zones sont probablement des re-colonisateurs provenant de refuges glaciaires (un lieu où diverses espèces ont pu survivre durant les périodes glaciaires). Cela explique la faible diversification des populations nordiques de *L.littorea* et de *P. vulgata*. Il a été suggéré que « Hurd Deep », une tranchée dans la Manche (frontière entre la France et les îles britanniques) aurait pu persister en tant que lac marin pendant le dernier maximum glaciaire (DMG), agissant ainsi comme un refuge glaciaire potentiel. D'autres zones plus au Sud, dont la Bretagne et la péninsule ibérique ont également servi de refuges pendant le DMG (Jenkins et al., 2018) (figure 35). Cela a été soutenu par des niveaux élevés de diversité génétique trouvés dans ces zones, une signature clé indiquant des refuges glaciaires (Provan et Bennett, 2008).

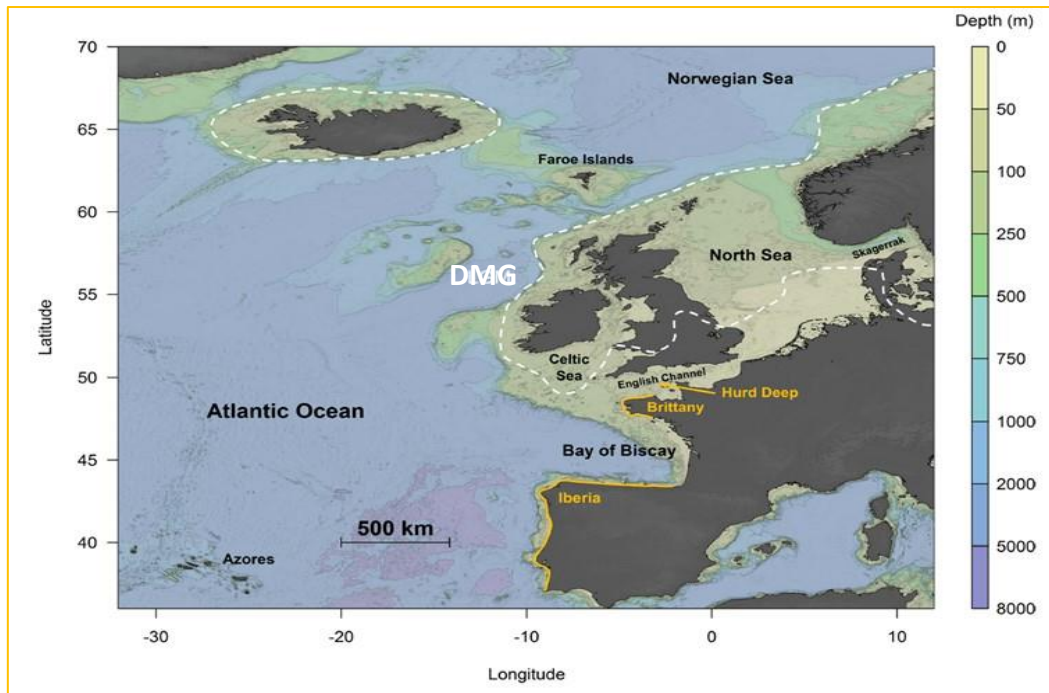


Figure 35 : Carte topographique de l'océan Atlantique Nord -Est. Les lignes pointillées matérialisent l'expansion maximale de la calotte de glace lors de la dernière glaciation. Les lignes orange indiquent les refuges glaciaires (selon Jenkins et al., (2018))

L'action des courants et des gyres anticycloniques en Atlantique pourrait venir expliquer aussi cette séparation de variabilité génétique plus forte dans le sud que dans le Nord traduite par la présence des haplotypes identiques de l'Irlande vers l'Espagne avec la différenciation des populations plus au Nord. Pour la littorine, nous nous retrouvons dans le même contexte que pour la patelle *P. vulgata* avec une répartition larvaire liée à l'action des grands courants de surface. Il apparaît clairement sur la carte ci-dessous (figure 36) qu'il y a deux grands courants sur les côtes Ouest Atlantiques : l'un remonte le long de l'Irlande puis la Norvège ; tandis que l'autre part vers le Sud longeant la France un peu au large puis les côtes espagnoles et portugaises. Ces courants viendraient également expliquer pourquoi il y a une légère séparation entre les populations françaises selon qu'elles soient au Nord ou au Sud de la Bretagne. L'anticyclone des Açores favoriserait davantage la dispersion larvaire et donc la variabilité génétique au niveau du Sud.

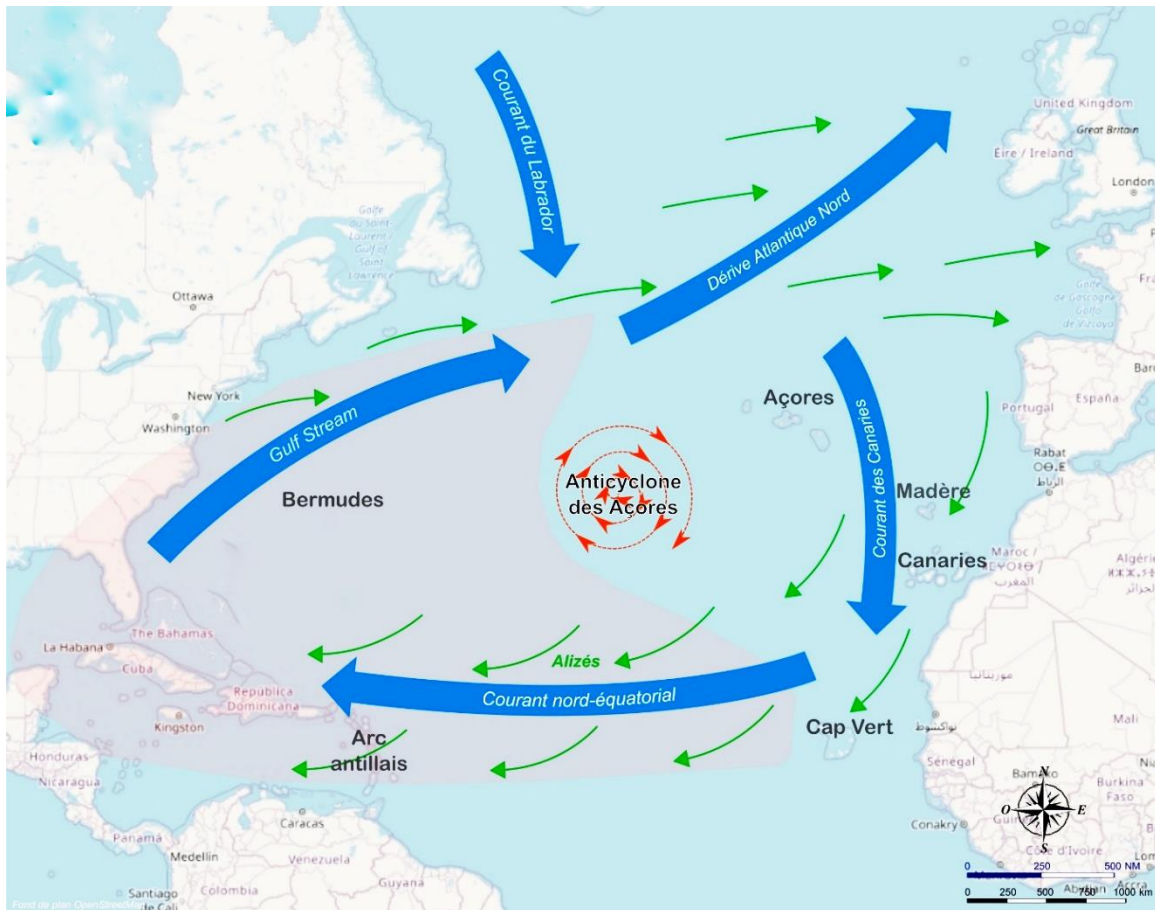


Figure 36: Représentation des deux courants principaux se divisant au niveau de l'Irlande et l'Angleterre. L'un des courants part vers le Nord (Irlande, Angleterre) tandis que le second plonge vers le Sud (France, Espagne) (adaptation d'après Caesar et al., (2021))

La caractérisation de la diversité génétique de *Littorina littorea* réalisée au sein de ce travail de thèse est plus précise quant à la différenciation génétique le long des côtes Atlantique et de la mer du Nord, que celle établie pour l'espèce *L. saxatilis* (Doellman et al., 2011). Cette précédente étude ne contenait pas de populations nordiques (Danemark, Suède, Norvège) mais se concentrait sur les populations d'Angleterre, Irlande et France.

CHAPITRE III

Chapitre III : Relation entre biodisponibilité environnementale des métaux et dérèglement de l'homéostasie redox chez la patelle méditerranéenne *Patella caerulea* des côtes tunisiennes

I. Introduction

I.1 Généralités sur la situation environnementale en Méditerranée et en Tunisie

La plupart des aménagements côtiers en Méditerranée ne tiennent pas compte de l'impact à long terme. Plus de 50% de la population humaine des pays méditerranéens sont concentrés le long de la côte. La région côtière attire plus de 30% du tourisme mondial et la tendance est à la hausse (WWF, 2020). De plus, la mer Méditerranée, de par son aspect semi-fermé, subit pleinement l'accumulation des rejets de déchets agricoles, domestiques et industriels provenant des pays limitrophes (El-Geziry and Bryden, 2010; Woodward, 2009). Par conséquent, elle est considérée comme l'une des mers subissant les dommages les plus intenses des activités anthropiques, tel que le rejet de métaux (Milano et al. 2012 ; Guittonny-Philippe et al. 2014). Cent trente et un points chauds de pollution ont été ainsi identifiés le long des côtes méditerranéennes par le SAP (Stratégie Action Programme) de l'UNEP (Figure 37). Les sources de pollution sont représentées à : 26% par des émissions urbaines, 18% par des rejets industrielles et 56% par des libérations mixtes (agricoles, domestiques, industrielles, urbaines). En Tunisie, deux grandes villes côtières ont été déclarées comme prioritaires en terme d'impact anthropique ; Bizerte (au Nord du pays) et Gabès (au Sud-Est) (UNEP/MAP, 2003). Les zones côtières tunisiennes abritent 64% de la population humaine totale et concentrent la plupart des activités économiques du pays (WWF 2020). Plusieurs villes situées le long de la côte sont responsables d'une pollution anthropique intense (urbanisation, industrialisation et activités agricoles), comprenant souvent des métaux (Ghannem et al., 2014; Harrabi et al., 2018; Ladhar-Chaabouni et al., 2012).



Figure 37: Points chauds de pollution au niveau des côtes méditerranéennes (Inspirée du : Deuxième rapport sur les points chauds de pollution en Méditerranée (UNEP/MAP, 2003))

Au cours des dernières décennies, la Tunisie a observé un développement important des secteurs agricoles, industriels et urbains. En effet, aux moins 12% des 10 000 entreprises industrielles officiellement enregistrées en Tunisie ont été identifiées comme fortement polluantes. Elles sont concentrées, du Nord au Sud : Bizerte, Tunis, Sousse, Mahdia, Sfax, Gabès, et Gafsa (INS, 2013). Ce développement est accompagné inévitablement de problèmes de pollution et de contamination de l'environnement aquatique, entre autres par les éléments traces métalliques. Les pollutions identifiées comme liées aux activités humaines (commerce maritime, industries, transports routiers, déchets individuels) sont surtout de type chimique et organique (Drira, 2009; Ghannem et al., 2014; El Zrelli et al., 2015).

I.2 Pertinence du suivi des métaux en milieu marin en Tunisie

Les effluents domestiques et industriels, l'activité minière et les eaux d'écoulement chargées par les engrais et les pesticides utilisés en agriculture sont autant de sources ayant contribué à l'augmentation des concentrations des ETM dans le milieu marin et surtout en zone côtière (Drira, 2018). Ces polluants s'accumulent principalement dans les sédiments où, n'étant pas sujets à la décomposition bactérienne ou à toute autre forme de dégradation, ils persisteront indéfiniment (Bélangier, 2009). Les ETM présents dans l'eau et dans les sédiments sont absorbés par les plantes et les animaux marins. Ceux-ci sont capables d'en éliminer une certaine partie *via* l'excrétion mais, au-delà d'une certaine quantité, les métaux s'accumulent dans les organismes et tout au long de la chaîne alimentaire. Ils peuvent atteindre des concentrations menaçant la survie de certaines populations naturelles et présenter des dangers pour la santé

humaine (Essack, 2018). Ceci peut même aller jusqu'à la disparition de certaines espèces intolérantes causant ainsi de profonds bouleversements dans la diversité et la structure des communautés biologiques (Ramade, 2007). Ainsi, il est important en écotoxicologie d'évaluer les niveaux des métaux présents dans les écosystèmes (*monitoring* chimique) et dans les organismes (*monitoring* biologique) (Rumisha et al., 2017b). En effet, dans le domaine du *biomonitoring* environnemental, les articles scientifiques consacrés à la contamination par les ETM représentent plus de 40% des travaux publiés, soit bien davantage que pour n'importe quel autre type de contaminant (Bélangier, 2009).

De point de vue écotoxicologique, les caractéristiques des micropolluants métalliques sont généralement les suivantes (Boucheseiche et al., 2002) :

- ✓ Non biodégradables,
- ✓ Toxiques cumulatifs (accumulation dans les tissus des organismes vivants),
- ✓ Toxiques à des concentrations seuils.

Le tableau 13 représente une synthèse des principales sources et origines des divers éléments traces métalliques étudiés dans le cadre de ce chapitre :

Tableau 13: Sources des éléments traces métalliques étudiés (Drira, 2018)

Eléments	Sources									
	Les mines et les fonderies de métaux		Les industries		Les retombées atmosphériques		L'agriculture		Les dépôts des déchets sur les sols	
	Terrils et résidus	Traitements des eaux	Plastiques	Terrils et résidus	Sources urbaines/ industrielles	Industries pyri-métallurgiques	Engrais	Eaux d'irrigation	Boues d'épuration	Tas de ferrailles
Fe										*
Cd	*	*	*		*	*	*	*	*	*
Cu		*			*	*			*	*
Zn		*		*		*	*		*	*
Pb	*				*	*		*	*	*
Ni		*				*			*	

Comme il a été mentionné auparavant, il est possible d'estimer les niveaux de contamination métallique grâce à des dosages chimiques des ETM dans l'eau et dans les organismes. Plusieurs organismes marins ont été évalués en tant que bioindicateurs possibles d'accumulation des contaminants notamment les métaux trace dans des secteurs côtiers marins. En Tunisie, plusieurs recherches se sont focalisées sur l'étude de la contamination métallique au niveau des régions côtières (Hamza-Chaffai et al., 2003; Ennouri et al., 2010; Belkhodja et al., 2012; Rabaoui et al., 2013; Barhoumi et al., 2014; Ghannem et al., 2014; Mezghani-Chaari et al., 2015; Ben Salem et Ayadi, 2016; Drira, 2018).

I.3 Les bioindicateurs mollusques en Méditerranée

En Avril 2002, 24 chercheurs, faisant partie du programme d'évaluation et de contrôle de la pollution marine en Méditerranée (MED POL / UNEMAP), venant de la plupart des pays du bassin méditerranéen et de la mer noire se sont réunis dans le cadre d'un atelier portant sur la fondation d'un programme « *Mussel Watch* méditerranéen » sous l'égide du CIESM. Ils se sont mis d'accord sur le choix de la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis*, comme bioindicateur quantitatif de la contamination par les radionucléides et les métaux trace puisqu'elle est présente sur tout le littoral du bassin méditerranéen et de la mer noire (Fischer et al., 1987). Cependant, le développement côtier induisant la destruction des habitats de cette espèce ainsi que l'interférence avec des espèces invasives provenant de la mer Rouge étaient à l'origine de la réduction au niveau des stock de cette espèce qui est devenue rare et même absente dans la partie Sud et Est de la Méditerranée (Nakhlé, 2003). L'utilisation d'espèces comme la moule africaine *Perna* spp ou le *Brachidontes variabilis*, appartenant toutes les deux à la famille Mytilidae a été admise comme solution alternative dans les conclusions du CIESM (2002).

En réalité, les différents pays méditerranéens sont amenés à utiliser des espèces distinctes en fonction de leur abondance sur leurs côtes littorales respectives :

En Syrie, deux espèces de mollusques gastéropodes *Monodonta turbinata* et *Patella* spp ont été utilisées comme bioindicateurs quantitatifs des éléments traces comme l'As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Pb et Zn (Al-Masri, 2002).

Au Liban, *Patella caerulea* (Shiber et Chatila, 1978; Nakhlé, 2003) et le bivalve *Spondylus spinosus* (Ghosn et al., 2020) ont été utilisées comme bioindicateurs quantitatifs de la pollution par les ETM les côtes libanaises.

En Italie, les gastéropodes *Monodonta turbinata*, *M. mutabilis* et *Patella caerulea*, jouent un rôle important comme bioindicateurs quantitatif de contamination métallique (Campanella et al., 2001; Cubadda et al., 2001; Storelli et Marcotrigiano, 2005), tandis que le bivalve *Mytilus galloprovincialis* est utilisé comme bioindicateur d'effets d'altération causés par les ETM (« sentinelles ») (Regoli et Principato, 1995; Lionetto et al., 2003; Frenzilli et al., 2004;). Barchiesi et al., (2020) ont utilisé une large gamme d'espèces de mollusques (vint-cinq espèces entre bivalves et gastéropodes) comme bioindicateur d'accumulation des ETM le long des côtes italiennes.

En Algérie, on utilise également *Perna perna*, *Donax trunculus* et les espèces de patelles *Patella caerulea* et *Patella rustica* comme bioindicateurs d'effet de la pollution chimique (Soltani et al., 2012)

I.4 Les bioindicateurs mollusques en Tunisie

De nombreuses études se sont intéressées à l'évaluation des risques environnementaux au niveau des côtes tunisiennes en vue d'une meilleure gestion des ressources biologiques marines et d'une biosurveillance des écosystèmes aquatiques en utilisant des indicateurs biologiques. En effet, certaines études ont porté sur les effets des métaux trace chez des bivalves sentinelles comestibles des côtes tunisiennes telles que les palourdes, *Cerastoderma glaucum* et *Ruditapes decussatus* (Hamza-Chaffai et al., 2003, 2000; Smaoui-Damak et al., 2004; Ladhar-Chaabouni et al., 2012; Mezghani-Chaari et al., 2015). D'autres ont porté sur la quantification des ETM en utilisant les gastéropodes *Gibbula ardens*, *Hexaplex trunculus* et *Patella caerulea*, et les bivalves, *Pinctada radiata* et *Pinna nobilis* (Chouba et al., 2008; Belkhodja et al., 2012; Rabaoui et al., 2013) comme bioindicateurs quantitatifs de l'accumulation des métaux afin d'évaluer le degré de contamination par les métaux trace le long des côtes tunisiennes.

En 2018, El Ayari et al. se sont intéressés quant-à eux à l'incidence du phénomène d'*Imposex* (effet induit par une pollution au TBT) chez un gastéropode *Stramonita haemastoma* au niveau de la côte de Bizerte en Tunisie.

I.5 Intérêt écotoxicologique de *Patella caerulea*

L'utilisation des patelles dans les programmes de biosurveillance est notamment motivée par la bonne connaissance sur leur biologie (Orton et al., 1956; Jenkins et al., 2001; Coleman et al., 2006; Le Roux, 2008; Fernández et al., 2016; Bouzaza, 2018; Pérez et al., 2019), leur large distribution (Poppe et Goto, 1991; Ridgway et al., 1998; Riera et al., 2003; Martins et al., 2008), leur abondance et leur mode de vie sédentaire (Fretter et Graham, 1972). Bien qu'ils ne soient pas encore utilisés comme taxon principal dans un programme de *biomonitoring* environnemental régional ou international, il existe un certain nombre d'études scientifiques qui ont testé des *Patella caerulea* pour l'étude des effets des HAP (Bonacci et al., 2007), des PCB (Yawetz et al., 1992) et des xénoestrogènes (De Lisa et al., 2013) et pour la quantification et l'évaluation de la présence des ETM (Campanella et al., 2001; Cubadda et al., 2001; Nakhlé, 2003; Storelli et Marcotrigiano, 2005; Belkhodja et al., 2012; Rabaoui et al., 2013;).

Par ailleurs, il est étonnant que cette espèce n'a pas encore fait l'objet d'une étude portant sur les effets écotoxicologique des métaux.

En Tunisie, pays qui dispose d'une ressource importante en mollusques, peu d'études se sont intéressées aux communautés des gastéropodes comme indicateurs biologiques. Parmi ces gastéropodes, nous trouvons, toutefois, *Patella caerulea*, espèce endémique de la Méditerranée, très répandue sur les côtes rocheuses tunisienne et surtout connue pour sa forte résistance à la pollution (Nakhlé, 2003). Plusieurs auteurs la recommandent comme étant un bon bioindicateur quantitatif dans des milieux pollués (Hamed et Emara, 2006; Nakhlé, 2003; Rabaoui et al., 2013). Les deux seules études qui ont porté sur l'usage de *Patella caerulea* en Tunisie sont celles de Belkhodja et al. (2012) et Rabaoui et al. (2013) où des dosages de teneurs des métaux ont été effectués mais sans étudier les réponses de biomarqueurs.

Pour compléter ce manque d'information, l'objectif de ce chapitre a donc été de rechercher des relations entre la biodisponibilité environnementale des métaux (bioaccumulation mesurée) et l'induction d'effets toxicologiques à l'aide d'une approche multi-marqueur basée sur des mesures de l'homéostasie Redox (CAT, SOD, GPX et MDA). C'est-à-dire, de vérifier le rôle de cette espèce comme bioindicateur quantitatif d'accumulation des métaux mais aussi d'évaluer son potentiel bioindicateur d'effet « sentinelles », attestant des effets écotoxicologiques des métaux.

Ce travail, avec une partie portant sur la variabilité génétique de P. caerulea, a fait l'objet d'une communication orale au sein du troisième congrès méditerranéen en bioanalyses (Décembre 2019) et d'une publication présentée en Annexes : Mariem Zaidi, Khaled Athmouni, Isabelle Metais, Habib Ayadi, Vincent Leignel « The Mediterranean limpet Patella caerulea (Gastropoda, Mollusca) to assess marine ecotoxicological risk : a case study of Tunisian coasts contaminated by metals » Environmental Science and Pollution Research (IF=4.223).

II. Matériel et Méthodes

II.1 Les sites de prélèvement

Quatre sites de prélèvement répartis sur les côtes tunisiennes ont été choisis selon leur localisation géographique et leur proximité ou non avec des zones d'activités anthropiques pour inclure différents niveaux de contamination métallique. Ils étaient sélectionnés suite à des enquêtes prospectives sur le terrain et des consultations bibliographiques et après vérification que l'espèce étudiée était présente et suffisamment abondante pour être échantillonnée (Palladino et al., 2021). De plus, les sites choisis représentent des zones ayant une importance écologique et socio-économique avec divers degrés d'exposition aux contaminants contenus dans les rejets des régions agricoles, industrielles ou urbaines (Amari, 1984; Ben charrada,

1997; INS, 2013). Pour chaque site, les coordonnées géographiques ont été déterminées avec un GPS GARMIN *eTrex*® 30. Elles sont fournies en annexes.

Le choix s'est porté sur les sites suivants (figure 38), du Nord au Sud :

- Un site appartenant au golfe de Tunis : le site du Cap Bon (CB) localisé au niveau du petit port de Sidi Rais, situé à environ 10 km de la ville de Soliman.

- Un site appartenant au Sahel Tunisien : le site de la Chebba (C) ou plus exactement la plage Casino.

- Deux sites appartenant au golfe de Gabès :

1/ Le site des îles Kerkennah (K) située au niveau de la zone Cercina (la partie de la plage qui contourne l'hôtel Cercina).

2/ Le site de Gabès (G) située au niveau du port de pêche de Gabès.

La stratégie dans le choix des sites été basée sur la supposition de la présence d'un gradient de pollution allant de la Chebba bénéficiant des vents chassant la pollution vers le large (Amari, 1984) vers les îles Kerkennah et Gabès. La station du Cap Bon a initialement été choisie comme station de référence en raison du présumé niveau de contamination faible (Ben charrada, 1997). On verra que la situation s'est avérée plus complexe.

II.1.1 Le site du Cap Bon, Sidi Rais (CB)

II.1.1.1 Situation géographique et caractéristiques physiques

Le golfe de Tunis est situé au Nord-Est de la Tunisie entre 36°42' et 37°20' de latitude Nord et entre 10°11' et 11°5' de longitude Est, il s'étend sur une surface totale approximativement de 1500 Km² et présente une côte d'environ 160 Km de longueur (Ben charrada, 1997). Il s'étend sur près de 70 Km d'Est en Ouest ; il est limité à l'Est par le Cap Bon et à l'Ouest par Sidi Ali Elmeki (Bizerte). Il occupe une position privilégiée entre le bassin occidental et oriental de la Méditerranée et se présente comme une grande baie ouverte vers le Nord de la Méditerranée. Le site du Cap Bon (figure 39) est précisément situé au Sud-Est du golfe de Tunis, à 45 km de la capitale, dans la région qui fait partie de la petite baie de Tunis. Il est délimité par Soliman au Sud, Korbous au Nord et la Mer Méditerranée à l'Ouest. C'est un petit abri de pêche situé à environ 10 km de la ville de Soliman.

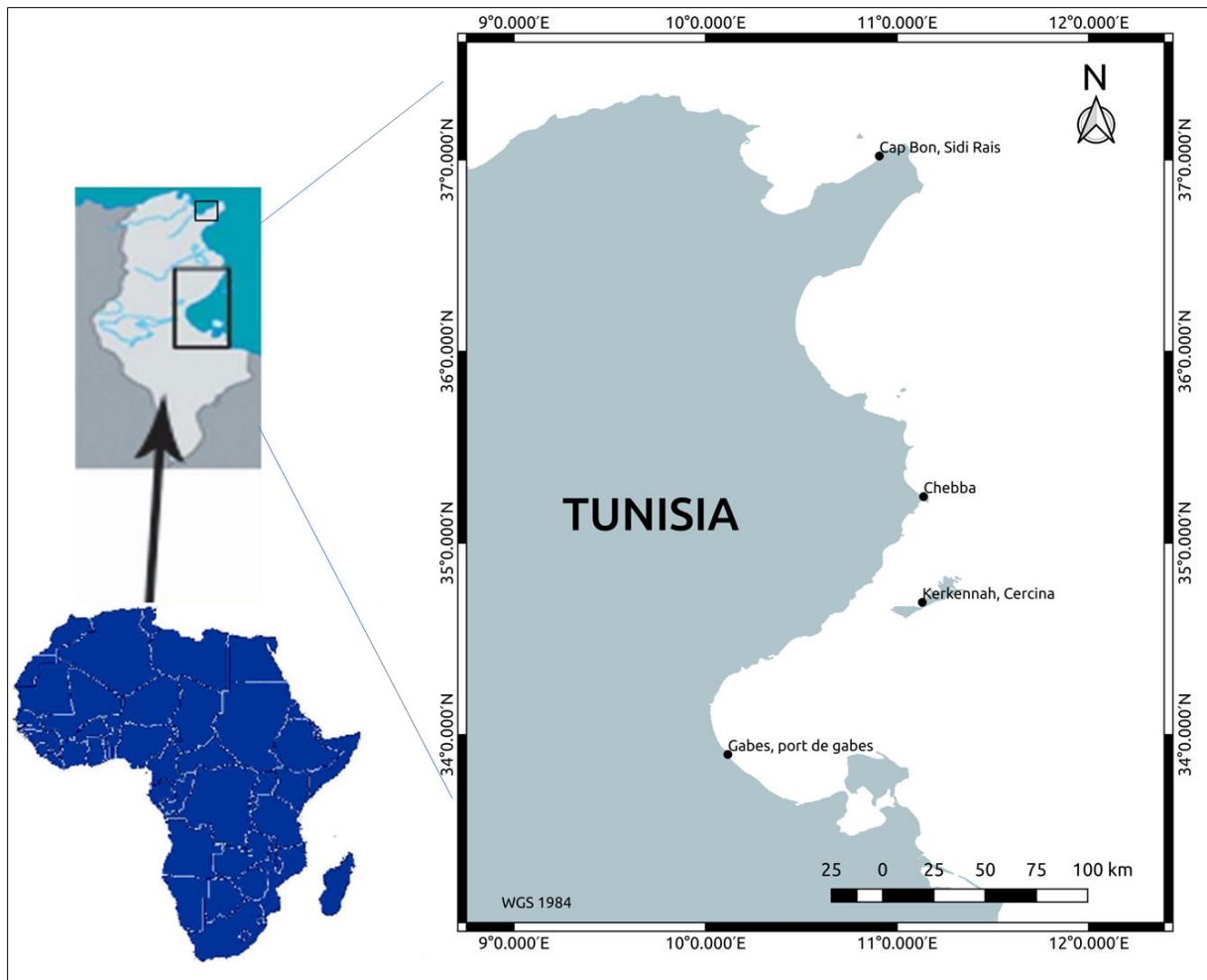


Figure 38: Position géographique des zones d'étude, en utilisant le Système d'Information Géographique QGIS Version 3.0.2.



Figure 39: Le site du Cap Bon (CB)

II.1.1.2 Sources de pollutions dans le site du Cap Bon

Selon Chouba (2009), la pollution organique et le niveau d'eutrophisation dans le golfe de Tunis peuvent être relativement élevés au niveau des embouchures des oueds. La zone de Sidi Rais, notre site du CB, située au Sud-Est du golfe de Tunis, semble être touchée par une faible pollution provenant des faibles activités portuaires, des rejets d'eaux domestiques locales dus aux riverains et à l'affluence des baigneurs en période estivale et des libérations des effluents purifiés de trois stations d'épuration à travers l'oued Soltane ou El Bey débouchant à l'entrée de Soliman (Sellem, 1999).

Une étude réalisée par Ben charrada, (1997) sur le golfe de Tunis a permis de distinguer, suivant le degré de pollution de l'eau, quatre zones différentes (tableau 14). Selon cette dernière répartition, la station CB serait effectivement située dans une zone non polluée.

Tableau 14: Répartition spatiale de la qualité des eaux côtières du golfe de Tunis

(D'après Ben charrada (1997))

Degré de pollution	Zones et limites	Sources de pollution	Transparence des eaux
Relativement polluée	Frange littorale Sud-Ouest allant de Cap Carthage à Soliman	Urbaine, lagunaire et thermique	Très faible
Peu polluée	Frange littorale Nord-Ouest de Raoued à Cap Carthage	Urbaine	Relativement faible
Très peu polluée	Frange littorale allant de Soliman à Sidi Rais		Transparente
Non polluée	Frange formée par les côtes allant de Sidi Rais à Ras El Fartas		Bonne transparence

II.1.2 Le site de la Chebba (C)

II.1.2.1 Situation géographique et caractéristiques physiques

La zone d'étude est située sur le littoral oriental de la Tunisie centrale. La Chebba est une ville côtière du Sahel tunisien appartenant au gouvernorat de Mahdia, située à une soixantaine de kilomètres au Nord de Sfax et une trentaine de kilomètres au Sud de Mahdia. Il s'agit d'une plaine aux faibles reliefs (Oueslati, 1993). Les prélèvements ont été effectués sur une zone rocheuse du littoral de la Chebba dite « Le Casino ». Cette zone est soumise à l'effet des vents orientaux (vents dominants) soufflant du Nord-Est et de l'Est communément appelés « Chergui » apportant les pluies pour le sahel (plus importants en automne).

II.1.2.2 Les sources de pollution

Dans le gouvernorat de Mahdia, la majorité des décharges publiques sont installées dans des sites sensibles. Des sebkhas et oueds sont devenus des dépotoirs d'ordures ménagères, d'eaux usées et de margines. Environ 35% de la population du gouvernorat Mahdia n'est pas pris en charge par l'Office National d'Assainissement Sanitaire (ONAS) (Districts de l'ONAS, 2007). Les eaux usées urbaines non traitées sont rejetées soit dans des puits perdus ou dans les réseaux d'oueds qui déversent leur contenu dans la mer. D'autres décharges sont installées dans des carrières abandonnées telles que la décharge communale de Hbira et les carrières abandonnées du cordon dunaire situé à l'Ouest de la ville de Mahdia (Poullaouec-Gonidec, 2018). De plus, les aménagements portuaires constitués principalement par quatre ports (par ordre d'importance, Mahdia, Chebba, Selektta et Melloulech) et quelques abris, et les installations touristiques concentrées sur la côte Nord de Mahdia sous forme d'une bande d'hôtels de front de mer exercent une pression anthropique accrue sur cette région qui occupe une position stratégique dans le secteur de la pêche en Tunisie. En effet, le gouvernorat de Mahdia contribue à 14% de la production halieutique à l'échelle nationale. Il concentre près de 12% de la flottille tunisienne. Le nombre de bateaux de pêche est de 1482 et la production est de 8,83 tonnes/ bateau. Le secteur de la pêche crée 5534 d'emplois directs. La production de la pêche au gouvernorat est de 14972 tonnes en 2011 (C.R.D.A., 2011).

II.1.3 Le golfe de Gabès

II.1.3.1 Situation géographique et spécificités

Le golfe de Gabès ou « petite syrte » situé sur la façade Sud-Est de la Tunisie, s'étend du 35° parallèle Nord jusqu'à la frontière tuniso-libyenne (Figure 40). Il est bordé par trois gouvernorats côtiers : Sfax, Gabès et Médenine, incluant les îles Kerkennah, Kneiss et Djerba et les lagunes de Boughrara et d'El Biben. Il présente des sebkhas (zones humides hébergeant de nombreux oiseaux migrateurs) et l'oasis littoral de Gabès (Hattour and Ben Mustapha, 2013). Il occupe le tiers des côtes du pays et représente un point central du trafic maritime avec la plus importante infrastructure portuaire de Tunisie (Dammak-Zouari et al., 2009). Trois types de courants règnent dans la région du golfe de Gabès : ceux des marées, les courants océaniques et les courants renforcés par la houle (Serbaji, 2000) avec une marée de type semi-diurne. La situation du golfe de Gabès est alarmante à plus d'un titre, et sa dégradation n'est plus à démontrer. Le problème de la surpêche et de la pollution industrielle, depuis les années 70, liée à l'implantation d'industries de transformation de phosphate, ont suscité des vives réflexions de la part des gestionnaires de la pêche et de la communauté scientifique.



Figure 40 : Position géographique de la région du golfe de Gabès (Google Earth, Mars 2021)

II.1.3.2 Le site de Kerkennah (K)

L'archipel de Kerkennah est situé à 20 km au large de Sfax dans le golfe de Gabès, il est composé de deux îles principales : Gharbi et Chergui et de douze îlots comprenant Charmandia, Sefnou, Roummadia, Gremdi, Lazdad, Er Rakadia et les six îlots de Hadj Hmida. Il est orienté Sud-Ouest / Nord-Est et mesure près de 35 km de long pour 11 km de large pour une superficie de 160 km² et comprend 162 km de côte (Chatenoux et al., 2015). Notre site, Cercina, se situe sur l'île de Chergui dans le golfe de Sidi Fredj (figure 41).



Figure 41: Le site de Kerkennah (K)

II.1.3.3 Les sources de pollution

L'archipel connaît un important problème de gestion des pollutions. En effet, Il existe une usine de traitement des déchets à Kerkennah. Cependant, pour des questions de désaccords concernant la propriété foncière, cette dernière a été fermée sur la décision du tribunal en

attendant la résolution juridique du différend. Dans l'attente, les déchets sont centralisés à la sortie des villages (généralement dans les sebkhas) ou simplement jetés en dehors des propriétés (Chatenoux et al., 2015). L'équipe de COMETE Engineering a signalé en 2001 que l'exploitation pétrolière à proximité de sites touristiques renforce l'amplitude des problèmes de pollution maritime. Par ailleurs, les eaux usées ne sont collectées dans l'île qu'à raison de 20 %. De plus, les eaux traitées sont rejetées à trop grande proximité du rivage. Des concessions d'extraction de gaz et de pétrole à proximité des côtes de l'archipel ont également été octroyées depuis quelques années (Chatenoux et al., 2015; Poullaouec-Gonidec, 2018).

II.1.3.4 Le site de Gabès (G)

Le gouvernorat de Gabès est limité à l'Est par la Méditerranée (une côte de 80 km), à l'Ouest par le gouvernorat de Kébili, au Nord-Est par le gouvernorat de Sfax, au Nord-Ouest par le gouvernorat de Gafsa et au Sud par le gouvernorat de Médenine. Sa superficie est égale à 7,175 km², soit 4,4% de la superficie du pays. L'intensité de l'activité de la pêche a eu des conséquences négatives sur l'écosystème (diminution de la productivité, changements dans la composition spécifique des assemblages, recul du couvert végétal, etc...). Les principales activités économiques à Gabès sont l'agriculture, l'industrie, le tourisme, les commerces terrestres et maritime et la pêche (notamment artisanale). Notre site d'échantillonnage est situé au niveau du port de pêche à 3 km au Nord de la ville (figure 42).



Figure 42: Le site de Gabès (G)

II.1.3.5 Les sources de pollution

Le groupe chimique de Tunisie (GCT), une usine de production de phosphate à grande échelle, basé à Gabès (et auparavant à Sfax), rejetant environ 12 000 tonnes de phosphogypse par jour sous forme de boues dans l'eau de mer, constitue une menace importante pour

l'équilibre de l'écosystème marin de la ville de Gabès allant jusqu'à la perte totale de la zone de pêche et des plages de baignade. L'impact est dû à l'acidité et aux concentrations élevées des composés fluorés, du phosphore, du cadmium et d'autres éléments traces. Malheureusement, les changements climatiques accentuent les effets néfastes de ces contaminants (Drira, 2009). Et, au-delà, depuis 1970, toutes les baies entourant le golfe de Gabès ont été de plus en plus touchées par l'industrialisation en expansion (Bejaoui et al., 2004; Drira, 2018; Ghannem et al., 2014). De plus, cette industrie rejette dans l'atmosphère de l'ammoniac, du dioxyde de soufre et de l'acide sulfurique, et ce depuis plus de quatre décennies. Un exemple des dégâts causé par cette pollution chimique est le Chott Essalam où les vagues d'un marron foncé s'échouent sur le sable radioactif constitué en partie de résidus de phosphogypse. Des tonnes de phosphogypse s'entassent également dans le golf réduisant considérablement le développement de la vie marine. Toutefois, les activités industrielle et portuaire de la ville lui confèrent une importance économique non négligeable. Le port de commerce de Gabès, se caractérise par une activité relative au secteur industriel, surtout le transit des produits chimiques pour le compte des usines avoisinantes installées à Gabès. Les produits concernés principalement le soufre et l'ammoniac à l'import et l'acide phosphorique et les engrais phosphatés à l'export. D'ailleurs selon Ouerfelli (2019), commandant du port du commerce, le chiffre d'affaires du port a atteint, durant l'année 2018, 3,2 millions de tonnes, réparties entre 60% d'importations et 40% d'exportations destinés à de nombreux pays d'Asie orientale, notamment la Chine, Singapour, Turquie, ainsi que d'Afrique de l'Ouest et autres.

II.2 Etude sur terrain

II.2.1 Stratégie de prélèvement

Les prélèvements des individus au niveau des quatre stations (C, CB, G et K) ont été effectués à marée basse, à la main en utilisant un couteau en acier inoxydable sur une dizaine de mètres de linéaire de côte et entre 0 et 1 m de profondeur. Les individus récoltés sont ensuite placés dans une boîte en polystyrène avec de la glace ou dans des bocaux mis dans une glacière (figure 43). Une trentaine d'échantillons ont été prélevés par site. Une fois arrivés au laboratoire, les échantillons sont triés, rincés dans de l'eau de mer filtrée (pour enlever les résidus de sédiment présents dans le manteau et la masse viscérale), pesés et conservés au congélateur à -20°C dans des boîtes étiquetées en attendant d'être analysés au laboratoire de Biodiversité et Ecosystèmes Aquatiques (BEA) à l'université de Sfax en Tunisie.



Figure 43: Prélèvement des échantillons

Des prélèvements d'eau de surface ont également été effectués dans chaque station. Des échantillons d'eau de surface ont été prélevés en triplicata dans des flacons d'un litre, à 1m de profondeur selon les directrices pour les exigences d'échantillonnage (HELCOM, 2019). Une fois au laboratoire, les échantillons d'eau de surface sont filtrés à l'aide d'une fine membrane (0,45 μm), acidifiés puis stockés à 4°C en attendant les dosages des métaux (Kremling, 1976). Les niveaux de détection des métaux seront indicatifs de l'activité anthropique dans chaque site étudié.

II.2.2 Mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau

L'ensemble des mesures ponctuelles des paramètres physico-chimiques (Température, pH, Salinité) a été effectué au niveau des quatre stations, à 50 cm de profondeur à l'aide d'un multiparamètres manuel du type WTW préalablement étalonné. Nous avons essayé, dans la mesure du possible, de faire nos mesures dans les différentes stations à la même heure de la journée pour éliminer les variations diurnes (UNEP/MAP/MED, 2020; UNESCO, 1994).

II.3 Dosage des éléments traces par absorption atomique

II.3.1 Préparation du matériel biologique

Avant les analyses, des échantillons ont été classés, pesés et mesurés afin de s'assurer d'une certaine homogénéité des lots en termes de tailles d'individus. Les individus ont été décongelés et soigneusement débarrassés de leur coquille calcaire sur une plaque de glace pour l'intégrité des protéines (+4°C) à l'aide d'une sonde cannelée et d'un scalpel stérile préalablement rincés avec de l'eau bidistillée. La partie molle de six individus de chaque station a été divisée en deux aliquotes de poids respectivement équivalent (1,0 g), un pour servir aux dosages des ETM et l'autre pour le dosage des biomarqueurs de stress oxydatif. La taille des individus ne permettait pas un dosage dans les différents organes c'est pourquoi toute la masse

viscérale a été utilisée pour les dosages (Cravo et al., 2004; Rabaoui et al., 2013). Les aliquotes destinés aux dosages enzymatiques des réponses antioxydantes ont été étiquetés et conservés à -20°C jusqu'au moment d'analyse.

II.3.2 Dosage

Les mesures de métaux trace ont été effectuées au laboratoire de Chimie à la Faculté des Sciences de l'Université de Sfax en Tunisie. Six échantillons par site de prélèvement ont été analysés (figure 44). Les échantillons pesés précédemment ont été séchés à l'étuve pendant une nuit à 60 °C dans des creusets en porcelaine pour retirer l'humidité et ensuite ont été pesés. Les échantillons séchés ont été placés dans un four à moufle à 500 °C pendant 6 heures pour induire la calcination (Fonollosa et al., 2017; Primost et al., 2017). Les cendres obtenues ont été filtrées à l'aide d'une solution d'acide nitrique HNO₃(1 %) ajusté à 30 ml avec de l'eau déminéralisée. Les concentrations des éléments traces à savoir le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le fer (Fe), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le zinc (Zn) de ces échantillons ont été déterminés par un spectrophotomètre d'absorption atomique de flamme (AAS) de type Perkin Elmer, A-analyste 200 copyright @ 2007 suivant la méthode de l' UNEP/IAE/FAO, 1984. Les échantillons d'eau de mer ont été filtrés sous vide à l'aide d'un filtre de 0,2 µm de porosité puis le filtrat subit une attaque acide. Le blanc utilisé pour analyser les différents éléments traces est composé de 100 ml d'eau et 2 ou 3 gouttes de HCl. Certaines caractéristiques (la longueur d'onde d'absorption (nm), la concentration de l'étalon, la limite de détection, la dose maximale admissible (DMA) (d'après IAEA, 2003)) ainsi que les limites de sécurité pour l'eau propre à chaque élément sont résumées dans un tableau en en annexes.



Figure 44 : Dosage des métaux (Préparation du matériel biologique (A : Partie molle séparée de la coquille, B : Séchage à l'étuve ; C : Calcination à 500°C ; D : Attaque acide ; E : Filtration ; F : Solutions filtrées à doser ; G : Dosage des métaux trace par absorption atomique)

II.3.3 Assurance qualité des dosages des métaux

Le contrôle de la qualité est appliqué à toutes les analyses des métaux trace (Cd, Cu, Fe, Ni, Pb et Zn). Pour chaque métal analysé dans l'eau de mer et dans le tissu des patelles, un blanc standard et un matériel de référence certifié de concentrations connues sont dosés en parallèle. Le matériel de référence employé est le TORT-1 (hépatopancréas de homard), il est produit par le Conseil National de Recherches du Canada (CNRC). Ce matériel est inclus dans les séries analytiques pour valider, contrôler et évaluer la performance de leurs procédures d'analyses chimiques et biologiques (Chouba, 2016). Les échantillons de référence sont traités

dans les mêmes conditions analytiques que les échantillons bruts. Tous les échantillons ont été analysés en triplicata et la concentration moyenne en métal a été calculé. Le blanc ne contenait aucune concentration détectable des métaux étudiés. Les résultats des valeurs trouvées sont très proches des valeurs certifiées vu que les taux de recouvrement ont été entre 90 et 100 %, indiquant l'absence de biais analytique et la bonne reproductibilité de la méthode. Les résultats des valeurs certifiées sont consignés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Analyse du matériel de référence TORT-1 : Valeurs certifiées et valeurs trouvées (moyenne \pm SD) ($\mu\text{g/g PS}$) (n=6)

	Valeurs certifiées ($\mu\text{g/g PS}$) \pm SD	Valeurs trouvées	Taux de recouvrement (%)
Cu	439 \pm 22	439.7 \pm 70	100.16 \pm 0.31
Cd	26.3 \pm 2.10	26.4 \pm 0.45	100.38 \pm 0.21
Fe	186 \pm 11	186.2 \pm 4.25	100.11 \pm 0.38
Ni	2.3 \pm 0.30	2.27 \pm 0.20	98.70 \pm 0.66
Pb	10.4 \pm 20	9.9 \pm 1.00	95.19 \pm 0.50
Zn	177 \pm 10	178 \pm 6.02	100.56 \pm 0.60

II.3.4 Facteur de bioaccumulation (BAF)

Le facteur de bioaccumulation (BAF) a été utilisé pour évaluer la capacité des patelles à tolérer et accumuler des métaux biodisponibles. Il est calculé comme le ratio entre la concentration moyenne interne et celle dans l'eau pour le même métal par individu (Zaidi et al., 2022).

$$BAF = \frac{C_i}{C_e}; \text{ où } C_i : \text{ La concentration moyenne interne du métal ; } C_e = \text{ La concentration moyenne dans l'eau.}$$

II.3.5 Evaluation des risques

Parmi les indices d'évaluation de la qualité de l'eau de mer, l'indice de pollution des métaux (MPI) représente l'influence globale des métaux sur la qualité de l'eau (Tamasi et Cini, 2004). Il représente la somme du rapport entre la concentration des métaux analysés et leurs concentrations maximales admissibles (MAC) utilisées par USEPA (2020) pour Cd, Cu, Pb, Ni et Zn et par Spanos (2014) pour Fe.

$$MPI = \sum_{i=1}^n \frac{C_i}{(MAC)_i}; \text{ où } C_i : \text{ la concentration du « ième » métal ; } (MAC)_i = \text{ Concentration maximale admissible.}$$

Selon la valeur du MPI, la qualité de l'eau est classée en six catégories (tableau 16).

Tableau 16: Classification de la qualité de l'eau selon la valeur de MPI (Metal Pollution Index)
(Achary et al., 2016; Drira, 2018)

Classe	(I) Très médiocre	(II) Pauvre	(III) Légèrement affectée	(IV) Modérément affectée	(V) Fortement affectée	(VI) Gravement affectée
MPI	< 0.3	0.3 - 1.0	1.2 - 2.0	2.0 - 4.0	4.0 – 6.0	> 6.0

II.4 Techniques du dosage de certains biomarqueurs du stress oxydatif

II.4.1 Préparation du cytosol

Le dosage des protéines a été réalisé au laboratoire de Biodiversité et Systèmes Aquatiques à la Faculté des Sciences de Sfax. L'extraction du cytosol a été faite à froid. La portion de 1 g étiquetée restante de chaque échantillon utilisé pour l'évaluation des métaux (six échantillons analysés par station) a été décongelée sur glace puis broyée à froid à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-turax (figure 45. A) dans 2 ml de solution saline tamponnée tris (TBS) (pH = 7,4). Les homogénats ont été centrifugés deux fois à $10\ 000 \times g$ à 4 °C pendant 20 min (figure 45. B), et les surnageants collectés (cytosol) ont été aliquotés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml et rapidement stockés à -20 °C pour les dosages à court terme des protéines totales et des activités enzymatiques. Les réactifs qui ont servis aux différents dosages viennent de l'entreprise sigma Aldrich.

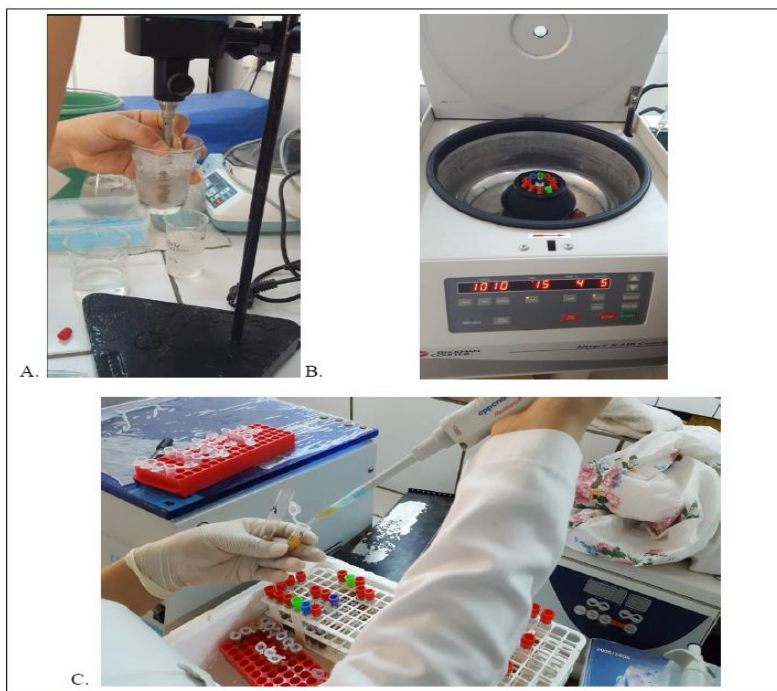


Figure 45: Préparation du cytosol (A : Homogénéisation ; B : Centrifugation ; C : Récupération du surnageant)

II.4.2 Dosage des protéines totales

Les protéines ont été quantifiées mg/ml selon la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951) à l'aide d'une courbe d'étalonnage de l'albumine sérique bovine BSA ($R^2 = 1$). L'absorbance a été mesurée à 490 nm (protocole détaillé en annexes).

II.4.3 Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

La méthode spectrophotométrique utilisée permet une mesure de l'activité de la SOD d'une manière indirecte, en utilisant le complexe riboflavine/méthionine producteur des anions superoxydes et le Nitro Blue Tetrazolium (NBT). L'oxydation du NBT par l'anion superoxyde O_2^- est mesurée à 560 nm. La SOD convertit l' O_2^- et diminue ainsi sa concentration limitant de ce fait le taux d'oxydation de la NBT. Dans un milieu aérobique, le mélange riboflavine, méthionine et NBT donne une révélation bleuâtre. Les résultats obtenus sont exprimés en unité de SOD/mg de protéines (Beauchamp and Fridovich, 1971) (protocole détaillé en annexes).

II.4.4 Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

L'activité catalase (CAT) a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible (UV T60) par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'Hydrogène (H_2O_2) (Aebi 1984). La réaction a lieu dans du tampon phosphate (100 mM) à pH 7,0 à 25 °C avec H_2O_2 (500 mM) avec des protéines totales (1–1,5 mg de protéines/ml). L'activité CAT est la différence d'absorbance par unité de temps. Les résultats ont été exprimés en μ moles de H_2O_2 /min/mg de protéines selon le protocole proposé par Aebi (1984) (protocole détaillé en annexes).

II.4.5 Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité GPx totale a été mesurée à 412 nm comme indiqué par Flohé et Günzler, (1984). L'activité de cette enzyme est déterminée *via* la formation du glutathion oxydé (GSSG) à partir du glutathion réduit (GSH). Un volume de surnageant protéique (1v) a été mélangé avec deux volumes (2v) du GSH (1 mM). La réaction est initiée par l'ajout du H_2O_2 et est bloquée au bout de 10 min par l'addition d'acide trichloroacétique (TCA) à 1%. Après centrifugation, du dissodium hydrogène phosphate Na_2HPO_4 (320 mM) et le réactif d'Ellman (acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)) (DNTB) (1 mM) ont été ajoutés au surnageant. L'activité GPx a été exprimée en μ moles de GSH oxydé/min/mg de protéine.

II.4.6 Dosage du taux de la peroxydation lipidique

Le dialdéhyde malonique ou MDA est le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique, en raison de sa simplicité et sensibilité de dosage. Le MDA libre n'est pas ou peu mesurable car il disparaît rapidement par formation d'adduits. La méthode de mesure repose donc sur une libération en milieu acide du MDA fixé. Le taux de MDA dans les patelles issues des différents sites d'échantillonnage a été mesuré en utilisant le protocole défini par Niehaus and Samuelsson, (1968). Brièvement, 0,5 ml de surnageant a été mélangé avec TBS et TCA (20%) - BHT (0,01%) et incubé à 100 °C pendant 30 min. Les échantillons ont ensuite été vortexés, refroidis, et enfin centrifugés à 10 000 g pendant 10 min. Ensuite, après traitement acide à chaud, les aldéhydes réagissent avec le TBA (acide thiobarbiturique) pour former un produit de condensation chromogénique de coloration rose consistant en 2 molécules de TBA est une molécule de MDA. Enfin, l'absorbance du complexe TBA-MDA a été mesurée à 532 nm. La concentration de MDA a été calculée à l'aide de son coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 155 \text{ mM/cm}$). Le MDA a été exprimé en nmoles/mg de protéines.

II.5 Analyse des données et outils statistiques utilisés

II.5.1 Système d'Information Géographique QGIS

Les données géographiques (coordonnées GPS) ont été traitées en utilisant le Système d'Information Géographique QGIS Version 3.0.2 pour la présentation de la carte des sites de prélèvement.

II.5.2 Logiciel R pour le traitement des résultats

L'analyse des données relatives aux concentrations internes et dans l'eau ainsi qu'aux réponses antioxydantes a été réalisée avec le programme R studio (version 4.0.3). Cela nous a permis de mieux visualiser nos résultats grâce à l'extension ggplot 2 du logiciel R.

II.5.3 Test de Student

Pour évaluer les différences entre la taille des différents échantillons avec un niveau de confiance de 95%, le test t de Student non apparié a été effectué. Nous considérons qu'une valeur de t correspondant à un seuil de $p < 0,05$ traduit une différence significative entre les moyennes (Margalef, 1978). Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes accompagnées par leur déviation standard.

II.5.4 Test d'analyse de variance ANOVA (Analysis of Variance)

La normalité et l'homogénéité de la variance ont été vérifiées avec le test de Shapiro-Wilk et le test de Bartlett, respectivement. L'ANOVA est une technique statistique permettant de comparer les moyennes de deux paramètres ou plus. Les comparaisons statistiques des degrés de contamination des sites étudiés et des concentrations des métaux ainsi que les réponses antioxydantes ont été menées par l'analyse de variance ANOVA suivie d'un test post hoc (Tukey HSD). La différence est considérée significative à un seuil de probabilité (P) inférieur à 5% ($p < 0,05$). L'ANOVA a été effectuée en utilisant le logiciel XLSTAT version 2021.1.1.

II.5.5 Analyse multifactorielle en Composantes Principales (ACP)

L'analyse en composantes principales s'applique à des matrices de corrélation. Le but final est d'arriver, par l'interprétation de ces matrices, à déterminer, avec la perte minimale d'information, un petit nombre d'axes appelés aussi « facteurs explicatifs du maximum de variance » et dont on cherche la signification écologique (Margalef, 1978).

L'analyse en composantes principales détermine donc un système d'axes de référence hiérarchisés en diminuant le nombre de dimension de l'espace dans lequel on projette les points d'observation. Cette analyse permet de construire des modèles synthétiques figurant les relations entre les différentes variables considérées. Afin de tester une première approche synthétique de nos résultats au niveau de nos quatre sites (observations) d'étude et de tester les hypothèses émises, nous avons choisi d'appliquer une analyse en composantes principales (ACP) qui a été réalisée avec le logiciel XLSTAT 2022.

Sélection des variables pour l'ACP

Afin de ne pas introduire de biais trop important dans l'estimation des variances associées à chaque descripteur, nous avons retenu les descripteurs suivants. La matrice est formée à partir des descripteurs physico-chimiques (pH, salinité, température), les concentrations en métaux (Cd, Cu, Fe, Ni, Pb et Zn) dans l'eau (E) et dans les tissus des patelles (I), les réponses du système anti-oxydant (SOD, CAT, GP_X, MDA) et le facteur de bioaccumulation (BAF).

Ce type d'analyse statistique entre les descripteurs chimiques, physiques et biologiques est adéquat lorsqu'une relation monotone de type linéaire est susceptible d'exister entre des variables. L'ACP aboutit à l'extraction d'autant de vecteurs propres que de variables introduites, il est nécessaire de définir combien d'axes sont susceptibles de recevoir une interprétation écologique. Dans le cas de notre étude on va présenter uniquement, les deux axes

(F1 et F2) qui seront à considérer comme significatifs (Frontier, 1976). Pour cela, Frontier (1976), propose de comparer le pourcentage de variance totale expliqué par un axe ou facteur ou pourcentage maximal qui serait obtenu si cette variance totale était représentée au hasard entre les autres facteurs. Il en résulte qu'une composante sera significative si elle explique davantage de variance que ne le prévoit le modèle aléatoire de Mac Arthur appelé modèle du "bâton brisé" (Frontier, 1976).

II.5.6 Test de corrélation de Pearson

Le test de corrélation de Pearson est un outil qui permet de mettre en évidence les corrélations deux à deux entre les différents paramètres abiotiques ou biotiques mesurés en utilisant une loi de Pearson. Ce type de test permet de mettre en relief les relations potentielles entre les différentes variables à tester avec le coefficient de corrélation Pearson. Les corrélations de Pearson ont été réalisées en utilisant le logiciel XLSTAT 2022 pour déterminer les corrélations potentielles entre les différents paramètres bio- physico-chimiques.

II.5.7 Analyse par Classification Hiérarchique (ACH)

A la suite de l'analyse multifactorielle et dans le but de visualiser les degrés de similarité entre les différentes stations prospectées, une analyse par classification hiérarchique est utilisée. En effet, cette analyse est basée sur un test de similarité ou de dissimilarité (Govaert et Nadif, 2006). Cette méthode est basée sur une matrice de distances euclidiennes entre pixel pris deux à deux. L'objectif est de construire un dendrogramme (c'est un arbre de classification) qui a pour but de regrouper les pixels et de fixer le nombre de classes (Govaert et Nadif, 2006). A la fin, on trouve donc une partition intermédiaire où les classes ont une signification écologique thématique. Dans ce travail, l'ensemble des données est soumis à une analyse hiérarchique en dendrogramme basée sur le degré de similarité (Daget, 1978).

III. Résultats et discussion

III.1 Caractérisation physico-chimique des sites d'étude

III.1.1 Physico-chimie des eaux de surface

Les prélèvements des paramètres physico-chimiques ont été effectués au même moment que les prélèvements d'échantillons de patelles pendant la période du printemps en 2017. Les valeurs moyennes de température (T), pH et salinité (S) mesurées au niveau des sites de prélèvement sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 17: Paramètres physicochimiques des différents sites d'étude ($n=3$)

	C	CB	G	K
Température (°C)	15,20 ± 0,01	15,00 ± 0,01	15,00 ± 0,01	24,00 ± 0,01
Ph	8,10 ± 0,01	8,40 ± 0,01	7,68 ± 0,01	7,90 ± 0,01
Salinité (psu)	37,60 ± 0,01	39,00 ± 0,01	42,00 ± 0,01	40,00 ± 0,01

Les valeurs de Température enregistrées au niveau des différents sites ont oscillé entre 15 °C et 24 °C avec un maximum noté au niveau du site K. La valeur du pH d'une eau de mer normale est de l'ordre de 8,1 et 8,2. On a enregistré au niveau du site C une valeur de pH ordinaire de 8,1 tandis qu'au niveau des sites G et K cette valeur était de $7,68 \pm 0,01$ et $7,90 \pm 0,01$; respectivement. Au niveau du site CB le pH est de $8,40 \pm 0,01$. La salinité a été la plus importante dans les sites G et K avec des valeurs moyennes de l'ordre de $42,00 \pm 0,01$ psu et $40,00 \pm 0,01$ psu, respectivement. Elle était la plus faible au niveau du site C ($37,60 \pm 0,01$ psu).

III.1.2 Discussion

L'évaluation de la qualité de l'écosystème marin peut être réalisée par l'étude de ses composantes abiotiques et biotiques (Douhri et Sayah, 2009). En fait, la température de l'eau, le pH et la salinité sont des composantes importantes descriptives de sa qualité. Tous les sites avaient une température aux alentours de 15 °C sauf une exception pour le site K qui est caractérisé par la température la plus élevée ($24,00 \pm 0,01$ °C). Nous avons obtenu des résultats proches de ceux trouvés par Belkhodja et al., (2012) pour les trois paramètres abiotiques mesurés dans le même site de référence CB (Sidi Rais au Cap Bon) et pendant la même saison du printemps ($T=14,00 \pm 0,01$ °C ; $pH= 8,40 \pm 0,01$; $S= 39,00 \pm 0,01$ psu). Au niveau de la station C, les résultats trouvés sont similaires aux conditions abiotiques moyennes de la zone durant la même saison enregistrées par la station météorologique du gouvernorat de Mahdia (données de 2011) et Mabrouk et al. (2012).

Nos résultats montrent une faible valeur de pH dans les échantillons d'eau collectés au niveau des sites appartenant au golfe de Gabès (G et K). Les valeurs étaient de l'ordre de $7,68 \pm 0,01$ et $7,90 \pm 0,01$ respectivement. Ce type de tendance de la valeur de pH a été signalé par Douhri et Sayah, (2009) dans les sites pollués de la Baie de Tanger au Maroc. Ali et Soltan, (1996) ont également noté une acidification du pH dans les échantillons d'eau prélevés au niveau des sites pollués du Nil en Egypte. La même tendance a également été révélée dans les travaux de Belkhodja et al. (2012) réalisés sur les côtes polluées de Bizerte au Nord de la

Tunisie. Les faibles valeurs de pH (< 8) mentionnées au niveau des sites pollués pourraient refléter l'influence des effluents industriels au niveau de ces zones.

Les mêmes auteurs (Ali et Soltan, 1996; Douhri et Sayah, 2009; Belkhodja et al., 2012) ont enregistré une élévation de la température au niveau des échantillons d'eau prélevés sur les sites pollués. Nos résultats concordent avec cette observation pour le site K. En effet, les températures des eaux de surface enregistrées au cours de l'échantillonnage varient peu ou pas ($15,00 \pm 0,01^\circ\text{C}$ au niveau des stations CB, C et G) avec une spécificité pour la station K où on a enregistré la température de l'eau la plus élevée soit $24 \pm 0,01^\circ\text{C}$. Ce sont des valeurs typiques d'un climat méditerranéen aride ou semi-aride similaires aux valeurs trouvées par Drira (2018) au niveau du golfe de Gabès. La température élevée du site K est également supérieure aux résultats de Brandhorst et Messaoud (1977) au golfe de Gabès qui décrivent des températures moyennes des eaux superficielles à Kerkennah de l'ordre $20,34^\circ\text{C}$. Cependant, Amari (1984) et Mastouri et al. (1996) ont signalé une valeur moyenne très proche de la nôtre enregistrée dans la même zone (K) et au cours de la même période de l'année, soit $24,5^\circ\text{C}$. Ces auteurs ont souligné que la situation thermique aux alentours de ces îles est marquée par l'arrivée de deux courants : l'un venant du Nord et amenant des eaux froides, l'autre provenant du Sud et apportant des eaux chaudes. Plus particulièrement, d'après Feki et al. (2016), Cercina (notre zone de prélèvement à Kerkennah) est influencée par une circulation d'eau régionale et est directement exposée à l'arrivée des eaux froides des canaux de Louza (au Nord de Sfax) et des eaux plus chaudes du chenal entre Sfax et Kerkennah. Enfin, la vulnérabilité de l'archipel de Kerkennah au réchauffement climatique a été constatée, par une augmentation de 3°C entre 1993 et 2009 (Jarraya et Hellal, 2014).

Les valeurs de salinité les plus élevées que nous ayons enregistrées au niveau des deux sites du golfe de Gabès G et K (respectivement, $42,00 \pm 0,01$ psu et $40,00 \pm 0,01$ psu) sont de loin supérieures à celles enregistrées par Amari (1984) à Kerkennah et qui tournent autour d'une valeur moyenne de $37,5$ psu. En fait, le golfe de Gabès bien qu'étant une mer ouverte, ressemble à un milieu fermé où les eaux, surtout en périodes calmes, deviennent presque immobiles. Les caractéristiques particulières de ce golfe s'observent notamment dans la faible profondeur où les températures et la salinité sont élevées, la luminosité forte et l'évaporation intense (Jarraya et Hellal, 2014). Ceci pourrait donc expliquer les fortes valeurs de salinité enregistrées au niveau de station G et K.

III.1.3 Conclusion

L'étude de la physico-chimie des eaux est une discipline très riche d'informations pour l'évaluation de l'état de santé des écosystèmes marins ou pour l'explication des perturbations environnementales liées à une contamination. Elle fait partie intégrante de la bioindication et vient compléter les méthodes qui reposent sur l'utilisation des indicateurs biologiques pour l'étude des altérations écosystémiques. En effet, la température de l'eau joue un rôle important dans la solubilité des sels et des gaz dont l'oxygène, nécessaire à l'équilibre de la vie aquatique et à l'activité métabolique des organismes marins. Il en est de même pour le potentiel d'hydrogène (pH) qui est en moyenne de 8,2 dans une eau marine et peut varier en fonction des conditions physiques et biologiques qui règnent dans l'écosystème marin. Des pH faibles (eaux acides) augmentent notamment le risque de présence de métaux sous une forme ionique plus toxique. A l'inverse, des pH élevés augmentent les concentrations d'ammoniac, toxique pour les organismes marins. La connaissance de la salinité d'une eau marine est également importante dans la mesure où chaque organisme aquatique a des exigences propres en ce qui concerne ce paramètre. Les espèces aquatiques ne supportent généralement pas des variations importantes en termes de salinité et de sels dissous qui peuvent être observées par exemple en cas de déversements d'eaux usées. Mais ces paramètres, pouvant varier naturellement entre différents habitats. Ils illustrent l'état du système à un instant « t » particulier sans pouvoir détecter les tendances ou les effets à long terme des perturbations dues aux activités anthropogéniques. Ainsi, de tels renseignements méritent d'être confirmés à travers la conduite d'une étude pluridisciplinaire approfondie par le biais de la bioindication et l'utilisation des biomarqueurs au sein des espèces cibles. Il faudrait également connaître les cycles de variation de ces paramètres pour pouvoir caractériser ces sites. Une étude étalée sur une plus longue période avec l'augmentation du nombre des stations d'échantillonnage serait également recommandée. Il est ainsi important de signaler que les résultats présentés dans cette partie étaient des prélèvements ponctuels effectués au moment du prélèvement des échantillons. Il ne s'agit pas d'une étude des impacts des variations saisonnières des paramètres abiotiques et leurs impacts sur les taux de contamination des sites étudiés pourtant cette approche est aussi pertinente et elle a été développée par Belkhodja et al. (2012) sur les côtes tunisiennes en utilisant *P. caerulea*. Le but premier était de caractériser les sites de prélèvement de point de vue physico-chimique comme prérequis pour pouvoir mieux comprendre les variations dans les réponses environnementale et écotoxicologique.

III.2 Caractérisation environnementale des sites d'étude

III.2.1 Distribution spatiale des métaux trace dissous dans les eaux de surface

Les concentrations moyennes et la répartition spatiale des divers éléments traces métalliques mesurés dans les échantillons des eaux de surface collectés au niveau des quatre sites C, CB, G et K sont consignées dans le tableau ci-après.

Tableau 18: Concentrations moyennes des métaux trace ($\mu\text{g/L}$) dans les échantillons d'eau de surface collectés dans les quatre sites d'étude (C= Chebba, CB = Cap Bon, G= Gabès et K= Kerkennah). Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm déviation standard ($n=3$) $p < 0,0001$

Site	Concentrations moyennes ($\mu\text{g/L}$)						Charge moyenne totale par site
	Cd	Cu	Fe	Ni	Pb	Zn	
C	$\leq\text{LD}$	$7,24\pm 0,28$	$32,32\pm 0,31$	$10,55\pm 0,39$	$5,35\pm 0,33$	$7,39\pm 0,34$	$62,87\pm 1,65$
CB	$\leq\text{LD}$	$3,23\pm 0,31$	$24,41\pm 0,37$	$3,34\pm 0,29$	$4,11\pm 0,15$	$3,64\pm 0,45$	$38,75\pm 1,57$
G	$0,23\pm 0,04$	$2,62\pm 0,39$	$21,56\pm 0,44$	$7,72\pm 0,25$	$3,4\pm 0,17$	$5,31\pm 0,31$	$40,84\pm 1,60$
K	$\leq\text{LD}$	$5,6\pm 0,09$	$28,72\pm 0,2$	$11,43\pm 0,4$	$4,63\pm 0,37$	$12,62\pm 0,29$	$63,02\pm 1,35$
F valeur	102,88	163,42	552,41	337,81	27,39	357,34	
Limite de sécurité pour l'eau ($\mu\text{g/L}$) (USEPA, 2020)	42	4,8	--	74	210	90	
LD	0,012	0,035	0,08	0,07	0,085	0,012	
LQ	0,036	0,105	0,24	0,21	0,255	0,036	

Dépassement de la limite de sécurité.

LD ($\mu\text{g. L}^{-1}$) : Limite de détection du spectrophotomètre par absorption atomique.

LQ : Limite de quantification = $3*\text{LD}$

Quand la concentration est $\leq\text{LD}$, elle est considérée comme $\text{LQ}/2$ lors des calculs des concentrations totales.

Les métaux étudiés ont été détectés dans les quatre sites, excepté pour le Cd qui est détecté uniquement au niveau du site G avec une concentration de $0,23\pm 0,04 \mu\text{g/L}$. Dans les autres stations, les concentrations moyennes en Cd se situent en dessous de la limite de détection du spectrophotomètre. Toutefois, les limites des critères de qualité de l'eau définis par l'USEPA (2020) demeurent respectées, à l'exception du Cu au niveau des sites C et K que l'on trouve à des concentrations qui dépassent la limite de sécurité. Les concentrations les plus importantes en Cu, Fe et Pb (respectivement de $7,24\pm 0,28$; $32,32\pm 0,31$; $5,35\pm 0,33 \mu\text{g/L}$), ont été enregistrées au niveau des eaux de surface provenant du site C. Ce même site présente les deuxièmes concentrations les plus élevées après celles détectées au niveau du site K en Ni et en Zn (respectivement de $10,55\pm 0,39$ et $7,39\pm 0,34 \mu\text{g/L}$). C'est au niveau du site K, que les concentrations les plus élevées en Ni ($11,43\pm 0,41 \mu\text{g/L}$) et en Zn ($12,62\pm 0,29 \mu\text{g/L}$) ont été enregistrées. Le calcul de la charge moyenne totale métallique par site (la somme des

concentrations moyennes des différents métaux par site) montre que le site du prélèvement le plus nordique, situé au niveau du golfe de Tunis, CB, (Cap Bon), a la charge métallique moyenne totale la plus faible avec $38,75 \pm 1,57 \mu\text{g/L}$. Ceci est en accord avec l'hypothèse émise quant au site CB étant le moins pollué. La charge métallique la plus élevée est signalée au niveau du site K au golfe de Gabès avec une concentration moyenne totale de l'ordre de $63,02 \pm 1,35 \mu\text{g/L}$. Selon la concentration totale moyenne des métaux, les sites de prélèvement sont classés dans cet ordre $\text{CB} < \text{G} < \text{C} < \text{K}$. Suivant leurs concentrations les métaux trace dans les eaux superficielles des sites prospectés peuvent être hiérarchisés dans l'ordre suivant : $\text{Fe} > \text{Ni} > \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Cd}$. La distribution inter-stationnelle des métaux dans les échantillons d'eau étudiés avec le résultat de l'analyse statistique de variance sont représentés au niveau de la figure ci-après. La figure 46 montre une variabilité inter-sites fortement significative pour tous les métaux.

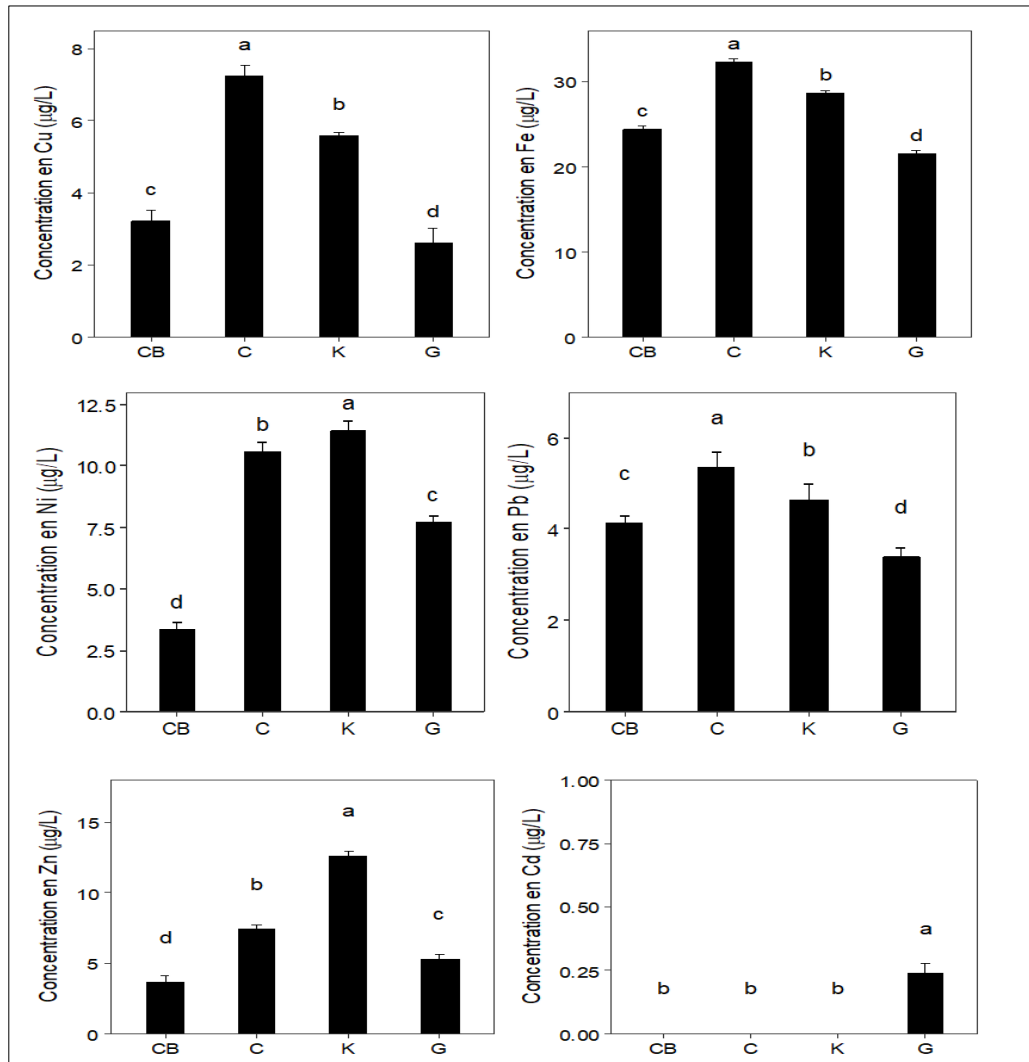


Figure 46: Distribution inter-sites des concentrations des métaux dans l'eau (Les barres d'erreurs indiquent les écarts type des moyennes. Les différentes lettres indiquent les différences statistiquement significatives)

III.2.1.1 Indice de pollution des métaux (MPI)

Le niveau de pollution par les éléments traces dans les échantillons d'eau a été évalué à travers l'indice de pollution des métaux (MPI) (figure 47). Cet indice est basé sur la charge de la zone étudiée en éléments traces métalliques dissous. Les sites C et K ont montré les valeurs de MPI les plus élevées mais tout en restant dans un intervalle de 1,2 à 2 caractérisé par un degré de pollution de classe III équivalent à une eau « légèrement affectée ». En revanche, les sites CB et G ont une MPI qui révèle que l'eau est de classe II (« qualité pauvre »).

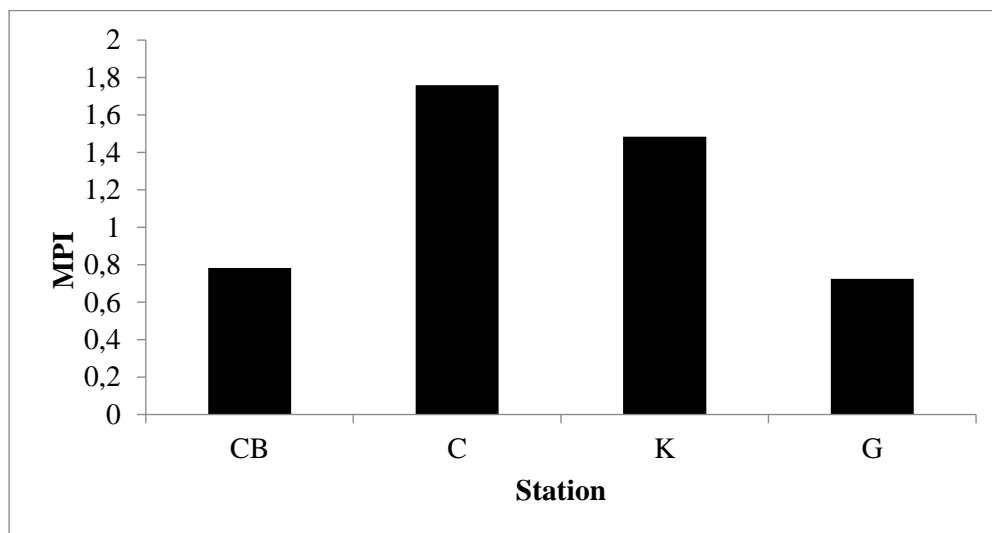


Figure 47: Diagramme de l'indice de pollution métallique (MPI) au niveau des quatre sites

III.2.1.2 Discussion

Pour les analyses des métaux trace dans l'eau, les concentrations enregistrées sont faibles, souvent inférieures aux limites de sécurité de l'USEPA sauf pour le Cu au niveau des sites C et K. Mais ceci ne veut pas forcément dire que ces stations ne présentent aucun risque écotoxicologique sur la biocénose. Selon Phillips et Rainbow, (1994) et Belkhodja et al., (2012), les mesures de contaminants dans l'eau de mer donne une image instantanée de la quantité totale de contaminants présents dans la masse d'eau, et non celle qui est disponible et donc potentiellement toxique pour les organismes marins. Concernant les variations entre les sites, les concentrations les plus élevées pour la majorité des métaux trace (Cu, Fe, Ni, Pb et Zn) mesurés dans l'eau de surface sont enregistrées au niveau des sites C et K. Ces concentrations élevées en provenance de la station K pourraient être expliquées par la dilution des rejets des concessions d'extraction de gaz et de pétrole et des émissions de la station d'épuration des eaux usées de l'ONAS à proximité des côtes de l'archipel dont les forages existent à petite distance le long de la côte et sont directement exposés aux vents dominants et courants qui semblent

avoir tendance à accumuler les polluants aux alentours des îles Kerkennah (Mastouri et al., 1996). L'archipel de Kerkennah subit également une forte pression anthropique accentuée par la présence de six unités hôtelières (dont « *Cercina* » située au bord de notre site d'échantillonnage) et l'urbanisation importante de la zone. Ceci augmente la quantité d'eau rejetée non traitée. De plus, le site K se situe au niveau de l'extrémité de l'îlot Chergui près du point de communication avec l'îlot « Gharbi » (figure 48). Il reçoit de ce fait les ruissellements agricoles et routiers des deux îlots. Cette pollution est rapidement transportée vers le rivage favorisé par les caractéristiques du milieu marin peu profond et parcouru par des chenaux de marées (COMETE engineering, 2001). Toutefois, les concentrations en métaux trace trouvées dans le site K sont inférieures aux celles trouvées par Mastouri et al., (1996).

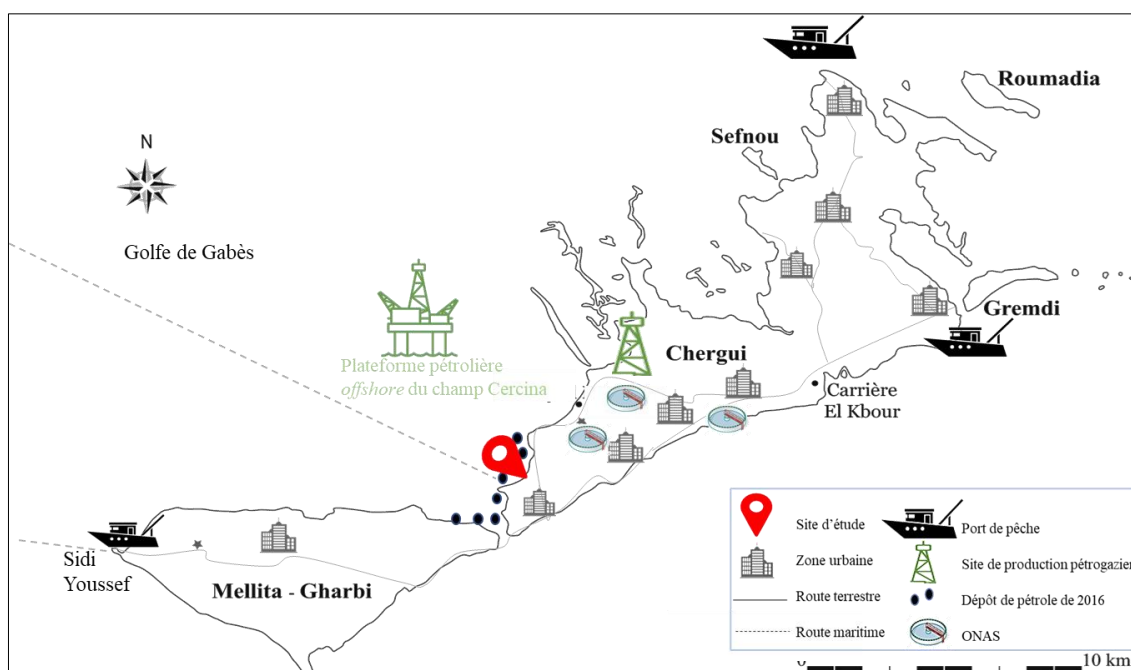


Figure 48: Position du site K sur la carte des îles Kerkennah

En ce qui concerne la station C, la pollution surtout en Cu, Fe et Pb est due à une pression anthropique accrue qui contribue à augmenter la pollution chimique de la zone. C'est une zone caractérisée par une occupation importante de la côte par les unités hôtelières et les résidences secondaires. Cette concentration d'habitation implique le rejet des eaux usées dont 80 % sont traitées par la station d'épuration à la Chebba. Ces eaux usées sont principalement d'origines domestiques mais aussi industrielles (usines de fabrication de savon et du raffinage d'huile, textiles, confections, industrie du cuir, etc.).

La concentration en Cd détectée uniquement au niveau du site G fait de ce site le plus critique en termes de pollution du fait des dangers néfastes liés aux Cd pour les organismes aquatiques et la santé humaine. Toutefois, cette concentration ($0,23 \pm 0,04 \mu\text{g/L}$) reste toujours

inférieure à la limite de sécurité de l'eau selon l'USEPA et à la concentrations mentionnée par Drira, (2018) dans la même zone ($44 \pm 4 \mu\text{g/L}$). Ces différences de concentrations sont dues en fait que les échantillons d'eau de mer ont été prélevés à proximité des différentes sources de pollution. En effet, cette zone est le siège d'une forte agression anthropique en raison du trafic maritime important et des effluents du Groupe Chimique Tunisien (GCT) situé à 3 km au Nord de Gabès. Les rejets de l'ensemble des unités d'industries chimiques se déversent sur la plage au Sud du port de commerce (notre site d'échantillonnage) et s'écoulent lentement vers la mer. De manière alarmante, 10 à 12 mille tonnes de phosphogypse sont rejetés dans la mer par jour contenant des métaux lourds, principalement du Cd, Cu, Cr, Pb et Zn libérés dans la zone du Ghanouch au Sud du port de commerce (notre site d'échantillonnage) (Bejaoui et al., 2004; Drira, 2018). La concentration en Cd trouvée au niveau du site G est de même ordre avec la celle trouvée par Ben Salem et Ayadi (2016) au golfe de Gabès ($0,21 \mu\text{g/L}$). Les concentrations en métaux trace les plus faibles ont été détectées au niveau des eaux de surface du site CB. Ceci concorde avec les résultats de Belkhodja et al. (2012) qui a signalé que la station de Sidi Rais (notre site au Cap Bon) est la moins polluée où il n'a été détecté que le Cu avec une concentration de $6 \mu\text{g/L}$ ce qui est presque le double de la nôtre ($3,23 \mu\text{g/L}$).

D'après les résultats des dosages des ETM dans les eaux de surface, il existerait un gradient de pollution croissant au niveau des côtes tunisiennes allant du Nord (CB) vers le Sud du pays (G) ou du moins allant du golfe de Tunis au golfe de Gabès. Selon la concentration totale moyenne des métaux, les sites de prélèvement sont classés dans cet ordre $\text{CB} < \text{G} < \text{C} < \text{K}$. Les métaux trace dissous analysés dans les eaux superficielles des quatre zones étudiées sont arrangés dans l'ordre décroissant suivant : $\text{Fe} > \text{Ni} > \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Cd}$. C'est le même ordre trouvé par Ben Salem et Ayadi (2016) au sein du golfe de Gabès au niveau de la côte Sud de Sfax. Mensi et al., (2008) ont présenté un autre ordre de concentrations des ETM au niveau de la lagune de Boughrara au golfe de Gabès ; $\text{Cu} > \text{Al} > \text{Pb} > \text{Cd} > \text{Cr} > \text{Hg}$ avec des concentrations supérieures à celles qu'on a trouvé dans la présente étude et qui dépassent les limites de sécurité pour l'eau avec $7080 \pm 400 \mu\text{g/L}$ pour le Cu, $368 \pm 690 \mu\text{g/L}$ pour l'Al, $173 \pm 230 \mu\text{g/L}$ pour le Pb, $260 \pm 230 \mu\text{g/L}$ pour le Cd, $180 \pm 20 \mu\text{g/L}$ pour le Cr et $110 \pm 650 \mu\text{g/L}$ pour le Hg. Les mêmes auteurs ont signalé que les concentrations élevées en Cr et en Pb sont issues des effluents industriels et domestiques et du trafic maritime. L'indice de pollution des métaux (MPI) a montré que le site K était « légèrement affecté » (classe III) avec un indice MPI de 1,5 et le site G était considéré comme une eau « pauvre » en métaux avec un MPI de 0,8 (classe II). Pourtant ils appartiennent tous les deux au golfe de Gabès. Nos résultats ne semblent pas en accord avec ceux trouvés par Drira (2018) qui a signalé que le golfe de Gabès est sérieusement affecté par

la pollution en éléments traces métalliques avec un MPI > 6,0 (classe VI) (Tamasi and Cini, 2004; Achary et al., 2016).

III.3 Evaluation du risque écotoxicologique

III.3.1 Variation de la bioaccumulation des métaux trace dans les patelles

Nous avons homogénéisé nos échantillons de patelles afin que la tailles et la masse des divers individus ne soient pas des facteurs de variabilité qui pourraient induire un biais lors de l'estimation de la teneur des éléments traces (tableau 19). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'écart type.

Tableau 19: Tailles et masse moyennes des patelles collectées des différentes zones étudiées. Les moyennes suivies par les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$)

	C	CB	G	K
Taille (mm)	35,0 \pm 3,1 ^a	35,0 \pm 2,7 ^a	36,5 \pm 3,3 ^a	35,5 \pm 2,9 ^a
Masse (g)	8,0 \pm 1,1 ^a	7,2 \pm 0,9 ^a	8,9 \pm 1,3 ^a	7,9 \pm 1,0 ^a

Un point crucial pour l'évaluation correcte du risque écotoxicologique réside dans notre aptitude à prédire, au-delà de la concentration dans le milieu, quelle sera la fraction contaminante de ces micropolluants susceptible d'être incorporée dans les organismes (fraction biodisponible). Les concentrations moyennes et les facteurs de bioaccumulation (BAF) (calculé comme le rapport entre les concentrations internes dans patelles et concentrations dans les échantillons d'eau de surface) des métaux dosés dans les tissus des *P. caerulea* prélevées dans les sites d'étude sont présentés dans le tableau 20. Les valeurs sont exposées en microgramme par gramme de poids sec, sous forme de moyenne \pm écart type. Les différentes lettres indiquent les différences statistiquement significatives (ANOVA $P \leq 0,05$).

Tableau 20 : Concentrations moyennes internes des métaux ($\mu\text{g/g PS}$) et facteurs de bioaccumulation (BAF) dans les patelles ($n=6$). Les lettres indiquent une significativité différente entre les valeurs.

Station	C	CB	G	K	LD
Cd	$\leq 0,012(\text{LD})^b$	$\leq 0,012(\text{LD})^b$	$0,23 \pm 0,21^a$ (BAF = 1,000)	$\leq 0,012(\text{LD})^b$	0,012
Cu	$0,03 \pm 0,04^a$ (BAF = 0,004)	$0,014 \pm 0,01^a$ (BAF = 0,004)	$0,06 \pm 0,07^a$ (BAF = 0,023)	$0,04 \pm 0,03^a$ (BAF = 0,007)	0,035
Fe	$0,73 \pm 0,31^b$ (BAF = 0,023)	$9,10 \pm 4,72^a$ (BAF = 0,373)	$8,03 \pm 5,71^a$ (BAF = 0,372)	$1,47 \pm 0,72^b$ (BAF = 0,051)	0,08
Ni	$0,11 \pm 0,04^{bc}$ (BAF = 0,010)	$\leq 0,07(\text{LD})^c$	$0,60 \pm 0,25^a$ (BAF = 0,078)	$0,18 \pm 0,25^b$ (BAF = 0,016)	0,07
Pb	$0,21 \pm 0,11^b$ (BAF = 0,039)	$1,08 \pm 0,37^a$ (BAF = 0,263)	$1,29 \pm 0,36^a$ (BAF = 0,369)	$0,30 \pm 0,1^b$ (BAF = 0,065)	0,085
Zn	$1,54 \pm 1,24^b$ (BAF = 0,208)	$2,54 \pm 1,65^b$ (BAF = 0,698)	$8,21 \pm 7,48^a$ (BAF = 1,546)	$6,20 \pm 3,26^{ab}$ (BAF = 0,491)	0,012

Pour mieux visualiser la répartition des concentrations internes entre les différents sites étudiés, la figure 49 permet de voir, entre autres, les sites où des concentrations maximale ou minimale ont été détectées.

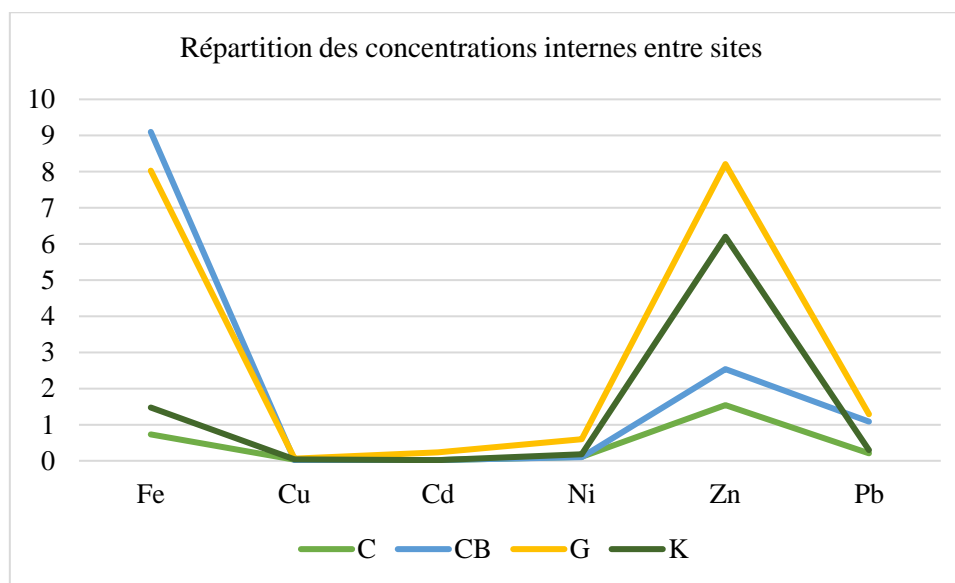


Figure 49 : Répartition inter-sites des concentrations internes des différents métaux dosés

Des différences significatives entre les sites ont été notées pour chaque métal évalué dans *P. caerulea* à l'exception du cuivre qui, sur l'ensemble des métaux étudiés, ne présentait aucune différence statistiquement significative (ANOVA $p > 0,05$) et qui était le métal le moins bioaccumulé dans tous les sites d'étude (représenté par les concentrations les plus faibles trouvées dans les tissus de patelles issues de chaque site), avec $0,014 \pm 0,01 \mu\text{g/g PS}$ au niveau du site CB ; $0,03 \pm 0,04 \mu\text{g/g PS}$ au niveau du site C ; $0,04 \pm 0,03 \mu\text{g/g PS}$ au niveau du site K

et $0,06 \pm 0,07 \mu\text{g/g PS}$ au niveau du site G. Les valeurs maximales des concentrations moyennes internes se trouvent, sauf pour le Fe, dans les patelles provenant du site G (Cd ($0,23 \pm 0,21 \mu\text{g/g PS}$); Cu ($0,06 \pm 0,07 \mu\text{g/g PS}$); Ni ($0,60 \pm 0,25 \mu\text{g/g PS}$); Pb ($1,29 \pm 0,36 \mu\text{g/g PS}$); et Zn ($8,21 \pm 7,48 \mu\text{g/g PS}$)). La concentration moyenne interne en Fe était légèrement plus élevée chez les patelles appartenant au site CB ($9,10 \pm 4,72 \mu\text{g/g PS}$) que chez les individus provenant du site G ($8,03 \pm 5,71 \mu\text{g/g PS}$), toutefois sans qu'une différence statistiquement significative n'ait été observée (ANOVA $p = 0,2 > 0,05$). En revanche, les concentrations internes minimales étaient éparpillées entre les deux sites CB et C. Les concentrations internes minimales en Fe, Pb et Zn ($0,73 \pm 0,31$, $0,21 \pm 0,11$ et $1,54 \pm 1,24 \mu\text{g/g PS}$, respectivement) ont été détectées au niveau des patelles provenant du site C et les concentrations internes minimales en Cu et en Ni ($0,014 \pm 0,01 \mu\text{g/g PS}$ pour Cu et sous la limite de détection ($0,07 \mu\text{g/g PS}$) pour Ni ont été trouvées au niveau du site CB. Comme pour les résultats dans l'eau, le Cd, qui est considéré comme l'un des ETM les plus toxiques (Burger, 2008; Rabaoui et al., 2013), n'a été détecté que dans les patelles provenant du site G ($0,23 \pm 0,21 \mu\text{g/g PS}$) avec un BAF = 1. Considérant les facteurs de bioaccumulation BAF, le cuivre, qui s'est révélé être le moins bioaccumulé dans tous les sites, présente les BAF les plus faibles au niveau de tous les sites (0,004 à la fois à la Chebba et au Cap Bon ; 0,023 à Gabès et 0,007 aux îles Kerkennah). Cependant, Zn et Fe semblent avoir les BAF les plus élevés parmi tous les métaux étudiés à l'exception du site G, où les BAF les plus élevés étaient représentés par Zn et Cd.

III.3.1.1 Discussion

Les résultats montrent une fluctuation inter-sites des concentrations en métaux trace dans les tissus des patelles ce qui semble dépendre principalement du taux de contamination du milieu où elles se trouvent. En effet, les fortes concentrations en métaux trace enregistrées au niveau du site G, semblent être liées au degré de contamination des eaux provenant de ce site avec l'exclusivité de la présence du Cd. En d'autres termes, les niveaux de contamination par les métaux trace dans les animaux reflètent ceux enregistrés dans l'eau (Rumisha et al., 2017b; Zaidi et al., 2022). Ceci confirme les travaux effectués sur des patelles le long des côtes Nord de la Tunisie (Belkhodja et al., 2012). En effet, ces auteurs ont montré l'existence d'une forte corrélation entre l'état de contamination des eaux et les teneurs en métaux trace enregistrées dans les tissus des patelles. La forte contamination métallique au niveau du site G est due au fait que la ville de Gabès subit une forte pression anthropique d'origine industrielle provenant de l'industrie de l'acide phosphorique (Bejaoui et al., 2004; Ghannem et al., 2010; Drira, 2018) mais aussi, comme l'ont signalé Rabaoui et al., (2013), par les propriétés hydrographiques du

golfe de Gabès responsable du transport des polluants dans différentes directions. De plus, Wei et Yang (2012), ainsi que Rabaoui et al., (2013) ont signalé les effluents domestiques comme source de pollution par les métaux trace. Belkhodja et al. (2012) considéraient le site CB comme le site le moins pollué dans leur étude sur les patelles méditerranéennes en 2012. La présente étude a été menée six ans plus tard et a montré que les eaux au niveau du site CB deviennent de plus en plus polluées par les ETM tout en restant le site le moins pollué parmi tous les sites étudiés. Les ETM, spécialement le Fe et le Pb, présents dans l'eau et dans les tissus des patelles provenant du site CB pourraient s'expliquer par le fait que cette station reçoit les eaux usées domestiques et les rejets des effluents épurés des trois stations d'épuration des zones avoisinantes à travers oued Soltane, oued Meliane et oued el Bey (Ennouri et al., 2010). Par exemple, Oued el Bey draine 60 % des polluants rejetés par plusieurs centres urbains du nord-est de la Tunisie. Les principales sources de pollution dans cet Oued sont la tannerie, la papeterie, la brasserie, les usines de fabrication des conserves de tomates très répandues au Cap Bon en Tunisie et les rejets d'abattoirs (COMETE engineering, 2008). Sans oublier les effets des courants marins saisonniers qui drainent des eaux chargées en métaux trace en provenance des zones relativement polluées du Golfe de Tunis allant de Raoued à Soliman en passant par Cap Carthage (Ben charrada, 1997). Notre site CB est situé à quelques mètres de l'abri de pêche de Sidi Rais qui n'aura qu'un effet minime sur la pollution (Belkhodja et al., 2012). Les impacts liés à l'urbanisation et au tourisme croissants sont importants le long de cette partie de la côte (WWF, 2020).

En comparant nos résultats avec d'autres études portant sur *P. caerulea* ou d'autres modèles de bioindicateurs, les concentrations de cadmium (Cd) enregistrées dans la présente étude sont les plus faibles comparées aux résultats des études antérieures effectuées sur *P. caerulea* par Rabaoui et al. (2013) dans le golfe de Gabès ($0,605 \pm 0,0252$ – $1,065 \pm 0,0858$ µg/g PS), par Belkhodja et Romdhane (2013) sur la côte Nord de la Tunisie ($0,78 \pm 0,24$ – $1,63 \pm 0,27$ µg/g PS). Nos valeurs sont également inférieures aux concentrations trouvées par Chouba (2009) chez le gastéropode *Hexaplex trunculus* collecté sur le golfe de Gabès et qui dépassent 1,8 µg /g PS. Par contre, elle est égale à la concentration moyenne en Cd trouvée par le même auteur chez des moules dans la région de Menzel Jemil en Tunisie (côte Nord). Des études antérieures utilisant les patelles pour estimer les concentrations des métaux en Méditerranée montrent que faibles teneurs internes en Cd chez des individus de *P. piperata* ($0,039 \pm 0,011$ µg/g PS) (Bergasa et al., 2007), *P. candei* et *P. aspera* ($0,041 \pm 0,013$ – $0,102 \pm 0,011$ µg/g PS, respectivement) des îles canaries (Lozano-Bilbao et al., 2021). Sur la base des résultats

mentionnés ci-dessus, Cubadda et al., (2001) et Yüzereroğlu et al., (2010) suggèrent que les *Patella* peuvent être utilisées comme modèles pour la biosurveillance de la disponibilité du Cd.

Pour le plomb, les concentrations moyennes enregistrées dans les tissus des patelles collectées dans les sites CB et G (1,08 µg/g PS et 1,29 µg/g PS respectivement) sont nettement plus importantes que celles enregistrées dans la chair de la moule *Mytilus galloprovincialis*, organisme de référence dans les programmes de surveillance environnementale, issue des côtes Nord tunisiennes avec une concentration de $0,59 \pm 0,12$ µg/g PS (Chouba, 2009). L'intervalle de concentrations moyennes en Pb enregistrées dans la présente étude ($0,21 \pm 0,11$ – $1,29 \pm 0,36$ µg/g PS) sont nettement inférieurs à ceux enregistrés précédemment chez des individus de *P. caerulea* sur la côte Nord de la Tunisie ($3,51 \pm 0,67$ – $3,61 \pm 0,8$ µg/g PS) (Belkhodja et Romdhane, 2013). Cependant, nos résultats pour le Pb sont comparables aux ordres de mesures de Pb trouvés chez des spécimens de patelles dans d'autres études (Campanella et al., 2001; Cubadda et al., 2001; Storelli et Marcotrigiano, 2005; Bergasa et al., 2007; Yüzereroğlu et al., 2010; Rabaoui et al., 2013; Lozano-Bilbao et al., 2021).

Pour le nickel, notre gamme de concentrations moyennes enregistrées ($0,11 \pm 0,04$ – $0,60 \pm 0,25$ µg/g PS) était nettement inférieure à celles signalées chez *P. caerulea* au niveau des zones contaminées de la côte Nord de la Tunisie (Belkhodja et al., 2012). Cependant, nos valeurs pour Ni étaient généralement comparables à celles signalées pour *P. candei* et *P. aspera* aux îles Canaries (Lozano-Bilbao et al., 2021).

Pour le cuivre, les niveaux de concentrations enregistrées dans cette étude ($0,014 \pm 0,01$ – $0,06 \pm 0,07$ µg/g PS) sont nettement inférieurs à ceux signalés par Belkhodja et al. (2012) ($5,59 \pm 0,47$ – $9,29 \pm 1,43$ µg/g PS). Les concentrations sont faibles par rapport à ce qui était attendu. En effet, les zones des prélèvements étaient supposées polluées par les activités anthropogéniques. Cela pourrait être expliqué, comme le suggèrent Cubadda et al. (2001) par la forte capacité de l'espèce *P. caerulea* à réguler la teneur intratissulaire de ce métal. Ce mécanisme de régulation chez les invertébrés marins pourrait impliquer une élimination renforcée de ce métal, une résistance à son absorption ou encore une certaine combinaison entre les deux ou bien le stockage de la partie en excès sous une forme non toxique sous forme de granules jusqu'à utilisation ultérieure (Depledge et Rainbow, 1990). Cependant, des expériences au laboratoire d'exposition de *P. aspera*, *P. caerulea* et *P. rustica* au cuivre n'ont mentionné aucune capacité de régulation de ce métal chez les individus testés bien qu'ils aient montré des différences interspécifiques au niveau de la dynamique d'absorption et d'excrétion de ce métal à court terme (De Pirro et al., 2001; Reguera et al., 2018). Ceci pourrait également être lié à l'effet stressant généré indirectement par le Cd (BFA= 1) en tant que remplaçant du cuivre et

du fer aussi dans diverses protéines (exemple : ferritine et apoferritine) en favorisant leurs libération des membranes biologiques, contribuant ainsi à une augmentation de leurs concentrations intracellulaires (Casalino et al., 1997; Dorta et al., 2003; Watjen and Beyersmann, 2004; Al Kaddissi, 2012). C'est le cas pour cette étude où nos résultats montrent que les plus forts degrés de bioaccumulation de fer et de cuivre coïncident avec les plus niveaux de bioaccumulation de Cd les plus forts (site G). Casas (2005) a signalé que, chez les mollusques tel que les patelles, l'hémolymphe renferme un pigment respiratoire à base de Cu : l'hémocyanine. Chez les prosobranches, le catabolisme de l'hémocyanine conduirait à un stockage du cuivre sous forme de sulfure cuivrique (CuS) dans la masse viscérale. D'autre part, Segar et al., (1971) ont montré que la coquille de *Patella vulgata* est près de six fois plus riche en Cu que les tissus mous (42 ppm poids sec contre 7.7). Certains auteurs signalent, en effet, qu'un moyen d'éliminer les éléments métalliques présents dans les tissus des mollusques consiste en une excrétion de ces métaux par le manteau dans la coquille au cours de la production de cette dernière (Cunningham, 1979). Ces auteurs ainsi ne recommandent pas l'usage des gastéropodes *in toto* en tant que bioindicateur de pollution par le cuivre car ils peuvent présenter des niveaux en cuivre extrêmement élevés résultant d'un processus physiologique normal, et donc tout à fait indépendant d'une contamination du milieu dans lequel ils vivent.

Pour le fer et le zinc, nos résultats étaient supérieurs à ceux rapportés chez *P. Caerulea* par Belkhodja et al. (2012). Des facteurs de bioaccumulation de Zn assez importants, notamment au site G (BFA = 1,546), pourraient s'expliquer par la présence de grandes quantités de Zn dans le milieu méditerranéen et dans les sédiments (Drira, 2018). Cependant, des études sur les patelles indiquent que, quel que soit la qualité du milieu, ces animaux ont tendance à accumuler préférentiellement le Fe et le Zn (Cravo et Bebianno, 2005 ; Belkhodja et al., 2012 ; Espinosa et Rivera-Ingraham, 2016) comme ce qui a été observé habituellement chez plusieurs gastéropodes marins (Depledge and Rainbow, 1990; Brown et al., 2004). Comme on l'a vu dans la présente étude, *P. caerulea* ne fait pas exception (les concentrations les plus élevées dans les patelles ainsi que les BAF les plus élevées sont enregistrés avec ces deux métaux). Une explication reposerait sur le fait que ce sont des métaux essentiels dans les organismes marins ; ils s'accumulent donc facilement dans les tissus par absorption passive et sont alors incorporés dans les enzymes et les pigments métaboliquement significatifs (Rivera-Ingraham et al., 2013 ; Trevizani et al., 2016). Il paraît qu'il n'est pas surprenant de trouver de fortes concentrations de Fe dans les tissus des invertébrés marins (Espinosa et Rivera-Ingraham 2016), particulièrement pour les patelles, leurs radulas sont constituées à 1,46% par un matériau

minéral à base de fer appelé goethite (α -FeOOH) (Davies et Cliffe, 2000) et il est naturellement secrété pendant le développement de la radula comme agent durcissant putatif (Mann, 1988; Runham et al., 1969).

III.3.2 Evaluation du dérèglement de l'homéostasie

III.3.2.1 Analyse des activités biochimiques des enzymes antioxydantes chez *P. caerulea*

Pour évaluer le niveau d'activation du système de défense antioxydant enzymatique (CAT, SOD, GPX), et la peroxydation des lipides (MDA), des dosages ont été effectués sur les patelles provenant des quatre sites : C, CB, G et K. Les différents niveaux des réponses enzymatiques et de peroxydation lipidique mesurés dans les échantillons des quatre sites d'échantillonnage sont résumés dans la figure suivante.

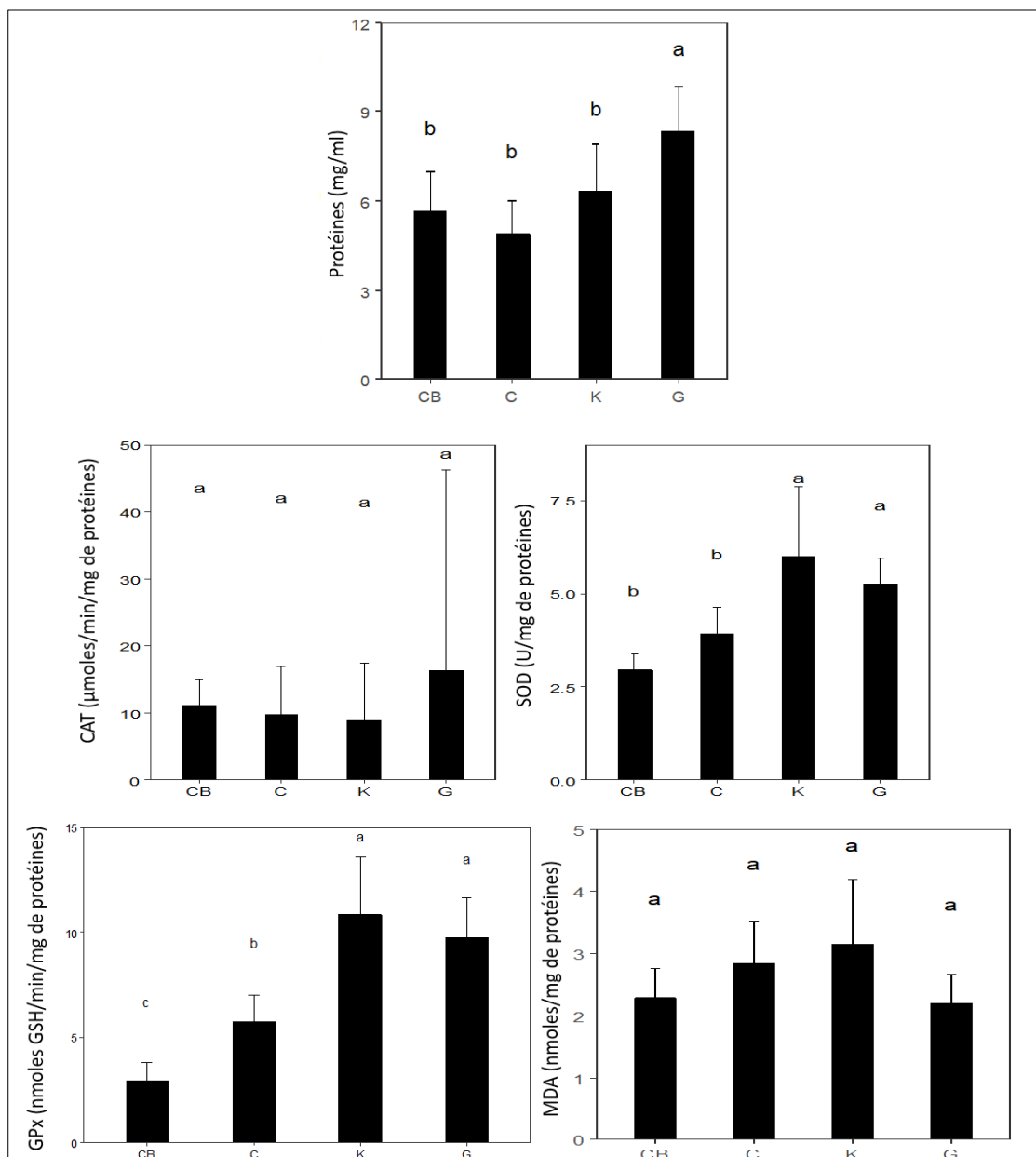


Figure 50: Distribution inter-sites des réponses antioxydantes (Les barres d'erreurs indiquent les écarts type des moyennes. Les différentes lettres indiquent les différences statistiquement significatives)

L'analyse statistique des niveaux totaux de protéines chez *P. caerulea* n'a révélé aucune différence significative entre les sites d'étude, à l'exception du site G ($p > 0,05$), où la concentration de protéines totales est la plus élevée ($8,33 \pm 4,48$ mg/ml).

L'analyse statistique des activités des SOD a groupé les sites deux à deux ; C / CB où les activités SOD sont les plus faibles ($3,9 \pm 0,7$ et $2,9 \pm 0,4$ U/mg protéines, respectivement) et G / K où les activités sont significativement plus élevées ($p=0,01 < 0,05$) ($5,25 \pm 0,7$ et $6 \pm 1,9$ U/mg de protéine, respectivement). Aucune différence significative n'a été montrée pour les activités de CAT mesurées dans les patelles des différents sites. Comme pour la SOD, les patelles provenant des sites G et K ont exprimé les niveaux de GPx les plus élevés statistiquement avec une activité GPx (nmoles GSH/min/mg de protéines) de $9,77 \pm 1,9$ pour les patelles du site G à $10,85 \pm 2,72$ pour les patelles du site K. L'activité GPx des patelles provenant du site CB était significativement la plus faible comparées à toutes les autres ($2,9 \pm 0,8$ nmoles GSH/min/mg de protéines). Si on était amené à classer les sites selon les niveaux d'expression de la GPx, le classement serait similaire à celui des dosages des métaux dans l'eau avec les sites appartenant au golfe de Gabès (G et K) au même niveau : $CB < C < K < G$. Ainsi, la tendance de la pollution du Nord vers le Sud est soutenue par l'augmentation de l'activité GPx dans *P. caerulea* du Cap Bon vers les sites plus au sud.

On constate qu'il y a une induction des MDA dans tous les sites d'étude, reflétant une peroxydation lipidique chez tous les échantillons de patelles provenant de toutes les localités étudiées et indiquant ainsi un stress au niveau cellulaire résultant des changements dans l'environnement engendrés, le plus probablement, par une contamination chimique (Vlahogianni et al., 2007). Cependant, aucune différence significative n'a été révélée entre les différents sites étudiés avec le niveau de MDA le plus élevé chez les patelles du site K ($3,15 \pm 1,05$ nmoles / mg de protéines).

III.3.2.2 Discussion

- Les protéines

Khebbab et al., (2010) ont observé une augmentation significative des réserves protéiques chez le bivalve *Ruditapes decussatus* contaminé au Cd pendant une durée de 21 jours. Ceci concorde avec nos résultats qui montrent une concentration plus élevée en protéines chez les patelles provenant du site G ayant accumulé dans leur tissu les concentrations de Cd

les plus élevées comparées aux autres. De même, Douhri et Sayah (2009) ont montré une diminution du niveau des protéines chez l'espèce *Patella vulgata* prélevée au niveau des sites pollués à la Baie de Tanger au Maroc résultant de leur dégradation ou une réduction de leur biosynthèse par les xénobiotiques. Cependant, plusieurs études ont porté sur la mesure du niveau total de protéines non pas comme un biomarqueur, mais plutôt comme moyen pour le dosage des niveaux d'expression des activités enzymatiques (CAT, GPx et SOD) et des taux de peroxydation lipidique (MDA) (de Almeida et al., 2004; Vlahogianni et al., 2007; Douhri and Sayah, 2009; Attig et al., 2010; Buffet et al., 2011; Soltani et al., 2012).

- L'activité de la SOD

Plusieurs auteurs ont montré que l'augmentation d'activité des SOD au sein des organismes marins est ainsi liée à la présence des ETM (Farombi et al., 2007; Fernández et al., 2010; Lushchak, 2011; Batista et al., 2014). Ceci expliquerait les valeurs élevées d'activité obtenues au sein des individus des sites C, K et G (sites présentant les plus fortes concentrations des métaux). Farombi et al., (2007) ont expliqué que l'accumulation de métaux trace provoque un stress oxydatif ce qui conduit à la production des anions superoxydes qui induisent la SOD à piéger, voie catalytique, les radicaux superoxydes en H₂O₂, fournissant ainsi une défense contre ce type de toxicité de l'oxygène. Un excès de production de l'anion superoxyde conduit donc à une augmentation de la concentration cellulaire en SOD (Silvestre, 2005; Belli et al., 2010). Zelko et al. (2002) ont suggéré que les sites actifs des isoenzymes SOD nécessitent la présence de métaux catalytiques (Cu, Fe, Mn, Ni, Zn) pour leur activation. Ceci confirme nos résultats, vu que les BAFs les plus élevés pour Cu, Fe, Ni et Zn ont été enregistrés dans les patelles provenant des sites les plus chargés en ces métaux à savoir Gabès et Kerkennah [sauf BAF (Fe) qui était le plus élevé à Gabès mais pas à Kerkennah]. Nos résultats sont en accord avec ceux de Espinosa et Rivera-Ingraham, (2016) sur *P. ferruginea* en Espagne, qui ont trouvé une activité SOD significativement importante dans le site avec des niveaux élevés de métaux trace.

- L'activité de la CAT

Les catalases, quant à elles, catalysent la réaction de détoxification d'H₂O₂ produit par la dismutation des superoxydes (O₂⁻) par les SOD. Par conséquent, une augmentation de l'activité des SOD doit entraîner une activité des catalases (Vlahogianni et al., 2007 ; Fernández et al., 2010). En effet, nos résultats montrent une expression de CAT chez tous les individus. Ceci peut être lié à une induction de sa biosynthèse, pour la protection contre le stress oxydatif résultant du métabolisme des xénobiotiques. Le test post hoc de Tukey n'a révélé aucune

différence significative entre les niveaux d'expression de CAT chez les patelles provenant des différents sites étudiés. Espinosa et Rivera-Ingraham, (2016) ont enregistré quant-à eux une activité de CAT plus faible chez les individus de *P. ferruginea* habitant des sites pollués espagnols. En revanche, cette activité enzymatique a significativement augmenté chez les individus de *P. vulgata* habitant les zones marines polluées des côtes marocaines (Doughri et Sayah, 2009). De tels effets ont également été observés chez des palourdes (*Ruditapes decussatus*) provenant des sites pollués des côtes tunisiennes (Jebali et al., 2007), chez des moules de la lagune de Bizerte en Tunisie exposées au Lindane.

Dans la présente étude, l'absence de différences significatives dans l'expression de l'activité de CAT semble confirmer les suggestions des études antérieures de terrain (Regoli, 1998) et en laboratoire (Cajaraville et al., 1997; Lionetto et al., 2003) qui ont évoqué l'existence de certains mécanismes compensatoires intervenant dans la réponse de CAT, chez certains mollusques, tel que la moule *Mytilus galloprovincialis*. Cela pourrait être le cas de la présente étude et pourrait expliquer le manque de différences significatives dans les activités de CAT parmi les individus étudiés. Une autre explication a été donnée par Regoli et al., (2002b) qui ont suggéré que des interactions complexes entre les pro-oxydants et leurs cibles cellulaires peuvent confondre l'évaluation des conditions de stress oxydatif basé uniquement sur les niveaux d'antioxydants. Ainsi, les mêmes auteurs signalent qu'il n'est pas rare de voir comment, face à un certain facteur de stress, certains antioxydants augmentent alors que d'autres restent inchangés voire diminuent. Par conséquent, une perturbation induite chimiquement du statut redox cellulaire a été suggérée pour démontrer les dommages cellulaires comme résultat d'une dégradation de la qualité environnementale (Espinosa et Rivera-Ingraham, 2016).

- L'activité du GPX

Le gradient de pollution allant du CB vers G est bien mis en évidence par une augmentation du niveau des GPx au niveau des patelles allant du site CB vers G. En 2016, Espinosa et Rivera-Ingraham ont signalé la même tendance avec la patelle ferrugineuse (*Patella ferruginea*) au niveau du détroit de Gibraltar où les individus issus des sites les plus pollués présentaient les niveaux les plus élevés d'activité de GPx. Des niveaux d'expression élevés de GPx ont également été signalés chez des moules exposées à une forte pollution métallique au niveau des côtes de Ria de Vigo (Vidal-Liñán et al., 2014) et la mer Tyrrhénienne du Nord (Regoli et Principato, 1995).

- Les MDA

Nos résultats sont en accord avec ceux de Viarengo et al., (1991) et Pampanin et al., (2005) en Italie et Vlahogianni et al., (2007) dans le golfe de Saronique à Athènes, qui ont étudié les effets toxiques des métaux sur la peroxydation des lipidiq ue chez *Mytilus galloprovincialis*. Ils ont démontré une induction des MDA suite à une exposition métallique. De plus, l'absence de différence significative entre nos quatre sites d'échantillonnage est en accord avec l'explication fournie par Viarengo et al., (1991), qui ont mesuré les MDA dans la glande digestive des moules d'Italie et ont montré que les niveaux de ce produit de peroxydation lipidique fluctuent significativement selon la période de l'année et qu'aucune différence significative n'a été observée dans l'activité de MDA pendant le printemps (et particulièrement au mois de Mars) coïncidant avec la période principale d'émission des gamètes. Ceci est en accord avec nos conclusions, notamment parce que notre échantillonnage a été effectué au cours du printemps pendant le mois de mars 2018. Ce constat est vraisemblablement lié au statut métabolique saisonnier des animaux, qui est conditionné par la gamétogenèse (Gabbott, 1975; Lowe et al., 1982) et la disponibilité alimentaire (Hawkins and Bayne, 1984).

En conclusion, *Patella caerulea* peut être utilisée non seulement comme bioindicateur quantitatif de la contamination métallique mais également un bioindicateur d'effets (« sentinelle ») attestant des effets écotoxicologiques induit par les ETM notamment *via* le dérèglement de l'homéostasie rédox.



CHAPITRE IV

Chapitre IV : Evaluation de la toxicité de l'aluminium et du plomb sur *P. vulgata* et *L. littorea* lors de contaminations expérimentales aiguës (96h)

I. Introduction

Les éléments traces métalliques font partie des composés chimiques les plus présents dans les environnements estuariens et marins. Issus des rejets de l'industrie chimique, des combustions partielles des carburants, et de l'extraction minière (Jones et al., 2005). Des concentrations élevées de métaux sont observées dans les sédiments, l'eau et les compartiments biotiques (Ansari et al., 2004; Trevizani et al., 2016; Rumisha et al., 2017b; Barchiesi et al., 2020; Zaidi et al., 2022). Comme il a été évoqué dans l'introduction de ce travail de thèse, les métaux sont classés soit comme « métaux non essentiels » (tels que l'arsenic, le cadmium, le mercure et le plomb) ou « métaux essentiels » (tels que le cuivre, le fer ou le zinc). Certains métaux sont également placés dans une position incertaine de par l'absence de données suffisantes sur leur toxicité. Ceci est le cas pour l'aluminium qui ne semble assurer aucune fonction dans l'organisme tout en induisant pas une toxicité forte et rapide.

Dans ce chapitre la toxicité de deux métaux a été comparée : l'aluminium (Al) et le plomb (Pb).

La toxicité de l'aluminium (Al) au laboratoire, ainsi que dans l'environnement, a été étudiée sur des vertébrés d'eau douce mais ces effets sur les invertébrés marins sont peu abordés. Les travaux ont révélé des effets négatifs de ce métal sur la survie, le développement, la reproduction et le système nerveux des vertébrés. Il s'est révélé par exemple lié à l'induction d'un stress oxydatif, de génotoxicité et d'effets apoptotiques notamment chez des poissons (Botté et al., 2022b; Closset et al., 2021; Rosseland et al., 1990; Taghizadeh et al., 2013). Des études récentes ont montré que le stress oxydatif et l'apoptose sont des phénomènes physiologiques souvent liés et impliqués dans les physiopathologies induites par les xénobiotiques (Kannan et Jain, 2000). En milieu marin, des tests ont porté sur des cultures cellulaires de spongiaires (Akpiri et al., 2019), sur des échinodermes (Pagano et al., 1996), des cnidaires (Negri et al., 2011; Trenfield et al., 2017), des bivalves (Golding et al., 2015), des crustacés (van Dam et al., 2016) et une seule étude a porté sur la toxicité de ce métal sur les gastéropodes utilisant l'espèce tropicale *Nassarius dorsatus* pour laquelle l'intoxication aiguë à l'Al a montré des effets sur le développement (Trenfield et al., 2016).

Concernant le plomb (Pb), de façon surprenante, les tests de toxicité ont porté exclusivement sur des bivalves (Bat et al., 2001; Beiras and Albentosa, 2004; Wang et al., 2009; Nadella et al., 2013; Xie et al., 2017). On ne connaît donc pas encore sa toxicité sur les

gastéropodes marins tels que les patelles et les littorines (Noventa et al., 2011; Reguera et al., 2018).

Pour compléter ce manque d'information, nous nous donc sommes intéressés à évaluer la toxicité de l'Al et du Pb par des tests de toxicité aigüe sur nos deux modèles de gastéropodes d'Atlantique disponibles au laboratoire BIOSSE : *Littorina littorea* et *Patella vulgata* ; en conditions contrôlées de laboratoire (éclairage, salinité et températures fixes) en définissant les courbes dose-réponse (et valeurs de toxicologie de référence (LOEC, LC10, LC30, LC50); et les activités des enzymes antioxydantes (CAT, GPx, SOD) ; ainsi que la peroxydation lipidique (MDA). De plus, afin de compléter notre approche, nous avons imaginé effectuer une estimation de l'expression de plusieurs gènes de réponse aux stress par qPCR. Nous nous sommes rendus compte, avec surprise, que pour nos deux modèles de gastéropodes, bien que reconnus comme bioindicateurs en écotoxicologie marine, aucune séquence de biomarqueurs n'était disponible. Disposant de transcriptomes, nous avons donc décidé de rechercher les séquences codantes complètes de divers biomarqueurs impliqués dans les réponses aux ERO (Espèces Réactives à l'Oxygène) communément produits lors de contaminations métalliques, soit les biomarqueurs antioxydants et ceux de la voie apoptotique intrinsèque.

Pour rappel, les mécanismes antioxydants enzymatiques et apoptotiques des deux modèles de gastéropodes, indiquant les divers biomarqueurs recherchés sont présentés dans les figures ci-dessous (figures 51, 52).

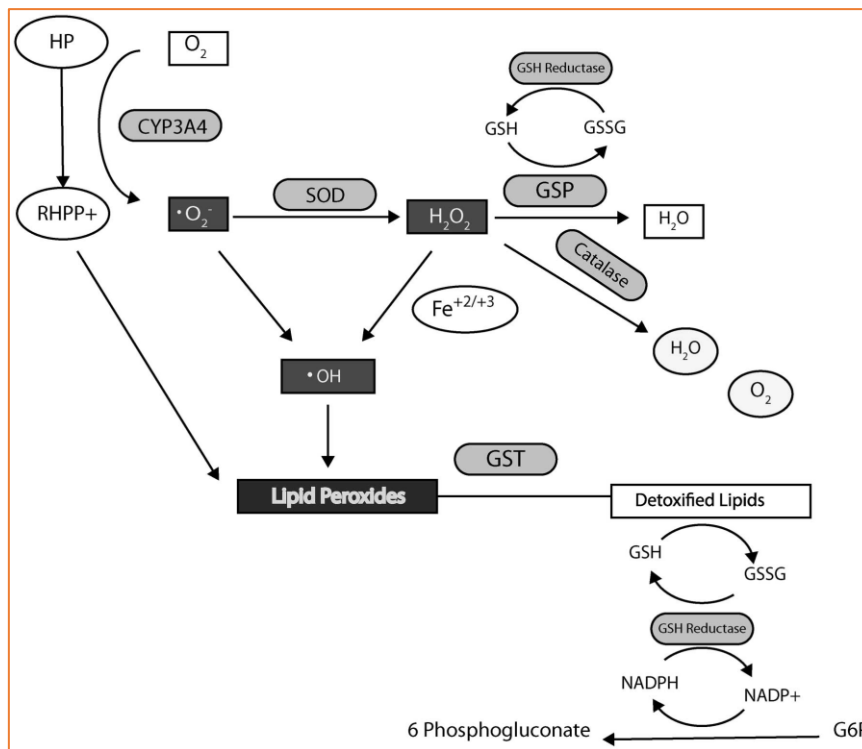


Figure 51: Mécanisme enzymatique antioxydant des mollusques.

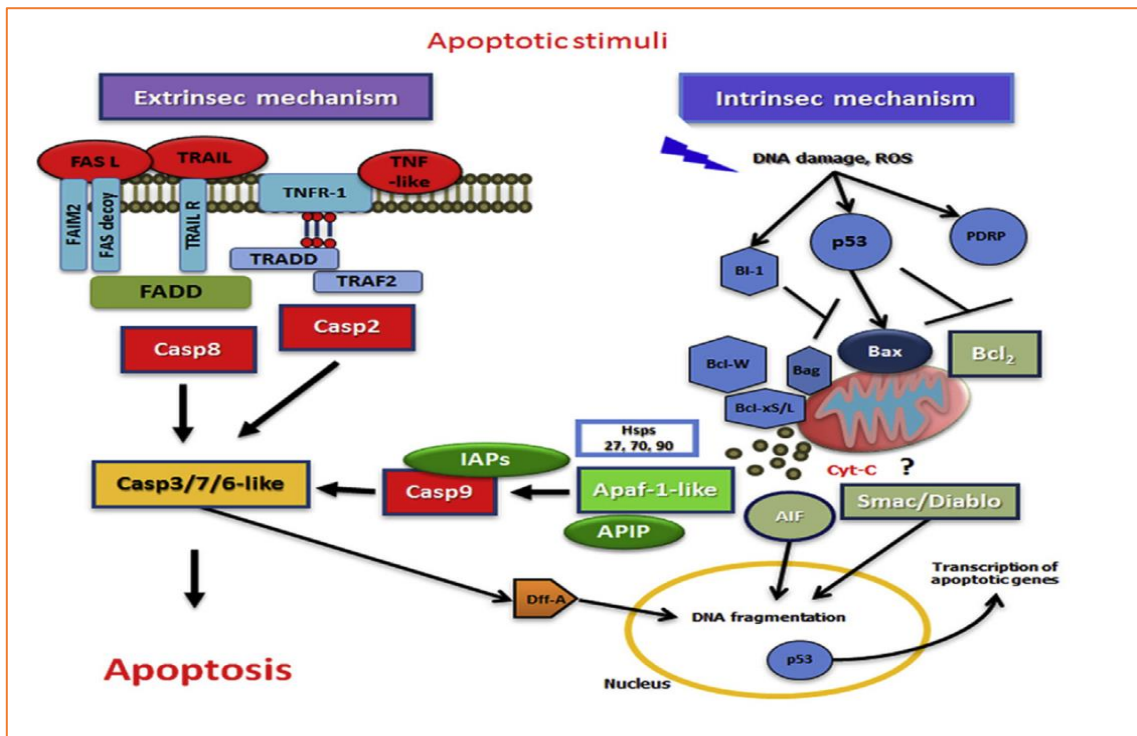


Figure 52 : Mécanismes apoptotiques des mollusques

I.1 Pourquoi l'aluminium ?

I.1.1 Caractéristiques générales et origines naturelles de l'aluminium

L'aluminium (Al), de numéro atomique 13 (masse atomique : $26,9815386 \pm 8 \times 10^{-7}$ u ; CAS : 7429-90-5), est le métal le plus abondant de l'écorce terrestre (Taylor, 1964). Il s'agit d'un métal de classe A, c'est à dire qui se lie préférentiellement avec l'oxygène (Maya et al., 2016). Il est répandu dans l'environnement et est donc présent dans chaque cellule de chaque organisme (Exley et Mold, 2015). Paradoxalement, aucune fonction biologique établie pour l'Al n'a encore été trouvée. Il est naturellement présent dans l'environnement aquatique *via* l'altération des roches et minéraux permettant alors sa sédimentation et sa précipitation dans les rivières, les estuaires et les eaux côtières (Zhou et al., 2018) (figure 53). Certaines études ont montré que les événements hydrothermaux dans les dorsales médio-océaniques constituent une autre source potentiellement importante d'Al arrivant dans les niveaux supérieurs de l'océan *via* des processus d'*upwelling* (Elderfield et Schultz, 1996; Resing et al., 2015). Actuellement, les concentrations en Al varient de 0.6 à 131.96 $\mu\text{g/L}$ dans les eaux côtières, tandis que les concentrations en haute mer varient de 0.09 à 2.03 $\mu\text{g/L}$ (Botté et al., 2022a).

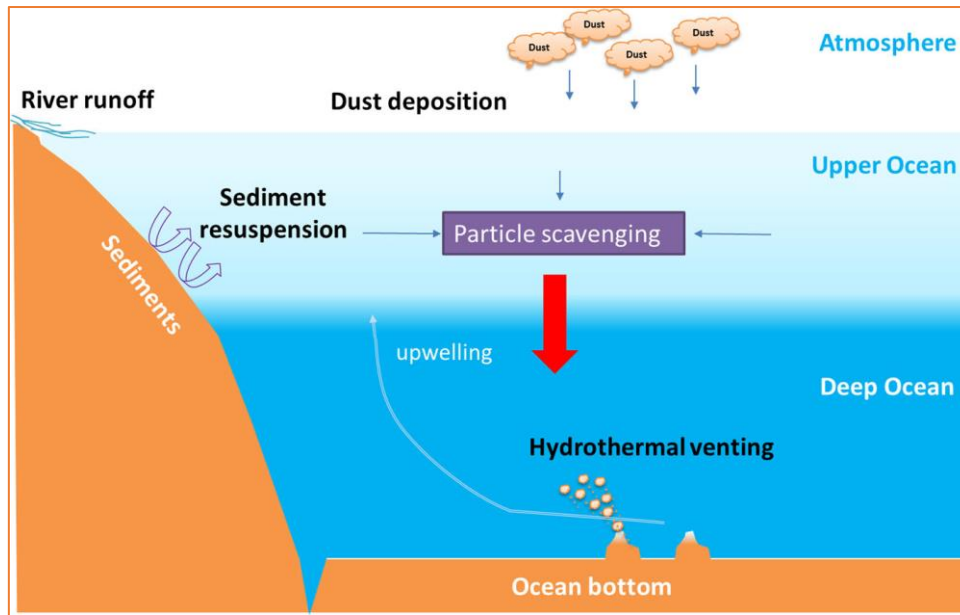


Figure 53: Schématisation des origines naturelles d'aluminium en milieu marin (Zhou et al., 2018)

I.1.2 Domaines d'utilisation de l'aluminium

L'aluminium est un métal utilisé par l'homme depuis très longtemps dans les domaines de l'automobile, la construction, l'industrie alimentaire et même dans les cosmétiques. Une autre source anthropogénique d'aluminium concerne l'usage d'anodes sacrificielles ou galvaniques afin de protéger de la corrosion les structures métalliques immergées (les coques de bateaux, balises, ...) en remplacement des peintures antifouling (toxiques, à base de TBT). Ceci induit un rejet continu d'aluminium dans l'eau de mer (Rosseland et al., 1990; Gabelle et al., 2012; Cerchier et al., 2018). De plus, le traitement des eaux usées nécessite l'utilisation des sels d'aluminium qui se retrouvent ensuite dans les eaux naturelles (Leleyter et al., 2018). La pollution industrielle ainsi que la corrosion des produits en aluminium amplifient l'émission de ce métal dans l'environnement sous forme de déchets solides et d'effluents d'eaux chargées en aluminium (Rosseland et al., 1990; Jones et al., 2005).

I.1.3 Bioaccumulation de l'aluminium chez les gastéropodes marins

Les études portant sur le dosage de l'aluminium chez les gastéropodes en milieu marin font cruellement défaut dans la littérature. En effet, seules deux études mentionnées dans le tableau 21 ont dosé intentionnellement ce métal chez quatre espèces de gastéropodes y compris la patelle *P. caerulea*, notre modèle de bioindicateur méditerranéen. Il a été montré que l'accumulation d'Al est hétérogène et varie selon la nature du tissu (branchies, glande digestive, foie ou pied). Duysak et Azdural, (2017) ont enregistré les plus fortes concentrations dans les branchies de *P. caerulea* alors que pour *Trophon geversianus* et *Buccinanops globulosus* le pied

était l'organe qui accumule le plus l'Al tandis que pour *Adelomelon ancilla* la glande digestive est le tissu d'accumulation préférentielle de l'Al (Primost et al., 2017).

Tableau 21: Concentrations d'aluminium enregistrées chez des espèces de gastéropodes

Localité	Espèce	Concentration ($\mu\text{g/g PS}$)	Référence
Le golfe d'Alexandrette, Turquie	<i>P. caerulea</i>	$32,6 \pm 6,1 - 123,1 \pm 9,9$	(Duysak et Azdural, 2017)
Le golfe Nuevo, Argentine	<i>Adelomelon Ancilla</i>	13,04 – 23, 2	(Primost et al., 2017)
	<i>Buccinanops Globulosus</i>	13,31 – 103,32	
	<i>Trophon Geversianus</i>	15,55 – 71,89	

Les écart types n'ont pas été mentionnés par les auteurs Primost et al., (2017)

I.1.4 Facteurs « affectants » la disponibilité de l'aluminium dans le milieu marin

L'aluminium est devenu un « élément sous haute surveillance » pour les organismes aquatiques (Taghizadeh et al., 2013). Le contact entre l'eau (H_2O) et l'Al favorise la création instantanée d'un précipité colloïdal $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Hydroxyle d'aluminium), ce qui diminue la quantité de Al^{3+} disponible. La solubilité de ce métal dépend aussi des paramètres abiotiques environnementaux, tels que le pH. En effet, l'Al a une forte solubilité à pH acide ($\text{pH} < 6,0$), où il sera alors principalement présent sous forme d'ions Al^{3+} libres toxiques (Campbel, 1995). Dans des conditions alcalines ($\text{pH} > 8,0$), les espèces prédominantes sont monomériques inorganiques telle que $\text{Al}(\text{OH})_4^-$. Ainsi, l'aluminium devient plus soluble et sa toxicité augmente à pH faible et élevé (Driscoll et Schecher, 1990; Botté et al., 2022a). Ainsi, dans la plage de pH de la plupart des eaux de surface naturelles, l'Al existe principalement sous sa forme insoluble $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou « Gibbsite » (figure 54). Sa toxicité étant directement liée au pH, il est important de considérer que l'acidification actuelle des milieux aquatiques pourrait favoriser la disponibilité des ions Al^{3+} pour les organismes vivants et donc augmenter la toxicité de cet élément sur le vivant (Barabasz et al., 2002; Botté et al., 2022a). La température de l'eau est également un facteur important à considérer car elle peut affecter la solubilité, l'hydrolyse et la spéciation de l'Al. Plusieurs études telles que Lydersen et al., (1990) et Gensemer et Playle, (1999) ont montré que les processus de polymérisation d'Al seraient plus importants à des températures élevées. Lydersen et al., (1990) par exemple ont indiqué qu'à 25°C et $\text{pH}= 5$, 30% de l'Al se transforment en Al^{3+} tandis qu'à 0°C ($\text{pH}=5$) cette forme représente plus de 85% de l'Al dissous. En outre, la concentration en carbone organique dissous est également un facteur important concernant la solubilité de l'Al (Santore et al., 2018). En effet, lorsque il est

lié à de la matière organique dissoute, sa toxicité diminue (Gensemer and Playle, 1999; Gabelle et al., 2012; Santore et al., 2018).

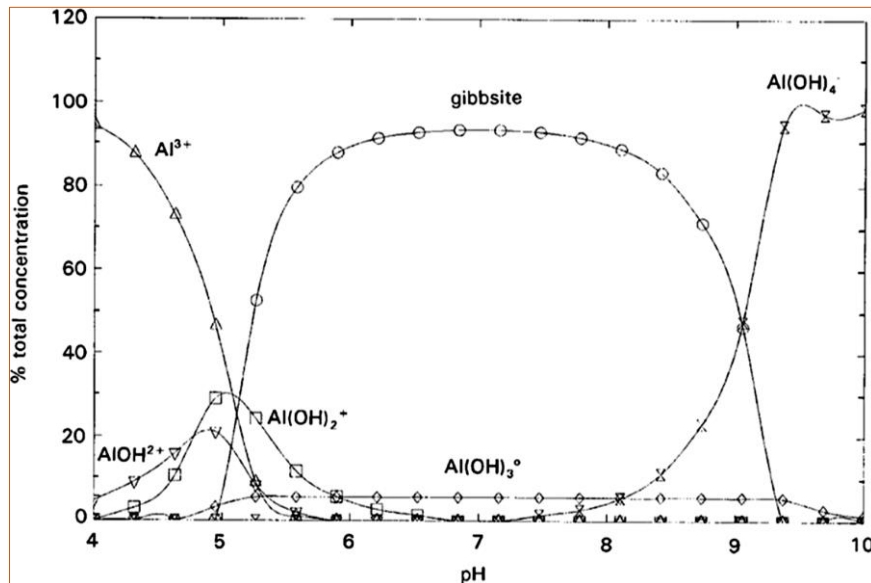


Figure 54: Modification de la solubilité et la disponibilité de l'Al en fonction du pH (Gensemer et Playle, 1999)

I.1.5 Valeurs réglementaires pour l'aluminium en milieu marin

Il n'existe pas encore de concentrations réglementaires pour l'aluminium. Cependant, Golding et al., (2015) ayant effectué des tests de toxicité chronique sur 11 espèces tropicales en Australie, recommandent une valeur seuil pour garantir la qualité de l'eau de mer n'excédant pas 24 µg/L afin d'assurer la protection de 95% des espèces marines. Quelques années plus tard, van Dam et al., (2018) ont essayé de faire une synthèse des concentrations disponibles au sein de 17 espèces tropicales et tempérées. Ces auteurs ont recommandé alors une valeur seuil de l'ordre de 56 µg/L pour assurer la protection de 95% des espèces marines. Toutefois, ces valeurs ont été établies en utilisant des espèces vivantes dans des zones exclusivement tropicales et/ou tempérées ce qui crée une incertitude quant à leur validité pour l'ensemble des organismes marins. De plus, il y a une différence énorme entre les deux valeurs proposées (Golding et al., (2015) : 24 µg/L ; van Dam et al., (2018) : 56 µg/L). Ceci est potentiellement lié aux espèces étudiées lors de ces deux études, avec comme facteur important également la température (Lydersen et al., 1990; Gensemer et Playle, 1999;).

I.2 Pourquoi le plomb ?

I.2.1 Caractéristiques générales et origines naturelles du Plomb

Le plomb (Pb), de numéro atomique 82 (masse atomique : $207,2 \pm 0,1u$; CAS: 7439-92-1), est un métal gris bleuâtre naturellement présent dans la croûte terrestre (Carocci et al., 2016). Les premiers biochimistes ont remarqué que le plomb avait une forte affinité avec le soufre. Il fait partie des métaux non essentiels, c'est-à-dire qu'il n'a aucune fonction biologique connue pour les organismes vivants. De ce fait, il est connu par avoir des effets toxiques (Flora et al., 2006). Lors d'étude en chimie de l'environnement ; Il figure parmi les divers métaux détectés communément dans l'environnement aquatique, constituant un métal particulièrement suivi en raison de ses fortes accumulations et toxicité démontrées sur de multiples espèces (Botté et al., 2022b). Il est également reconnu pour être , au même titre que le mercure, l' ETM le plus ubiquiste de tous les métaux et l'un des polluants les plus toxiques de tous les éléments métalliques contaminant l'écosystème (Ramade, 2007). Classé au 4^{ème} rang après l'aluminium, le cuivre et le zinc en termes de métaux dont la consommation est la plus importante, le plomb est présent dans la liste des substances chimiques prioritaires des conventions et réglementations internationales (OSPAR, UE, USEPA, ...). Enfin, il présente une certaine toxicité pour l'homme, entraînant notamment des lésions neurologiques plus ou moins graves. Les concentrations de plomb estimées en milieu marin sont aux alentours de 2.10^{-3} et $0.2 \mu\text{g/L}$ (Lavilla et al., 2011).

I.2.2 Domaines d'utilisation du plomb

L'utilisation du plomb remonte à l'ère de l'Égypte ancienne (5000-3000 avant JC) (Nriagu, 1983). Cependant, son exploitation a considérablement augmenté depuis le 18^{ème} siècle avec la mise en place de l'industrie métallurgique. Il est également utilisé pour la fabrication de tuyaux, de pigments et comme biocide dans les peintures antisalissures mais aussi pour la céramique et les matériaux de construction. Enfin, le plomb a également été utilisé comme additif dans les carburants, dans certaines batteries, des composants électriques et parfois des médicaments et des cosmétiques (Flora et al., 2006). La plus forte augmentation des rejets de plomb dans l'environnement a eu lieu entre 1950 et 2000, correspondant à l'utilisation du plomb tétraéthyle comme additif dans l'essence. Cette utilisation croissante du plomb génère une accumulation croissante de ce métal non biodégradable dans tous les compartiments et niveaux de l'écosystème ce qui en fait une préoccupation majeure pour la santé de l'organisme. Le plomb pénètre dans le milieu aquatique par les précipitations, les dépôts secs, le ruissellement des rejets municipaux et industriels (Carocci et al., 2016).

I.2.3 Bioaccumulation du plomb chez les gastéropodes

Contrairement à ce qu'on a vu avec l'aluminium, les gastéropodes ont souvent été utilisés pour l'évaluation des concentrations métalliques y compris le Pb (tableau 22).

Tableau 22: Concentrations de Plomb trouvées dans la littérature chez des gastéropodes, classées chronologiquement

Espèce	Pb	Reference
<i>Patella caerulea</i>	$0.21 \pm 0.11 - 1.29 \pm 0.36$	Présente étude
<i>Littorina littorea</i>	10	Bryan et al. 1983
<i>Littorina obtusata</i>	7,8	
<i>Littorina saxatilis</i>	13	
<i>Patella caerulea</i>	$0.14 \pm 0.05 - 1.52 \pm 0.34$	Campanella et al. (2001)
<i>Patella caerulea</i>	0.06 – 2.18	Cubadda et al. (2001)
<i>Monodonta mutabilis</i>	0.12 – 0.15	
<i>Monodonta turbinata</i>	0.13 – 0.47	
<i>Littorina saxatilis</i>	2.3 – 16.6	Daka et Hawkins (2004)
<i>Patella caerulea</i>	$0.18 \pm 0.13 - 0.28 \pm 0.15$	Storelli et Marcotrigiano (2005)
<i>Patella piperata</i>	$0.629 \pm 0.33 - 2.49 \pm 3.10$	Bergasa et al. (2007)
<i>Monodonta turbinata</i>	0.39 – 1.06	Conti et al. 2007
<i>Patella caerulea</i>	$0.05 \pm 0.0 - 0.70 \pm 0.03$	Yüzereroğlu et al. (2010)
<i>Buccinum undatum</i>	0.040 – 0.132	Noël et al. 2011
<i>Littorina littorea</i>	0.040 – 0.140	
<i>Murex brandaris</i>	0.040 – 0.157	
<i>Nacella magellanica</i>	0.13 ± 0.16	Conti et al. 2012
<i>Patella caerulea</i>	$3.51 \pm 0.67 - 3.61 \pm 0.8$	Belkhdja et Romdhane (2013)
<i>Patella caerulea</i>	$0.722 \pm 0.0757 - 1.848 \pm 0.0711$	Rabaoui et al. (2013)
<i>Patella caerulea</i>	$0.010 \pm 0.003 - 0.191 \pm 0.028$	Aydın-Önen et al. (2017)
<i>Patella caerulea</i>	$0.479 \pm 0.14 - 3.58 \pm 0.94$	Conti et al. (2017)
<i>Patella candei</i>	$0.114 \pm 0.021 - 0.277 \pm 0.065$	Lozano et al. (2021)
<i>Patella aspera</i>	$0.095 \pm 0.02 - 0.401 \pm 0.073$	Lozano et al. (2021)

Certains auteurs n'ont pas mentionné les écart types dans leurs données

I.2.4 Facteurs affectant la solubilité et la biodisponibilité du plomb

Le plomb se trouve en milieu marin sous forme organique, inorganique et est principalement dans l'environnement sous forme de sels [PbCO_3 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, PbSO_4] ou

hydroxylé [Pb(OH)₂ ou ionisés (Pb²⁺)]. La spéciation du plomb sous la forme Pb²⁺ est très importante pour déterminer sa biodisponibilité. La toxicité du Pb dépend du pH, de la dureté de l'eau, la concentration en matière organique dissoute et de la présence d'autres métaux dans la masse d'eau (Botté et al., 2022b). Le scénario de la diminution du pH océanique d'ici 2100 pour atteindre 7,7 conduirait à l'augmentation de 10% du taux de formes libre de Pb ainsi que la complexification de ce métal au chlore entraînant une augmentation de 15% des formes PbCl⁺, PbCl₂ et PbCl₃ (Caldeira et Wickett, 2003; Millero et al., 2009). Les sédiments adsorbent la plus grande partie du Pb présent dans le milieu marin tandis que seule une partie mineure restera dissoute dans l'eau en raison de la complexation de la phase organique du Pb par les ligands. De plus, les composés organiques comme le plomb tétraéthyle (C₈H₂₀Pb, liquide huileux incolore) ou le plomb tétraméthyle (C₄H₁₂Pb) sont biodisponibles pour les organismes. Le Pb se complexe également avec la matière organique dissoute (MOD) influençant sa biodisponibilité ainsi que sa toxicité (Sánchez-Marín and Beiras, 2012).

I.2.5 Valeurs réglementaires pour le plomb en milieu marin

Afin de limiter les effets négatifs du plomb sur les organismes marins, des seuils maximaux de concentrations ont été définis dans plusieurs pays, comme l'Australie et la Nouvelle-Zélande. En Australie, la valeur recommandée pour assurer la protection de 95% des espèces marines est de 4,4 µg/L (<https://www.waterquality.gov.au/anz-guidelines/guideline-values/default/water-quality-toxicants/search>). Toutefois, ces valeurs ont été établies en utilisant des espèces marines vivant dans des zones exclusivement tropicales ce qui crée une incertitude quant à leur validité pour l'ensemble des organismes marins. Les niveaux potentiellement élevés de bioaccumulation de Pb dans les invertébrés marins présentent un risque écotoxicologique potentiel pour la consommation humaine (Sioen et al., 2008). En Europe, le maximum de concentrations de plomb autorisées dans les bivalves commercialisés, comme les moules ou les huîtres, est de 1,5 mg/kg de poids frais par le règlement (CE) n°1881/2006 (CE, 2006; Cabral-Oliveira et al., 2015). En 2015, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a établi le niveau d'apport hebdomadaire tolérable pour le Pb à 25 µg/kg de poids corporel. En raison de la persistance et de la toxicité du plomb pour l'homme et l'environnement, des organisations internationales ont imposé des règles strictes au cours des 20 dernières années sur l'utilisation du plomb dans l'industrie, y compris dans l'essence, la peinture, soudage dans des boîtes de conserve ou les pesticides à base de arséniate de plomb (Pb₃(AsO₄)₂) (Annibaldi et al., 2009).

Les deux métaux étudiés dans le cadre de ce chapitre ont fait l'objet de deux synthèses bibliographiques (Reviews) présentées en Annexes : Botté Audrey, **Zaidi Mariem**, Guery Joelle, Fichet Denis, Leignel Vincent (2022). *Aluminium in aquatic environments: abundance and ecotoxicological impacts* (Aquatic Ecology, IF= 1.641). Botté Audrey, Seguin Clarisse, Nahrgang Jasmine, **Zaidi Mariem**, Guery Joelle, Leignel Vincent (2022). *Lead in the marine environment: concentrations and effects on invertebrates* (Ecotoxicology, IF = 2.823).

La partie caractérisation de biomarqueurs a fait l'objet d'une communication affichée au sein du congrès SEFA Versailles (2021).

II. Matériel et méthodes

II.1 Phase d'acclimatation au laboratoire

Les gastéropodes utilisés provenaient de la Normandie (Granville). Ils ont été récupérés à la main à marée basse. Les deux espèces ont été réparties dans des aquariums de 40 litres, d'eau de mer artificielle (33 g/L, Instant Ocean, 19-20 °C). Une phase d'acclimatation de 10 jours a été effectuée. Il est important de noter que la toxicité des métaux reste influencée par les facteurs physico-chimiques (pH, salinité, température...) et les autres éléments présents dans l'environnement (Taghizadeh et al., 2013). De ce fait, lors des études de toxicité en laboratoire, pour établir les valeurs toxicologiques de référence telles que la LC10 (10% *Lethal Concentration*), LC30 et LC50, il est apparu important d'indiquer les valeurs des paramètres physico-chimiques : pH (7.9-8.2), salinité (33g/L) et température (18-21 °C). Ces paramètres ont été vérifiés toutes les 24h. Une photopériode automatique a été fixée dans la salle d'expérimentation de 15h Jour / 9h Nuit correspondant à peu près aux variations observées en milieu naturel en mai-juin (période d'échantillonnage des gastéropodes). Les aquariums étaient équipés d'une pompe munie d'éponges pour filtrer l'eau, d'un bulleur d'oxygénation et d'un mitigeur pour assurer un mélange continu. Les animaux n'ont pas été nourris pendant l'acclimatation (ni pendant l'exposition de 96h) comme cela a été recommandé par d'autres auteurs appliquant des tests de toxicité aiguë sur des gastéropodes marins (Taghizadeh et al., 2013; Abdel Gawad, 2018). Le nombre maximal d'individus par aquarium de 40 litres ne dépassait pas 200 individus.

II.2 Préparation des solutions Stocks

Les solutions stocks ont été préparées dans de l'eau de mer artificielle (33 g/L, *Instant Ocean*, 19-20 °C). Les métaux testés ont été achetés chez Merck sous les appellations suivantes : nitrate d'aluminium [Al (NO₃)₃, CAS number : 7784-27-2] et nitrate de plomb [Pb (NO₃)₂,

CAS number : 7439-92-1] avec des niveaux de pureté de 95%. Les concentrations testées ont été par la suite diluées à partir des solutions stocks préalablement préparées.

II.3 Tests de toxicité

Les contaminations métalliques aiguës ont été réalisées sur 96 heures en accord avec les recommandations de plusieurs publications (Bat et al., 2001; Abdel Gawad, 2018). Ceci nous a permis par la suite de comparer nos valeurs toxicologiques de référence avec celles trouvées dans la littérature. Les concentrations ont été définies en se basant sur une échelle logarithmique, puis dans un second temps, des concentrations intermédiaires ont été appliquées afin d'affiner nos courbes. Les différentes concentrations testées sont présentées dans le tableau ci-après :

Tableau 23: Concentrations (g/L) logarithmiques (en gras) et intermédiaires appliquées lors des expositions aux deux métaux (Al et Pb)

Aluminium				Plomb			
<i>L. littorea</i>		<i>P. vulgata</i>		<i>L. littorea</i>		<i>P. vulgata</i>	
0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻²	5*10 ⁻¹	10⁻²	5*10 ⁻³	10⁻³	2,5*10 ⁻¹	10⁻²	2,5*10 ⁻³
10⁻¹	7,5*10 ⁻¹	10⁻¹	5*10 ⁻²	10⁻¹	5*10 ⁻¹	10⁻¹	5*10 ⁻³
1	5	1	2*10 ⁻¹	1	7,5*10 ⁻¹	1	5*10 ⁻²
2		2	3	2		2	

Pour chaque espèce, toute concentration métallique testée (traitement) a été évaluée sur trois répliquâtes de 10 individus chacun (soit 30 individus/concentration) afin d'espérer une bonne représentativité. Un triplicata de contrôle est aussi effectué à chaque expérience. Aucune pompe munie d'éponge n'a été introduite dans les aquariums afin d'éviter l'absorption de métaux par le système de filtration. Les individus ont été mesurés avant d'être placés dans les cristallisoirs afin de s'assurer de l'homogénéité des lots (standardisation) en faisant le calcul du volume des littorines et des patelles, ramené à celui d'un cône selon la formule suivante :

Ensuite, la normalité des lots a été vérifiée par des test de shapiro-wilk et de Wilcoxon sur le logiciel R avant de les comparer statistiquement (en annexe, sont présentés les tableaux avec les tailles des individus par traitement).



Figure 55: Cristallisoirs d'expérimentation (patelles)

Toutes les 24 heures d'exposition, un dénombrement des individus morts était effectué et ils étaient éliminés des cristallisoirs (300 μ L) afin d'éviter les soucis de putréfaction (Abdel Gawad, 2018). Les individus étaient soupçonnés morts quand ils ne présentaient aucune réaction spontanée lors de stimulations physiques (application d'une aiguille sur le pied du gastéropode). Ils étaient alors mis à côté dans des boîtes de pétri propres. Si au bout de quelques minutes les individus ne présentaient aucun signe de vie (mouvement des tentacules ou du pied), ils étaient considérés comme mort et étaient immédiatement écartés de l'expérience.

II.4 Modélisation des courbes dose-réponse

Les courbes dose-réponse pour chaque métal et pour chaque espèce ont été établies à l'aide du package DRC du logiciel R en utilisant le modèle de régression suivant la loi de Weibull sous R studio version 3.1.0 avec un intervalle de confiance à 95%.

II.5 Recherche *in silico* de séquences de transcrits pour des biomarqueurs antioxydants et apoptotiques

Les transcriptomes caractérisés par Werner et al., (2013) pour la patelle et par Canbäck et al., (2012) pour la littorine ont été récupérés. L'analyse bioinformatique a été effectuée, en partenariat avec le Dr Myriam Badawi (BIOSSE), en utilisant tBlastx (Pearson, 2014) dont les filtres fixés étaient homology 70%, e-value 10^{-10} . Un assemblage des contigs identifiés a été réalisé, à l'aide de MAFFT version 7 (Kato et Standley, 2013) puis une traduction *in silico* afin de vérifier par la suite l'information protéique avec BLASTp (Altschul et al., 1990; Cavé-Radet, 2018).

III. Résultats

III.1 Présentation des courbes Dose-réponse

III.1.1 Aluminium

Homogénéité des lots : Pour les deux modèles de bioindicateurs, aucune différence significative entre les groupes d'individus utilisés lors des diverses concentrations d'aluminium pour les deux espèces n'a été observée (les mensurations sont présentées en annexes).

Aucune mortalité n'a été enregistrée dans les lots témoins (contrôle). Les concentrations létales (LC) provoquant 5, 10, 20, 30 jusqu'à 50% de mortalité avec leurs intervalles de confiance à 95% ainsi que l'efficacité de l'ajustement du modèle (p), pour chaque espèce, sont présentées dans les tableaux suivants.

Tableau 24: Concentrations létales acquises suites aux expositions de *P. vulgata* à l'Al (96h) (Weibull)

<i>Patella vulgata</i> (Al) ($p = 0.007826$ ** <0,01)			
	Estimation (g/L)	Erreur standard	Intervalle de confiance
LC5	0.0037967	0.0045306	-0.0056252 ; 0.0132185
LC10	0.0103482	0.0089842	-0.0083354 ; 0.0290318
LC20	0.0294331	0.0161952	-0.0042466 ; 0.0631129
LC30	0.0565671	0.0218576	0.0111117 ; 0.1020225
LC50	0.1427261	0.0453576	0.0483999 ; 0.2370524

Tableau 25: Concentrations létales acquises suites aux expositions de *L. littorea* à l'Al (96h) (Weibull)

<i>Littorina littorea</i> (Al) ($p = 0.0002426$ *** <0,001)			
	Estimation (g/L)	Erreur standard	Intervalle de confiance
LC5	0.246877	0.011074	0.222503 ; 0.271251
LC10	0.302578	0.012057	0.276040 ; 0.329115
LC20	0.374067	0.013206	0.345001 ; 0.403134
LC30	0.427090	0.014070	0.396123 ; 0.458057
LC50	0.515317	0.015679	0.480807 ; 0.549827

L'efficacité d'ajustement des modèles à 96h était significative pour les deux espèces (p value significative)

Nos expériences de contamination de patelles par de l'aluminium ont permis de montrer une LOEC à $5 \cdot 10^{-3}$ g/L. En parallèle, les littorines ont montré une LOEC à $7.5 \cdot 10^{-1}$ g/L.

D'après les différents seuils de toxicité que nous avons obtenus (tableau 24, 25), on remarque que les concentrations létales pour les patelles étaient plus rapidement atteintes que pour des littorines. Si on prend l'exemple de LC30 (concentration à laquelle 30% des individus testés sont morts), elle est de $0,056 \pm 0,021$ g/L pour les patelles et de $0,427 \pm 0,014$ pour les littorines. La figure suivante présente les courbes obtenues sous R grâce au modèle Weibull.

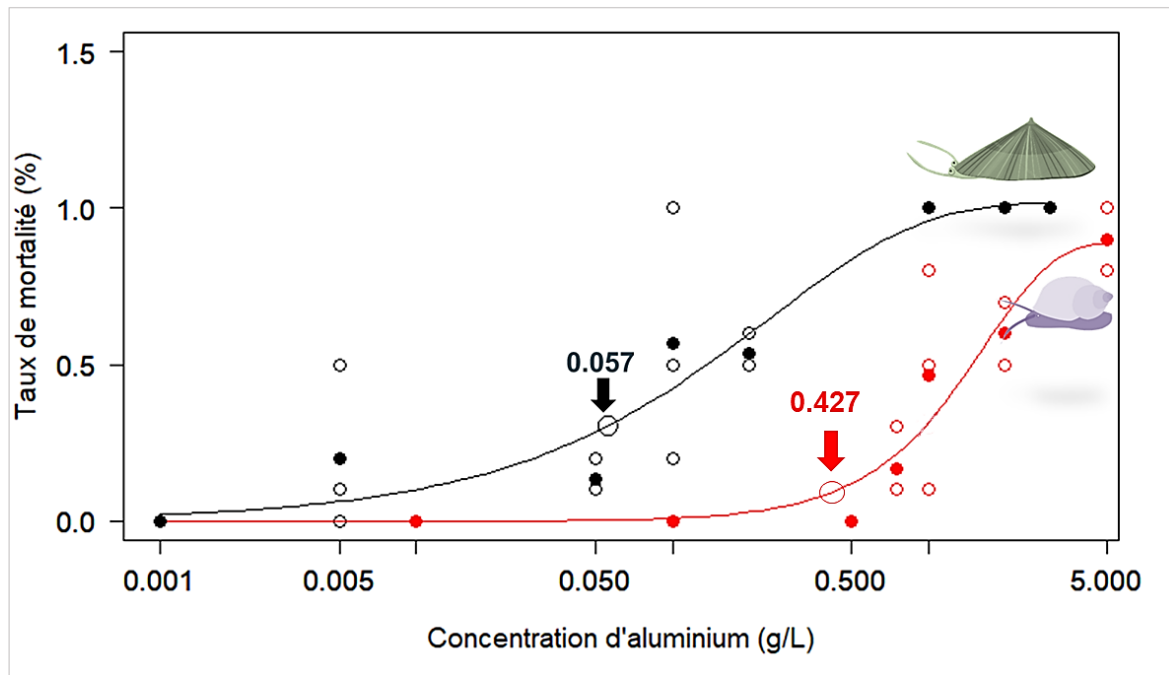


Figure 56: Courbes Dose-réponse à l'aluminium avec les LC30 pour *P. vulgata* (en noir) et *L. littorea* (en rouge)

III.1.2 Plomb

Homogénéité des lots : Comme pour l'Al, l'homogénéité des lots d'individus a été testée et aucune différence significative entre les groupes d'individus utilisés lors des diverses concentrations de Pb n'a été observée. Aucune mortalité n'a été enregistrée dans les lots témoins (contrôle). Les concentrations létales provoquant 5, 10, 20, 30 jusqu'à 50% de mortalité avec leurs intervalles de confiance à 95% ainsi que l'efficacité de l'ajustement du modèle (p), pour chaque espèce, sont présentées dans les tableaux suivants.

Tableau 26: Concentrations létales acquises suites aux expositions de *P. vulgata* au Pb (96h) (Weibull)

<i>Patella vulgata</i> (Pb) ($p = 0.0007127$ *** $<0,001$)			
	Estimation (g/L)	Erreur standard	Intervalle de confiance
EC5	0.00073615	0.00090691	-0.00115564 ; 0.00262793
EC10	0.00220650	0.00212488	-0.00222593 ; 0.00663892
EC20	0.00692959	0.00476454	-0.00300906 ; 0.01686824
EC30	0.01416870	0.00738887	-0.00124422 ; 0.02958162
EC50	0.03902747	0.01217179	0.01363755 ; 0.06441739

Tableau 27: Concentrations létales acquises suites aux expositions de *L. littorea* au Pb (96h) (Weibull)

<i>Littorina littorea</i> (Pb) ($p = 7*10^{-6}$ *** $<0,001$)			
	Estimation (g/L)	Erreur standard	Intervalle de confiance
EC5	0.210311	0.031850	0.144075 ; 0.276547
EC10	0.268206	0.030535	0.204704 ; 0.331707
EC20	0.345592	0.027111	0.289211 ; 0.401973
EC30	0.404923	0.024830	0.353285 ; 0.456560
EC50	0.506815	0.026910	0.450852 ; 0.562777

Nos expériences d'exposition au plomb pendant 96h ont permis de montrer une LOEC de 5.10^{-3} g/L pour les patelles tandis que celle pour les littorines était de 5.10^{-1} g/L. On remarque ainsi que pour le plomb, les patelles semblent être plus sensibles que les littorines avec une LC30 de $0,014 \pm 0,007$ g/L contre $0,404 \pm 0,024$ g/L. Les figures obtenues en mettant en jeu toutes nos données de mortalités pendant 96h d'exposition au Pb sont présentées dans la figure ci-après.

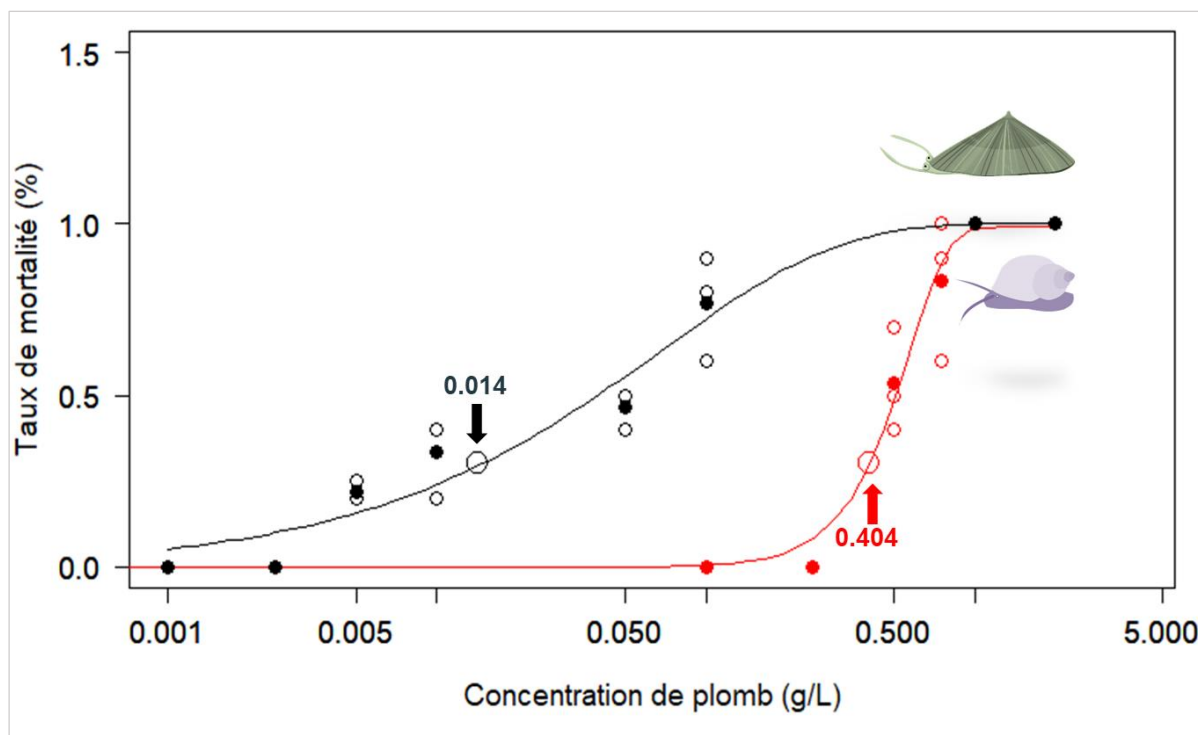


Figure 57 : Courbes Dose-réponse au plomb avec les LC30 pour *P. vulgata* (en noir) et *L. littorea* (en rouge)

III.2 Réponses biochimiques de biomarqueurs :

Une approche biomarqueur a été initiée sur *L. littorea* pour déterminer les niveaux d'activité enzymatique de biomarqueurs de stress oxydant (CAT, GPx, SOD et MDA) en réponse à des contaminations aiguës (96h) à la LC30 de chaque métal étudié (Al, Pb). Un contrôle (sans traitement) a été également effectué pour qu'on puisse comparer les résultats.

Les données obtenues suite aux dosages enzymatiques ont été analysées en utilisant le logiciel XLSTAT 2022 pour tester l'homogénéité (Test Leven, $p = 0,336 > 0,005$) et la normalité (test Kolmogorov-Smirnov (Ks), $p < 0,05$) de la variance. Un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi par le test post hoc de Dunn ont donc été appliqués pour comparer les résultats. Le programme R studio a été utilisé pour la visualisation des résultats sous forme d'une présentation boxplot. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-après :

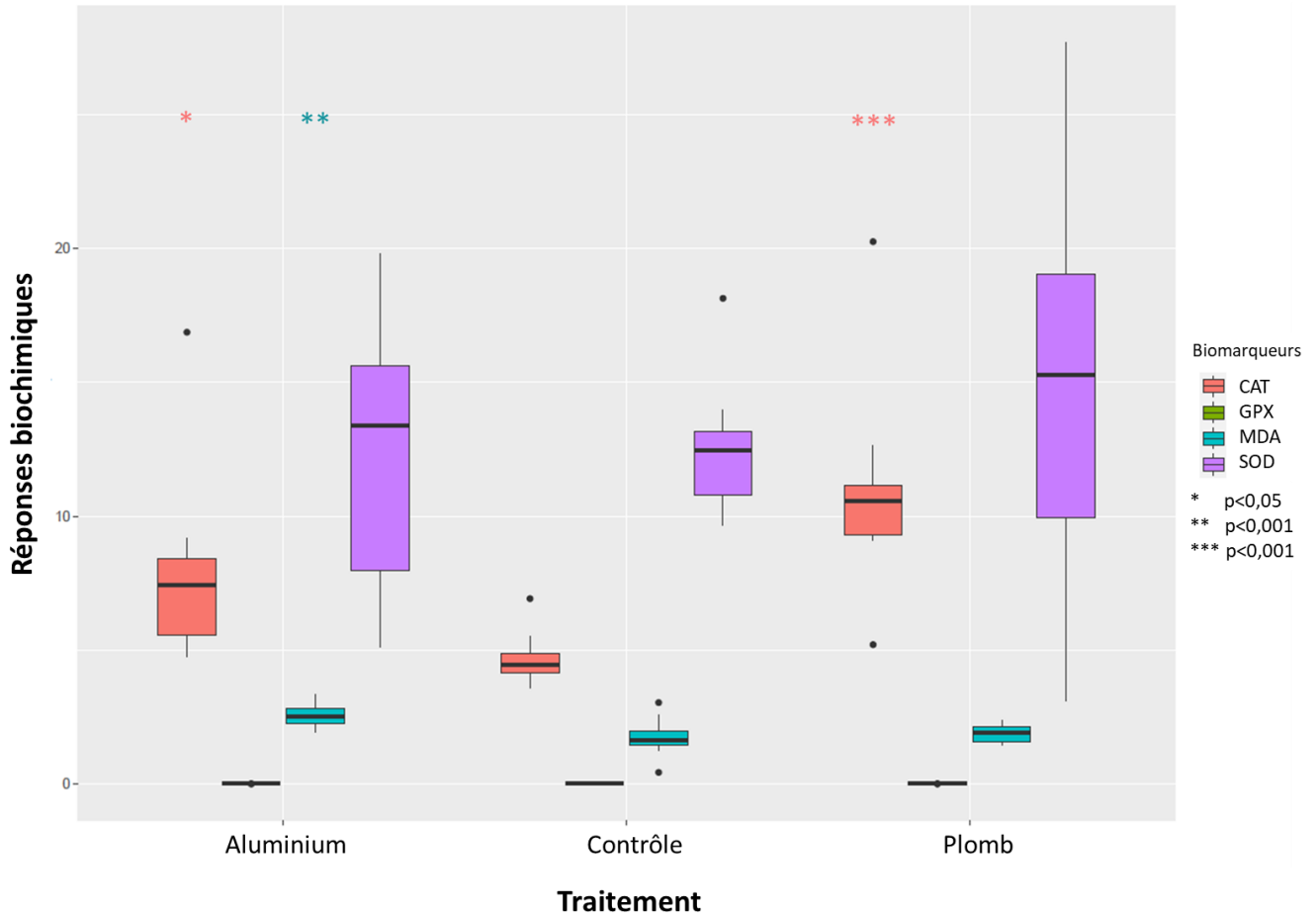


Figure 58: Réponses biochimiques des biomarqueurs de stress oxydant suite à une exposition aiguë à LC30 (Al et Pb) chez *L. littorea* (n=8)

On remarque que :

Pour la CAT : Il existe une différence significative au niveau de la réponse CAT des littorines exposées à l'Al ($p = 0,020$) et au Pb ($p = 0,0002$) par rapport au contrôle.

Pour la GPx : Les traitements métalliques n'ont pas induit une réponse enzymatique par rapport aux témoins vu que cette dernière était presque égale à zéro chez tous les individus.

Pour la SOD : On remarque une expression de la SOD chez les individus exposés à l'Al et au Pb sans toutefois aucune différence significative avec les témoins, due à la forte variabilité de réponses des différents individus.

Pour les MDA : L'exposition à la LC30 d'aluminium a induit une peroxydation lipidique (traduite par des taux de MDA) significativement différente par rapport au contrôle et au test Pb.

Les réponses antioxydantes pour la patelle sont malheureusement encore en cours d'acquisition. Nous espérons pouvoir exposer les résultats lors de la soutenance de ce travail de thèse.

III.3 Caractérisation *in silico* de séquences de biomarqueurs

III.3.1 Les séquences de biomarqueurs antioxydants

Nous avons pu caractérisés l'ensemble des biomarqueurs du systèmes enzymatiques antioxydants chez nos deux modèles à partir de l'analyse des transcriptomes. Les séquences d'ADNc complètes de biomarqueurs antioxydants caractérisés chez *L. littorea* et *P. vulgata* sont présentées sous forme de protéines dans les figures suivantes :

SOD	MLSASTNAVRSFLKPGVVAPLAACKLKHHTLPDLPYDYNALPEYISADIMKLHHQKHHATYVNNLNIA EKKIQEALAKKDIQAAISLQPALRFNGGGHINHSIFWDTLGPQGGEPTGDLMNQIKHDYGSFEAM KKELIGKTVAVQGSWGLGFNPNVNGRLRISACPNQDPLQATTGLVPLFGIDVWEHAYYLQYKNVR PDYVNAIFNIVNWNSSVDRFHQAKLEC
CAT	MANRDKCTNQLKEFKDVTVPKPETLTGTGAPVGNKLASLTVGPRGPMLLQDFVYTDMAHFNRERI PERVVHAKGSGAFGYLEITHDISKYCKANVFSAI GKKTPLAIRFSTVGGEEKSADTARDPRGFVAVK MYTEEGNWDLVGNNTPIFFIRDPMLFSPFIHTQKRNPATNLKDPDMFWDFTILRPETHQVSFLFS DRGTPDGYRHMNGYGSHTFKMVNKNKAVYCKFHFKTDQGIKNLMADRADNLSGSDPDYAQRDLYN AIAEGNFPTWTLYVQVMTFEEAEKFRWNPFDLTKVWPHSEFPLIPVGRMVLNRNPKNYFSEVEQIA FSP IHMVPGIEASPDKMLQGRLYSYSDTHRRLGNSYLQLPVNC PFNNRVKNYQRDGPQCVDNQA GAPNYYPNSFSGPVDNTKNLECPCVISGDVQRyntADDDNFSQVTLFYNQVLKPEERARLIENIAG HLKDAQDFIQORAVSNFSQVDADFGNRLRKS LDAFKKQPSNGIHI TRLQAGITRL
GSH	MAPIETKFDLLVIGGGSGGLATARRAAEFVKA AVVEEARWGGTCVNVGCVPKKVMFNTAMHAEML HDHKDYGFQVQLNKFDWGHIKKRRDDYIKRLNGIYETNLEKSKVEKITGHAQFTEDKDIEVAGQKY SAKHIVIATGGRPSMSDIPGAEYGITSDGFFELETLPKKVVVVGAGYIAVELAGIFNALGADTSIL IRFDEVLRTFDKVISSNVTANMEQAGVKVLRKTQVQKVEKSGDKLTVTTNTGSSISDVECLLFAIG RVPNTDSLNLAHMGIQTDPKGQIIVDKYQNTNVPNIYALGDVCGKALLTPVAIAAGRKLAHRI FKA EKEAHLCYENIPTVIFSHPPVGTIGMSQCEAEKEFGKDKVKIYESTFTPMYAVTETKYKQCMKLV CQLPTEKVVGLHMVGQGCDEMLQGFSAIVMGATKQQFDSCVAIHPTSSEELVTLR
GPx	MIRLKDVPGSALALLVTVLLHVHLASGAGRKTLCFQSDNSEQSIYDFTLMDVHKERMVNLSSYANQ VLLVNVAGF

Figure 59: Séquences protéiques de biomarqueurs du stress oxydant (*L. littorea*)

SOD	MLSASCITLARCVPKSGMLGMTMAARLTHSLPDLPYDYNALPEYISADIMKLHHDKHHKTYVTNLNIAEE KLSEAVAKNDVNTFISLQPAKLFNGGGHINHSIFWEVLS PNGGGEPSGDLMIDI KRDFGSFDDMKKELS GAAVGIQGSWGLGFNPNVSGRLRVSVCANQDPLEATTGLIPLFGIDVWEHAYYLQYKNVRPDYVQAI F NIANWKNVADR LAEAKIAS
CAT	MGSRDRAAEQMNFEFKQQTNPEVMTTGTGAPIGSKTSTLTVGPRGPALLQDFVFTDMAHFNRERI PER VVHAKGSGAFGYFEVTHDITKYCKAKIFEKVGKRTPCAVRFSTVGGEEKSADTARDPRGFAMKFYTEEG NWDLVGNNTPIFFIRDPILFSPFIHTQKRNPATNLKDDAMFWDFTILRPETSHQVSFLFSDRGTPDGYR HMNGYGSHTFKLINNKNEGIYCKFHFKTDQGIKNFFGDKAGELAGTDPDYAQRDLNAINARDGNFPWSV KVQIMTYDQAEKFRWNPFDLTKIWPQSEFPLHPVGMVLRNPKNYFAEVEQIAFS PAHMPVPGIEASPD KMLQGRFLFSYSDTHRRLGNSYLQIPVNC PYNTKIRNYQRDGPQCVDNQGNA PNYFPNSFNGPLDNPK QLECPFKISGDCQRYNTADDDNFSQVGTFWRKVLKPEERTRLIENMAGHLKDAQEFIQKRAVENYSKAD ADYGKRLQEALSTY
GST	MPAYRLHYFDVGRGEVARLMFNAAGQKFDVRYTKETWPAFKPKTPFGQLPVLEV D GKLYGQSGAIFN YLAKELGFYKGNLEALKVDVVIGLVNDFVPLMIKVFFIEQDEAKKLEKELLEDATKFFTNFEKVL KENGSTGYFVGKELTMADIVVYDLADNLI THNAAIVDPYPLKANRQKVESNKGIAAYLKSrk
GSH	MPPVSKKFDLIVIGGGSGGLASARRAAEFVKA AVVEEGRWGGTCVNVGCVPKKIMFNTAMHAEMLPNY RDYGFVEMKFNWSHIKSSRDAYIKRLNGIYDSNLDKSKVEKILGHATLTKDKSVQVGNNTYSADHIL IATGGRPIFPDIPGAEHGISSDGFEELEDLPKKTIVVGAGYIAVELAAIFASLGSETSIFIRHDEVLRT FDTCISRTVTENLENGGVKVRQNTNVKVFQKEANGKLTITTVAGDVHKDVECLLWAI GRIPNTDNLGLE NVGVALDKKNIQVDEYQNTTADKIYALGDVCGKALLTPVAIAAGRRLSHRVFNKESNLKLDYDNIPTV IFSHPPGTIGL TEAEAEKKYKDKLKVYTSNFTPMYFAVTQHKEKCLMKLICVLP EEKVVGLHMVGQ GCDEMLQGFSAIKMGATKKQFDDTVAIHPTSSEELV TMR
GPx	MHVKYAESHGLRLIGFPCNQFGGQEPGTDEEIKKFATGKYGVQFDMFSKINVNGDDAHPFKYLNKNEQK GFFGNFIKWNFSKFLVDKAGKPVKRYAPNVEPNSIEKDMLEYFEK

Figure 60: Séquences protéiques de biomarqueurs antioxydants (*P. vulgata*)

III.3.2 Les séquences de biomarqueurs apoptotiques intrinsèques

Les séquences protéiques complètes des principaux biomarqueurs apoptotiques intrinsèques réagissant au stress oxydant, ont été caractérisés chez *L. littorea* et *P. vulgata*. Elles sont présentées dans les figures suivantes.

Caspase	MDGARKLDHGWTEAMKASVTKNRRKLI DTLAGSVARVMDLLVEGGVFPD TDDIMNNTTLD TAKKR ARRLLDDVRKR PASDYWTLVLSLYDDQSALGHMAEVVLGTYMDKGGAI SNADVKKRQDYRENQR MGGQPFSSPQPSATQRQQQH QP TSVQPHPQSSSHRQHGGQAVLPLPTPVQEVQMPPAIQRQMEFEI PVG TALPEVQHLYIQSPSHHGCRLSEDNQLLTV DSE SQATGGARSHEP METDTERPISQGHGGAR PKVRTPANSGDATAQPAMTKYQKRRRKY PDRVYHMESNPRGIAFIIDNEEF LYLNKREGTQDDCR ALEDLLRNILLFKVCPVEKNLTGQEMKQKLLKFSQDQRLGEVDSCVVI ILSHGSNDDIIFGKDGQ LDRNGVPVEKTYIRVSDLRKLFCTSGCAALS GKP KLFIFQACRGVNEDTSLGHLPAASRARLDVA VETHQQRNQSDFS DMYFLYATVAD FVAYRGTFIPTLVEVFKQHSMDMHVKDMVTELHGKMSQSP L FIERGDLKKFSTPEERGHLSKQWFLNPPQRPAS
BAX	MASKVKQPSAFFPTDEERKTQKDHLNTDDVANQGRLLNGFIHDMVRDGIINAPVVS DLQEPGT PGGPPMHHSREIARALRCIGDELDRDQKQLQELVKKVPP EAERKTFYNVASQIFSDGVFNWGRVVA LFYFAYKVCVKALDRVPLIRAIINLIVDIIRDKLAQWIIDRGGWEAIREYFGATLQQALAFVTGAG MAVAAGIYFYNKS
Cytochrome C	MADVDPGNPEKGKLVQRCACHTVEAGGKHKVGNLNLGFRKGTGQQPGFSYTDANKSKGITW GKDTLFEYLENPKKYIPGTKMIFAGLKKKNERADLIAYLEAATKA
P53	EAKSWGLWWDCKFVNGSFQMCVQTDWLFACGALVLI GLICMLVASI LGGIGLCTHKRLLYVAAGA ISIFSIVLQIICLI IY PVKFTTEEVKDDKHNR AETQRFDL DWTYGVAWGAVCFMIGAAI LFLIKVE TQEV TQQKDNTPPYYLNYTRA

Figure 61: Séquences protéiques des biomarqueurs apoptotiques intrinsèques (*L. littorea*)

Caspase	MAASYNMNHQRGKAVVINNVNFA PRARLRRRDGS RQDYDSMSKMRGLRFEVEAHEDK GKDEILKI FEKVA KEDHSNADCLLVSLMSHGGE EICGNDYNYQGTGLLTLNDIT EFPKGDRCPTLVGKPKIFILNACRGDEID LGVEEYDQTD SHQSLPALPKIHKIPFDADIFVCFSCSQGYSTLRDPFSGSYFVQDLCSVLKEYGEKHLHSEL VLKVKEMVAARQIRVQGSADAEMQMPVLDLTLRKL VYFDKPN TSVRPPQSEEIYRLIRQFDNL SK
BAX	MPSQVQEKIRPAYADDWNNQNMEVNKALS RDVSNQARLLLNKFIKERMEQDMIQD SP SLDLIEPGTPVGP PMDHAREVGRALRCIGDEL DDKDERMLNLIARVPPEAEHKTFLNVASEIFKDG VVNWGRIVALFYFAYKICLK ALDRIP LIRAMINLVVDFIRDHVAGWII GRGGWEAIVEYFGTPTKQVAVILGAGVLVSGIVMLWKGWH
Cytochrome C	MPEVPDGDVEKGGKIFIQRCAQCHTVEKNGKHTGPNLNLIGRKTGQAPGFTYTAANQAKGITW GKDTLFE YLENPKKYIPGTKMVFAGLKKPQERGH LIAYLIDSTK-
P53	VAPLSLLNPLIAQTTTAGMSPDSQTN IIGSTASSPYTDSITSPQYSPHGNITSPVPTVPSNTNYAGDYGFE ISFTQPSKETKSTTWTYSELLKLYVRMATTCPVRFKTLRSPQGCVIKAMPIFMKPEHVQEVVKRCPNHAT SKEHNEHHPATHLVRCEHKLAKYVEDSYTSRQSVIIPHEIQAGSEWVNLNFQFMCLGSCVGGPNRRPIQI VFSLEKDS TVLGRRAVEVRICACPRDRKAD EKTAMPKPMNKMAAHKMTLGTEITSIGPGKKRRI GDDE VFTLTVRGRENIEILCKLRDSLELSAMVPATQVETYKQHQVEIQRQVTQTRMVSI PN RDGALTPQNGETROG SLPFNTDANHV TSSQLNQEVQLSGENVLVKEEPA GRNGILTLSDNSVAGWLSQLGLSAYIDNFQQKGLNHM FQLDEFTLDDLENMKIGTSHRNKIWKALVEFHQSQGLLSGTSQSLQRDASNASTVSLG SQASISQNSTYCPG YYEVTRYTFKHTISVNDETTSSKKAKLD-
BCL2	MNGEMSRHIVEDYVSYRLSKNGYRWINGPVI EGGPSKICSTMRS LGDEFEDRYRNQFDDMVNQLDITPDIAY QTFKAVVNE LFDIGVNWGRIVALFAFGG SICVQCV EKNMPPVVDNIVDWVATYCDNLDLRQWINSHNSWQGFV AFYEKEPARRNENPWSFRKICGYAAGALGVLT LGAILTQKS
BAG domain-like	MLNILFLSFQYYGSQPTTYPNQSYPHSYGGGQFERAGGVEIPV IHESPYPKHQHSSGRVPTSQGLGVHNM TNTTRSASPSFREIPIQHVRQACDKGARSSPISHNIQFERRDPGSRGSPIPQGFQFERQDRGSQNSPVP MFD RQERGSRHSPVPHNIQDLGSRSPVPNYERPMQSGSHPGAPRSDSSLPKVPIPIVHETS NQE QPKTYQSEPK PAEQTPQRDERQRSESM DAAESDPEPPRQPPKPKTAEERANEIESVTAEVNELEQQVNQFTGQKSDKSYK YLEEMLTRSLIKLDGVEAEGHDDIRTRRKTQTVRYIQQTLDMLEL KASSNEFPQQLESVTTASNP SQDCDKKN KTNNRDQDVKEMVL DSEVSC

Figure 62: Séquences protéiques des biomarqueurs apoptotiques intrinsèques (*P. vulgata*)

L'obtention de ces différentes séquences codantes pour les deux modèles appréhendés nous permet maintenant d'entrevoir une approche d'expression génique par qPCR comme perspective de ce travail de thèse.

IV. Discussion

IV.1 Etude de la toxicité aiguë comparative entre l'aluminium et le plomb

Une combinaison des courbes dose-réponse (figure 63) ainsi qu'un tableau récapitulatif des valeurs toxicologiques de références obtenues (tableau 28), ont été réalisés ci-dessous afin de mieux visualiser les sensibilités des deux modèles au métaux utilisés (aluminium et plomb)

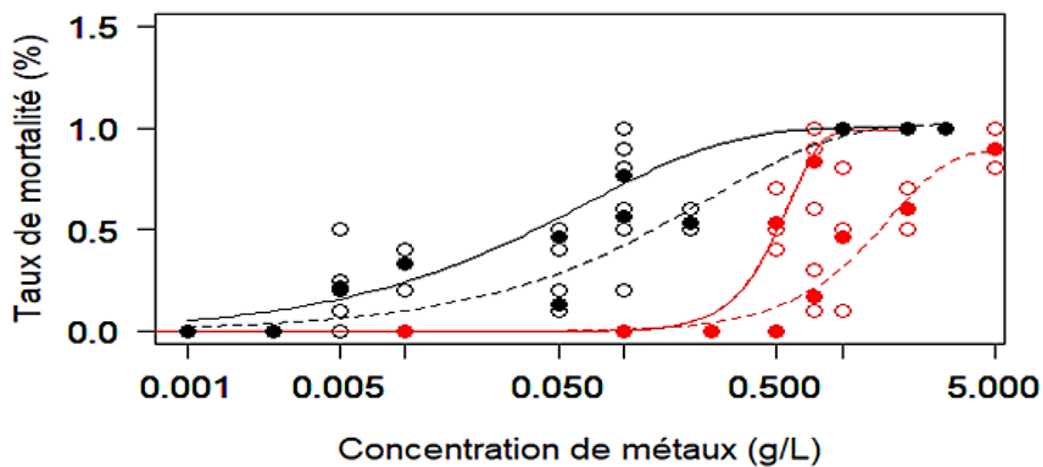


Figure 63: Modélisation combinée des courbes dose/réponse pour l'aluminium (ligne discontinue) et le plomb (ligne continue) pour *P. vulgata* (en noir) et *L. littorea* (en rouge)

Tableau 28: Tableau récapitulatif des valeurs toxicologiques de référence

Espèce	LOEC	LC10 (g/L)	LC30 (g/L)	LC50 (g/L)	Métal
<i>L. littorea</i>	$7,5 \cdot 10^{-1}$	$0,303 \pm 0,012$	$0,427 \pm 0,014$	$0,513 \pm 0,016$	Aluminium
	$5 \cdot 10^{-1}$	$0,268 \pm 0,0305$	$0,405 \pm 0,0248$	$0,507 \pm 0,0270$	Plomb
<i>P. vulgata</i>	$5 \cdot 10^{-3}$	$0,0103 \pm 0,009$	$0,065 \pm 0,022$	$0,143 \pm 0,045$	Aluminium
	$5 \cdot 10^{-3}$	$0,0022 \pm 0,0002$	$0,0141 \pm 0,007$	$0,0390 \pm 0,012$	Plomb

L'établissement des courbes dose-réponse lors d'intoxications aiguës (96h), en conditions contrôlées, ont montré que, pour les deux espèces étudiées, les valeurs toxicologiques de référence (LOEC, LC10, LC30 et LC50) (tableau 28) pour le plomb étaient largement inférieures à celles enregistrées pour l'aluminium. Shuhaimi-Othman et al., (2012) ont fait la même constatation suite à des contaminations aiguës de l'espèce de gastéropode d'eau douce *Melanoides tuberculata*, à l'aluminium, le cadmium et le cuivre avec une LC50 de l'aluminium largement supérieure à celles des deux autres métaux. La moindre toxicité de

l'aluminium pourrait être liée à la faible disponibilité des ions Al^{3+} , cité précédemment comme la forme toxique du métal. En effet, comme il a été évoqué au début de ce chapitre, l'ion Al^{3+} interagit rapidement avec l'eau pour former un précipité colloïdal $Al(OH)_3$ (gibbsite), diminuant ainsi la quantité réellement disponible pour les gastéropodes étudiés. Ceci a également été signalé par Quiroz-Vázquez et al. (2010) en étudiant la biodisponibilité et la toxicité de l'aluminium sur *Chlamydomonas gigantea* et *Daphnia pulex*. De même, Elangovan et al., (1997) ont montré que l'insolubilité de l'Al dans l'eau à pH neutre est effectivement très forte et conditionnant sa biodisponibilité pour *Lymnea stagnalis* (gastéropode dulcicole, Lymnaeidae). Desouky, (2012) ont aussi observé qu'au bout de 24h, uniquement 15.4 à 26.2% de la dose administrée dans l'aquarium restait disponible dans la colonne d'eau, contre 81.1 à 82.7% pour le cadmium. Truscott et al. (1995) ont montré que ce métal induit une hyperactivité chez le gastéropode *Lymnaea stagnalis* qui s'est rétabli au bout d'un an pour redevenir à des niveaux physiologiques normaux comparés au contrôle. En parallèle, (Campbel, 1995) ont révélé que l'aluminium perturbe le fonctionnement neuronal de ce même gastéropode. L'aluminium a aussi montré des effets sur le système respiratoire des gastéropodes mais aussi des poissons en s'accumulant sur leur épithélium branchial (Peuranen et al., 1993), pouvant ainsi inhiber l'activité des protéines transmembranaires de l'osmorégulation (Rosseland et al., 1990). D'autres études ont montré que les gastéropodes peuvent diminuer les effets de l'aluminium en le séquestrant sous forme de granules et en induisant la production de métallothionéines (Brooks et White, 1995).

IV.2 Etude de la toxicité aigüe comparative entre les deux modèles

En comparant entre les deux modèles, on remarque que les valeurs toxicologiques de référence (LOEC, LC10, LC30 et LC50) des patelles sont inférieures à celles enregistrées pour les littorines que cela soit pour l'aluminium ou pour le plomb (tableau 28). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces différences. Tout d'abord, il est possible que les littorines aient un mécanisme d'efflux ou de détoxification plus efficace que les patelles. De plus, Il a aussi été démontré que *L. littorea* possède une capacité de minéralisation (séquestration) intracellulaire des métaux sous forme de granules (Mason et Nott, 1981). Chez le gastéropode d'eau douce, *Lymnea stagnalis*, une corrélation positive entre le nombre de granules formés et le taux d'accumulation métallique a été par exemple démontrée (Gibson, 1970; Checa et Jiménez-Jiménez, 1998; Yap et Cheng, 2009). Une autre hypothèse sur la présence de l'opercule seulement chez les littorines. L'opercule est une membrane calcaire obturant l'ouverture de la coquille et qui a pour rôles majeurs la protection de l'animal contre la

dessiccation à marée basse et contre la prédation. Tandis que la patelle, dépourvue d'opercule, limite la déperdition de son eau corporelle et se protège de la prédation en se fixant hermétiquement, grâce à son pied qui agit comme une ventouse, aux rochers. Nous supposons que l'opercule aurait aussi un rôle de protection physique contre les polluants. Pour répondre à notre hypothèse, nous avons analysé des données de dosage métallique mises à notre disposition par des collègues du laboratoire LIENSs (La rochelle) dans les tissus mous de *P. vulgata* et de différentes espèces de littorines collectés sur le littoral française (région Nouvelle Aquitaine). Les résultats sont présentés dans les figures 64 et 65. Nous remarquons que les patelles sont significativement les plus chargées en métaux. Notre hypothèse a été également soutenue par les résultats de Yap and Cheng, (2009) sur le gastéropode *Nerita lineata* lesquels ont montré que l'opercule était le 2^{ème} organe à accumuler le plus de métaux après la coquille. Ces auteurs ont lié le fait qu'il y ait une corrélation entre les concentrations métalliques dans la coquille et dans l'opercule. Ils ont même proposé l'opercule comme organe complémentaire aux tissus mous pour le dosage des métaux.

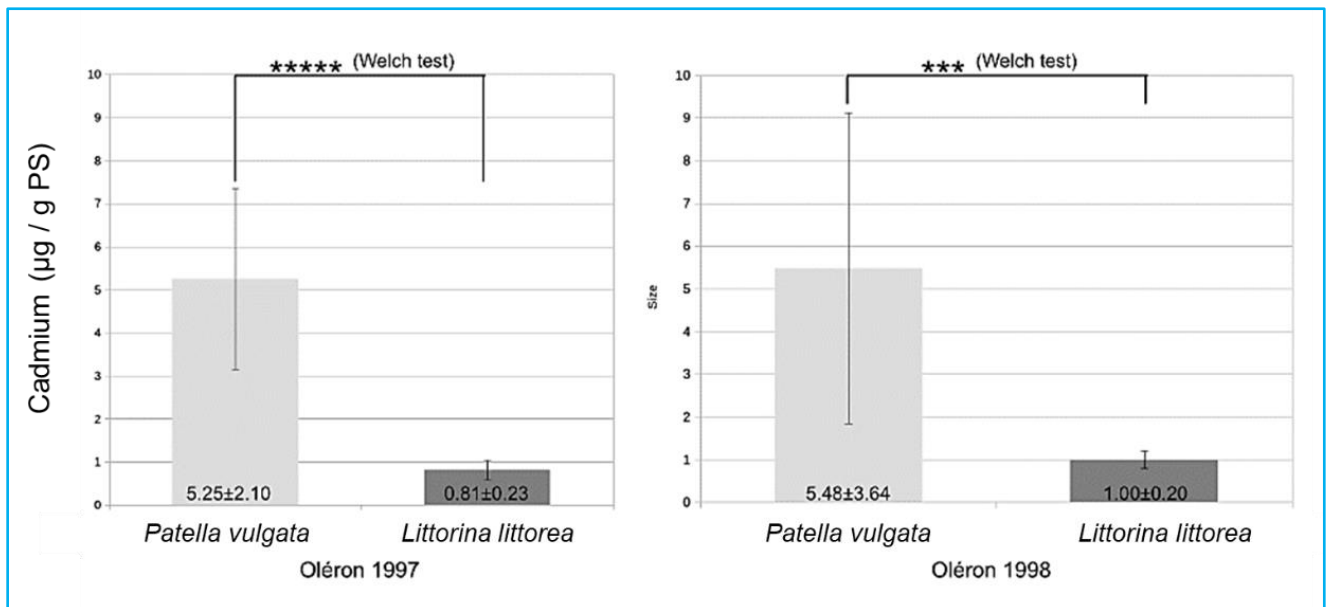


Figure 64: Comparaison entre la concentration en Cd chez *L. littorea* et *P. vulgata* prélevées sur le même site à deux années différentes

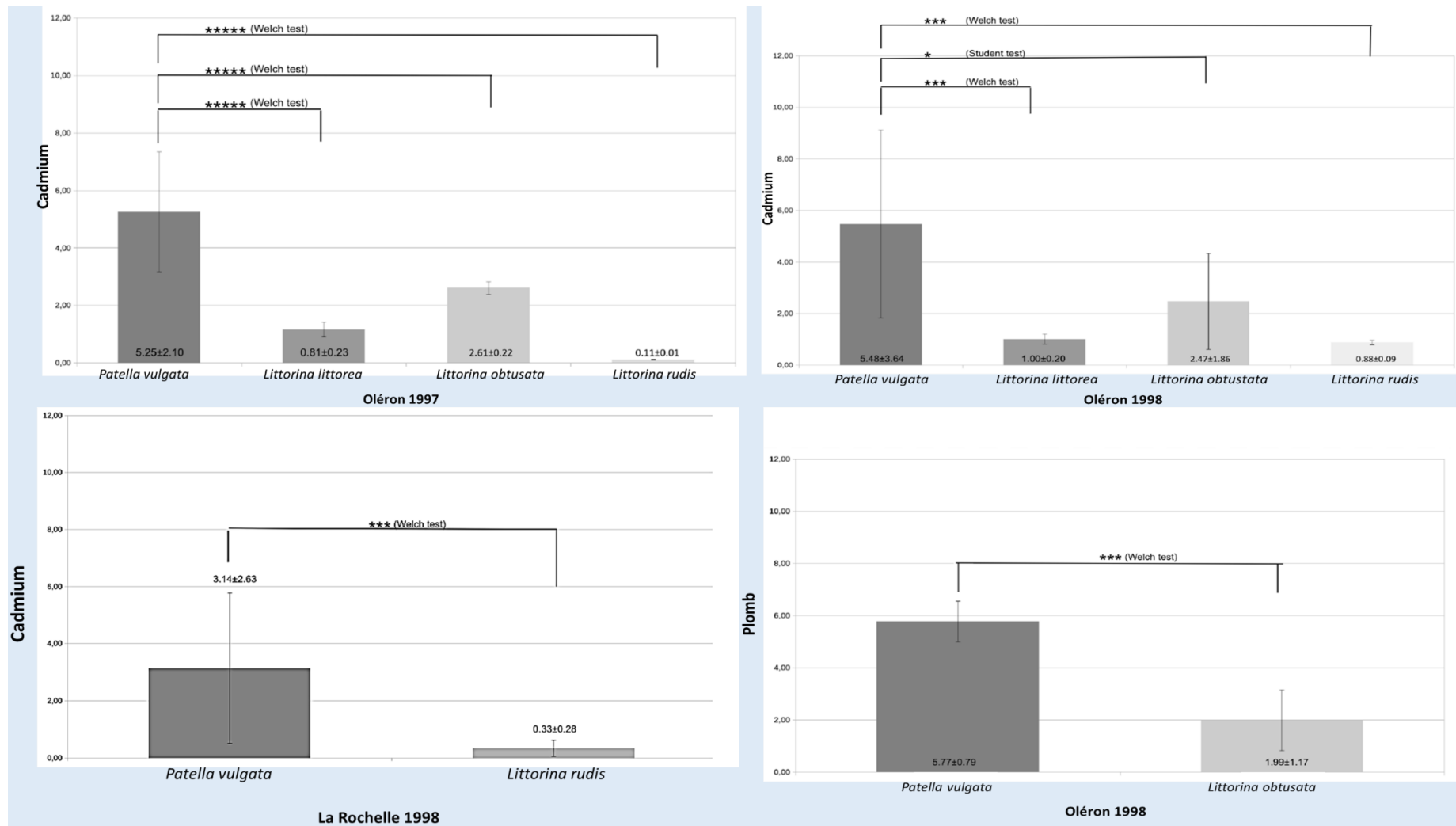


Figure 65 : comparaison entre les concentrations métalliques (µg/g PS) chez *P. vulgata* et différentes espèces de littorines

IV.3 Dosage des biomarqueurs enzymatiques

Nos résultats des dosages des réponses enzymatiques antioxydantes chez les différents groupes d'individus (contrôle, exposés à LC30 aluminium ou LC30 plomb) après 96h de la manip de toxicité, ont montré que la CAT était significativement différente chez les individus traités comparés aux témoins. Ceci est en accord avec les observations faites par (Belhaouari et al., 2014) qui ont observé une augmentation significative de l'activité de la CAT du gastéropode *Osilinus turbinatus* exposé pendant 96 heures à des doses inférieures à celles de la LC50. Prakash et Rao, (1995) ont également signalé une augmentation de la CAT suite à l'exposition du bivalve *Perna viridis* à l'aluminium, au plomb et au cadmium.

Les résultats des dosages de l'activité de la SOD ne révèlent pas de différence significative entre les trois groupes d'individus. Cela est opposé aux observations réalisées par Prakash et Rao, (1995) qui ont montré une augmentation de l'activité de la SOD chez *Perna viridis* exposé à un 1/10^{ème} de sa LC50 en aluminium ainsi qu'en cadmium. Ils ont plus précisément montré une augmentation de l'activité de la SOD après un jour d'exposition, puis une diminution de cette activité après 7 jours.

Concernant la réponse de la GPx, elle n'était pas observée ni chez les lots d'individus traités ni chez les contrôles. Ces résultats sont en opposition avec les données de la littérature puisque Radwan et al., (2009) ont indiqué une augmentation de l'activité de la GPx chez le gastéropode *Theba pisana* exposé à 40% et 80% de sa LC50 en cuivre.

Cependant, on a enregistré une réponse en MDA significativement différente chez les individus exposés à l'aluminium comparés aux contrôles et ceux exposés au plomb.

L'absence de différences significatives parfois au niveau des réponses des enzymes antioxydantes pourrait être expliqué par le caractère biphasique de la réponse de ces enzymes, tel que l'ont illustré Li et al., (2009). En effet, ces auteurs ont effectué des expositions du gastéropode marin *Onchidium struma* à plusieurs concentrations de cuivre inférieures à la LC50 pendant une semaine. Ils ont par la suite noté une diminution de l'activité de la SOD et de la CAT avec l'augmentation de la concentration d'exposition au métal. Radwan et al., (2009), ont également observé ce phénomène suite à l'exposition du gastéropode *Theba pisana* à des concentrations de plomb correspondantes à 40% et 80% de sa LC50 à 48h. Suite aux expériences de contamination, une réponse biphasique concernant la GPx a été observée avec une différence significative au niveau de la réponse des organismes exposés à 40% de la LC50. Les auteurs ont reproduit la même expérience avec le cuivre et ils ont observé le même phénomène. Ainsi, la réponse biphasique des enzymes serait modulée par la dose d'exposition

et elle peut être considérée comme une adaptation à l'augmentation de l'activité de détoxification (Radwan et al., 2009).

Cette réponse biphasique et la plasticité de variation des niveaux des réponses antioxydantes en fonction de l'évolution du stress appliqués a été schématisée par Dagnino et al., (2007) par la figure ci-dessous. Ainsi l'absence de différence significative au niveau de la CAT pourrait refléter une phase d'adaptation au stress ou encore d'activation des enzymes comme le montre la figure.

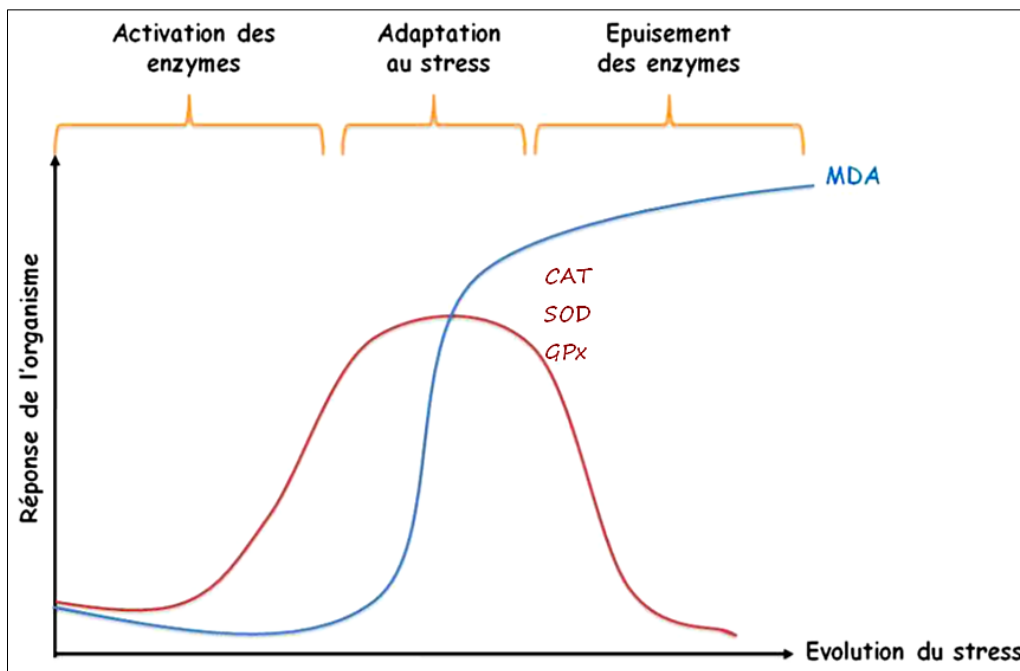


Figure 66: Profil des réponses antioxydantes en fonction d'un gradient croissant de stress (d'après Dagnino et al., (2007))

V. Perspectives

Les expériences de contaminations expérimentales menées sur les gastéropodes de type *Patella vulgata* et *Littorina littorea* à l'aluminium ou au plomb, nous ont permis de mettre en évidence à la fois la sensibilité différentielle des deux espèces et les niveaux de réponses biochimiques de réponses au stress oxydant induit par les métaux. Ces travaux complétés par une caractérisation des séquences d'ADNc de multiple biomarqueurs antioxydants (CAT, GPx, GSH, SOD) et apoptotiques (BAG, BAX, BCL2, caspase, cytochrome C, P53) nous permettent d'ores et déjà d'entrevoir / une estimation de l'expression génique lors de contamination aigüe

(96h, LC30) aux deux métaux afin de comparer les niveaux de réponses précoces nucléiques et protéiques pour les deux espèces ; 2/ d'évaluer les niveaux d'activation du mécanisme apoptotique intrinsèque chez nos deux espèces ce qui constituera une approche très innovante puisque ce mécanisme n'a pas encore été abordé sur nos modèles. Effectuer une comparaison entre les niveaux nucléiques et protéiques semble effectivement être intéressant car comme le montre Al Kaddissi et al., (2014), chez l'écrevisse, lors d'intoxication aiguës (96h), les biomarqueurs géniques sont plus sensibles que les biomarqueurs enzymatiques. D'autres auteurs ont montré quant à eux que les mécanismes antioxydant et anti apoptotique sont interreliés lors des réponses aux stress (Kannan et Jain, 2000).

Il serait également intéressant de tester des doses d'exposition inférieures à la LC30 (LC10 ou LC20) afin de pouvoir mettre en évidence la réponse biphasique des réponses enzymatiques et de se rapprocher de concentrations métalliques mesurées dans l'environnement. Il serait également intéressant d'effectuer des intoxications chronique (7 jours, 15 jours, 30 jours) pour refléter le côté cumulatif (bioaccumulation) s'exprimant dans le milieu.

Enfin une analyse de génotoxicité par le test « comète » permettra d'évaluer l'attente de l'intégrité du support génétique lors de contaminations. Une estimation du taux de méthylation pourrait également représenter une approche très innovante pour percevoir les changements épigénétiques rapides suite à des contaminations métalliques.

Discussion générale

Discussion générale

Facteurs affectant la diversité génétique

Les gastéropodes marins du genre *Patella* sont connus pour leur grande plasticité phénotypique en lien avec leur capacité à s'adapter aux fluctuations des conditions environnementales (vitesse du vent, force des vagues, pH, dessiccation...). Cette variabilité morphologique rend parfois difficile l'identification des espèces (Fischer-Piette et Gaillard, 1959). Les deux espèces de patelles étudiées au cours de ce travail de doctorat, *Patella caerulea* (patelle méditerranéenne) et *Patella vulgata* (patelle d'Atlantique), ne font pas exception à cette ambiguïté taxonomique ; notamment par la définition de multiples variétés n'ayant aucune validité taxonomique (Christiaens, 1973). Il semble qu'il en soit de même pour la littorine, *Littorina littorea*, dont la couleur et la forme de la coquille sont influencées par les éléments prélevés dans le milieu (Eschweiler et al., 2009). De ce fait, il nous a été nécessaire au cours de cette thèse de vérifier l'identité de chaque individu utilisé afin de s'assurer que nous n'analysions pas différentes espèces par erreur. De plus, nous avons pu caractériser par l'analyse génétique les réseaux d'interconnexions afin de comprendre les flux de gènes entre les populations de nos trois espèces, et de s'assurer de l'homogénéité génétique de nos modèles le long de leurs aires de répartition afin de pouvoir extrapoler nos résultats expérimentaux à l'ensemble des individus des diverses espèces.

Nos résultats d'analyse de diversité génétique ont tout d'abord permis de constater pour les trois espèces un fort brassage génétique entre les populations de chaque modèle ; que cela soit pour l'espèce méditerranéenne (*P. caerulea*) ou bien pour les espèces atlantiques (*P. vulgata* et *L. littorea*). De plus, le test de neutralité de Fu et Li (1993) a montré que les individus de *P. vulgata* et *L. littorina* sont issus d'une récente expansion géographique qui aurait eu lieu après un effet de goulot d'étranglement survenu pendant la dernière glaciation. Des populations nordiques (Nord de l'Irlande, Norvège...) auraient ainsi été isolées pendant toute la période glaciaire et aurait subi une forte pression de sélection, pendant que d'autres populations localisées plus au Sud (France, Espagne...) seraient restées dans des zones de refuge plus clémentes permettant un maintien du polymorphisme génétique (Jenkins et al. 2018). Certains travaux ont montré qu'effectivement les changements climatiques influent sur la structuration et la biogéographie des populations d'invertébrés intertidaux avec une extension de l'aire de répartition lors de l'élévation de la température de l'eau de surface (Mieszkowska et al., 2005; Lima et al., 2006). Dans leur méta-analyse portant sur ce sujet, Helmuth et al. (2006) ont montré

que les bords polaires de l'aire de répartition des espèces intertidales se sont déplacés en moyenne de 50 km par décennie. Ces événements expliqueraient ainsi la répartition clinale Nord-Sud observée pour les deux espèces de l'Atlantique avec une moindre variabilité des populations nordiques (figure 27 et 34, tableaux 8 et 11). Le flux de gènes entre les populations de proche en proche pourrait être aussi expliqué par l'action des courants qui véhiculeraient les stades larvaires planctoniques des gastéropodes le long des côtes Atlantique.

En ce qui concerne *P. caerulea*, la morphologie et l'hydrodynamisme du bassin méditerranéen seraient aussi responsable du fort brassage génétique entre populations (figure 67).

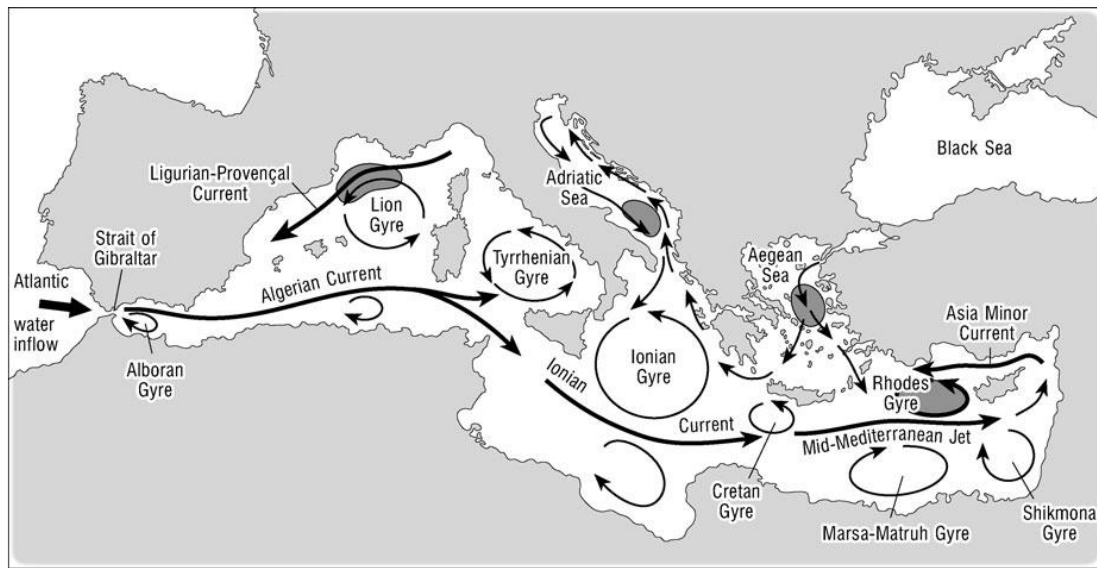


Figure 67: Carte simplifiée des courants au sein du bassin méditerranéen

Il peut exister également d'autres mécanismes qui pourraient affecter la dispersion des larves. Récemment, le *rafting* a été supposé possible pour les gastéropodes (Thiel et Gutow, 2005). Il a été démontré que des gastéropodes peuvent trouver refuge sur une grande variété d'objets flottants (bois, pierre ponce volcanique, macro algues) (Highsmith, 1985; Barnes et Fraser, 2003; Johannesson, 2003). Des phénomènes de rafting transatlantiques ont ainsi été mis en évidence pour certains gastéropodes (des familles Trochidae et Calyptraeidae) (Collin, 2003; Donald et al., 2005). Certains travaux ont suggéré également une dispersion de type zoochorie utilisant les oiseaux comme vecteur de déplacement (Figuerola et Green, 2002; Green et al., 2008). Enfin, le comportement des larves lors de la sédentarisation, pour accepter ou rejeter un substrat, ainsi que la disponibilité des habitats favorables influencent en partie la dispersion en déterminant les conditions du passage de la vie planctonique à la vie benthique (Bouzaza, 2018). En l'absence de signaux propices à la sédentarisation, les larves compétentes de certaines espèces seront ainsi capables de prolonger leur durée de vie planctonique et d'accroître leur

potentiel de dispersion (Pechenik, 1999). Selon une relation simple (figure 68) : plus la phase larvaire dure longtemps et plus la connectivité entre populations distantes est supposée importante. Ceci implique ainsi que l'homogénéisation entre populations est supposée être en relation avec la durée de cette phase larvaire (Siegel et al., 2003).

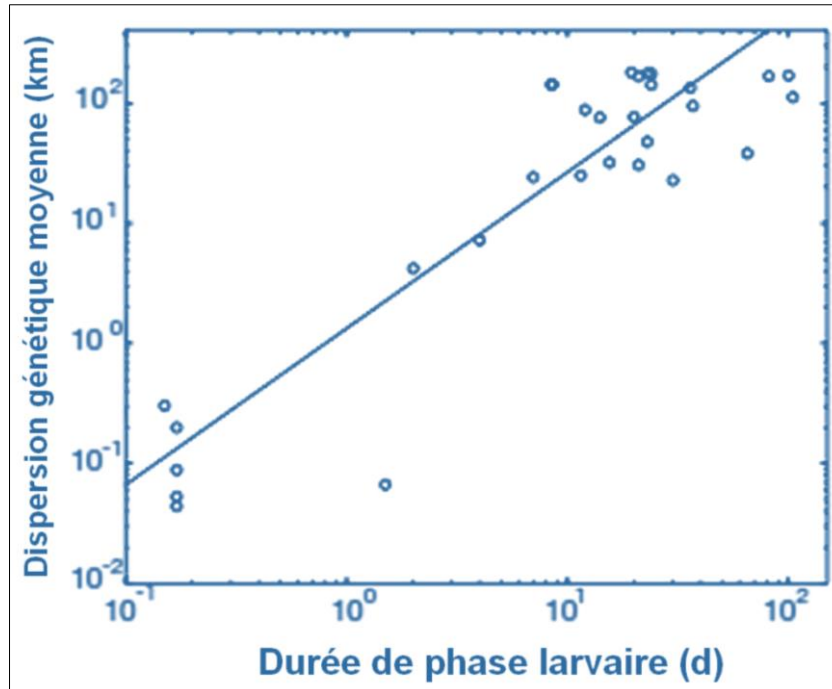


Figure 68: Relation entre la durée de phase larvaire et la dispersion moyenne estimée sur la base des distances génétiques, pour 32 espèces marines dont 12 Gastéropodes (d'après Siegel et al., (2003)).

Evaluation de l'impact des métaux en milieu marin par le biais de l'étude de *Patella caerulea*, modèle bioindicateur : de la biodisponibilité environnementale à la biodisponibilité écotoxicologique

Les patelles représentent les herbivores brouteurs les plus abondants des côtes rocheuses tempérées (Reguera et al., 2018; Palladino et al., 2021). Elles sont en contact direct avec les polluants présents dans la colonne d'eau (à marée haute) et sur les sédiments rocheux ou intégré dans la biomasse algales (à marée basse). Elles accumulent donc continuellement des polluants, dont des métaux trace, à travers les trois voies : cutanée, respiratoire et ingestion (Hung et al., 2001; Belkhodja et al., 2012; Zaidi et al., 2022). Des études en Méditerranée ont porté sur l'usage de cette espèce comme « sentinelle » ou bioindicatrice des effets des PCB (Yawetz et al., 1992), des HAP (Bonacci et al., 2007) et des xénoœstrogènes (De Lisa et al., 2013).

Les deux seules études qui ont porté sur l'usage de *Patella caerulea* en Tunisie sont celles de Belkhodja et al. (2012) et Rabaoui et al. (2013) où l'espèce était utilisée comme bioindicateur quantitatif de l'accumulation des ETM.

Toutefois, aucune évaluation des réponses biochimiques antioxydantes de défense aux stress métallique sur *P. caerulea* n'avait été réalisée avant notre étude pourtant les métaux constituent les polluants les plus ubiquitaires en Méditerranée. Nous avons donc estimé la biodisponibilité environnementale des métaux et l'induction d'effets toxicologiques exprimés par l'activité enzymatique des biomarqueurs antioxydants (CAT, SOD, GPx) et par la peroxydation lipidique (évaluée par le taux de MDA). Quatre sites ont été prospectés : Sidi Raies au Cap Bon (CB), Chebba (C), Gabès (G) et les îles Kerkennah (K). Les résultats de dosage chimiques ont montré des fluctuations inter-stationnelles des concentrations en ETM dans l'eau et dans les tissus des patelles, confirmant ainsi que les niveaux de contamination par les ETM dans les animaux reflètent ceux enregistrés dans l'eau (Rumisha et al., 2017b) et confirmant donc le rôle de *P. caerulea* comme étant bioindicateur d'accumulation des ETM.

Les concentrations fortes des ETM (Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn) chez les patelles ont été enregistrées au niveau du site G. De plus, le cadmium n'a pu être détecté que sur ce site (concentration du Cd dans l'eau : 0,23 µg/L). Cette valeur est du même ordre avec celle trouvée par Ben Salem et Ayadi, (2016) dans le golfe de Gabès (0,21 µg/L). Plusieurs auteurs ont montré l'existence d'une forte corrélation entre l'état de contamination des eaux et les teneurs en métaux trace enregistrées chez des organismes marins au golfe de Gabès (Bejaoui et al., 2004; Ghannem et al., 2014; Drira, 2018). Cette forte pollution métallique à Gabès peut s'expliquer par : 1/ les propriétés hydrographiques du golfe responsables du transport des polluants (Rabaoui et al., 2013) et 2/ les spécificités des rejets domestiques et industriels dans cette zone. En effet, cette région est exploitée industriellement (ex : industrie de l'acide phosphorique). Les rejets de ce secteur d'activités sont de 10 à 12 mille tonnes de phosphogypse rejetés dans la mer par jour contenant des métaux, principalement du Cd, Cu, Cr, Pb et Zn (Bejaoui et al., 2004; Drira, 2018). La zone est également fréquentée par les touristes, ce qui signifie que tous les déchets domestiques des zones urbaines, y compris les stations touristiques, sont acheminés directement dans la mer. Les déchets domestiques seraient également une autre source de pollution par les métaux trace (Wei and Yang, 2010). A la lumière de nos résultats, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un gradient de pollution croissant le long des côtes tunisiennes allant du Nord (CB) vers le Sud (golfe de Gabès).

Notre évaluation des effets de cette pollution identifiée le long des côtes tunisiennes, a montré que les patelles répondaient par une augmentation de l'activité de certains biomarqueurs. Les niveaux d'activité de GPx et SOD par exemple étaient plus élevés dans les sites les plus pollués (G, K), en comparaison avec les sites CB et C (figure 50). Ceci confirme tout d'abord que l'augmentation de la réponse enzymatique de la GPx et SOD est bien liée à la présence des ETM (Regoli and Principato, 1995; Farombi et al., 2007; Batista et al., 2014; Fernández et al., 2010a; Lushchak, 2011; Vidal-Liñán et al., 2014) et d'autre part que les sites actifs de certains isoenzymes nécessitent la présence de métaux catalytiques (Cu, Fe, Mn, Ni, Zn) pour leur activation (Zelko et al., 2002).

En ce qui concerne la CAT, cette enzyme a été faiblement exprimée dans toutes les patelles (tous sites confondus) et sans aucune différence significative. Ceci pourrait être expliqué par la fluctuation de vitesse de réponse des différents biomarqueurs enzymatiques ; certains voyant leurs niveaux de réponses augmentés pendant que d'autres restent inchangés voire diminuent (Espinosa and Rivera-Ingraham, 2016). Certains auteurs ont ainsi démontré la présence de certains mécanismes compensatoires intervenant dans la réponse de CAT ainsi que des interactions complexes entre les pro-oxydants et leurs cibles cellulaires pouvant confondre l'évaluation du stress antioxydant (Cajaraville et al., 1997; Regoli et al., 2002b; Lionetto et al., 2003).

Pour les MDA, nous avons observé une induction de la peroxydation lipidique chez tous les individus tous sites confondus ce qui signifie qu'ils sont exposés à une pollution métallique induisant la peroxydation de leur lipide cellulaires. D'autres travaux ont lié la variation de la sensibilité à la peroxydation lipidique au statut métabolique saisonnier des animaux, lequel serait lié à la gamétogenèse (Gabbott, 1975; Lowe et al., 1982) et à la disponibilité alimentaire (Hawkins et Bayne, 1984).

Pour mieux visualiser les interrelations entre les différents paramètres étudiés et pour évaluer les hypothèses émises, une analyse en composantes principales a été effectuée pour les quatre sites d'étude. Les descripteurs qui forment notre matrice ACP (figure 69) sont les paramètres physico-chimiques (température, pH, salinité), les concentrations en métaux (Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn) dans l'eau (E) et dans le tissu des patelles (I), les réponses du stress oxydant (SOD, CAT, GPX, MDA) ; et les facteurs de bioaccumulation (BAF). Le résultat de l'application du test du bâton brisé à nos données est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 29: Analyse des composantes bio- physico-chimiques des quatre zones étudiées

Vecteurs propres	Valeurs propres	Pourcentage de variance	Pourcentage cumulé	Pourcentage prévu par le modèle du "bâton brisé"
F1	13,63	61,95	61,95	17,99
F2	7,28	33,08	95,03	12,99

Une composante sera significative si elle explique davantage de variance que ne le prévoit le modèle aléatoire du "bâton brisé"

Comme le montre le tableau 29, les axes 1 et 2 représentent à eux seuls 95,03 % de la variance (30,98 % de variance uniquement prévus par le modèle du "bâton brisé"). L'Analyse en composante principale (figure 69) montre ainsi une discrimination de quatre grands groupes autour de l'axe F1 et F2. L'axe F1 et F2 sélectionnent positivement le groupe (G1) qui rassemble les variables suivantes : SOD, GPX, Cu (I), Zn (I), Ni (I), Cd (I), Cd (E), BAF (Ni), BAF (Cu), BAF (Cd) et BAF (Zn) qui sont corrélés positivement avec la salinité. Ce groupe est sélectionné au niveau du Gabès. L'axe F2 sélectionne négativement l'association (G2) et positivement l'axe F1 qui regroupe BAF (Pb), BAF (Fe), Pb (I) et Fe (I). Le troisième groupe (G3) est formé par CAT en relation avec le pH. Ces corrélations sont détectées au Cap Bon. Le quatrième groupe (G4) est composé essentiellement de la température et MDA corrélés avec plusieurs paramètres de l'eau (Ni (E), Zn (E), Cu (E), Fe (E) et Pb (E)). Cette association est sélectionnée uniquement au niveau des sites Kerkennah et Chebba. Pour le groupe 1 qui a le plus de corrélation, représentant du golfe de Gabès, on voit que les expressions de la GPx et de la SOD sont liées surtout à la présence du Cd dans l'eau de surface et dans les individus mais aussi à la présence des autres métaux (Ni, Cu, Zn). On remarque également que la salinité a joué un rôle important sur la biodisponibilité des métaux dans cette région. Ceci est en accord avec les valeurs moyennes de salinité les plus élevées enregistrées dans les sites G ($42,00 \pm 0,01$ psu) et K ($40,00 \pm 0,01$ psu). Ce lien entre salinité et accumulation métallique a été abordé sur les huîtres et a montré qu'il existe une relation inverse entre la salinité et la bioaccumulation du Cd (Frazier, 1979). Pour le groupe 3, qui représente le site CB, les concentrations métalliques dans l'eau étaient les plus faibles des divers sites étudiés, indiquant que ce site est le moins pollué (tableau 18 ; figure 69.B). L'ACP est ainsi en accord avec nos conclusions concernant la forte pression anthropique au golfe de Gabès et sur l'existence d'un gradient de pollution du Nord (CB) au Sud (Figure 69.B).

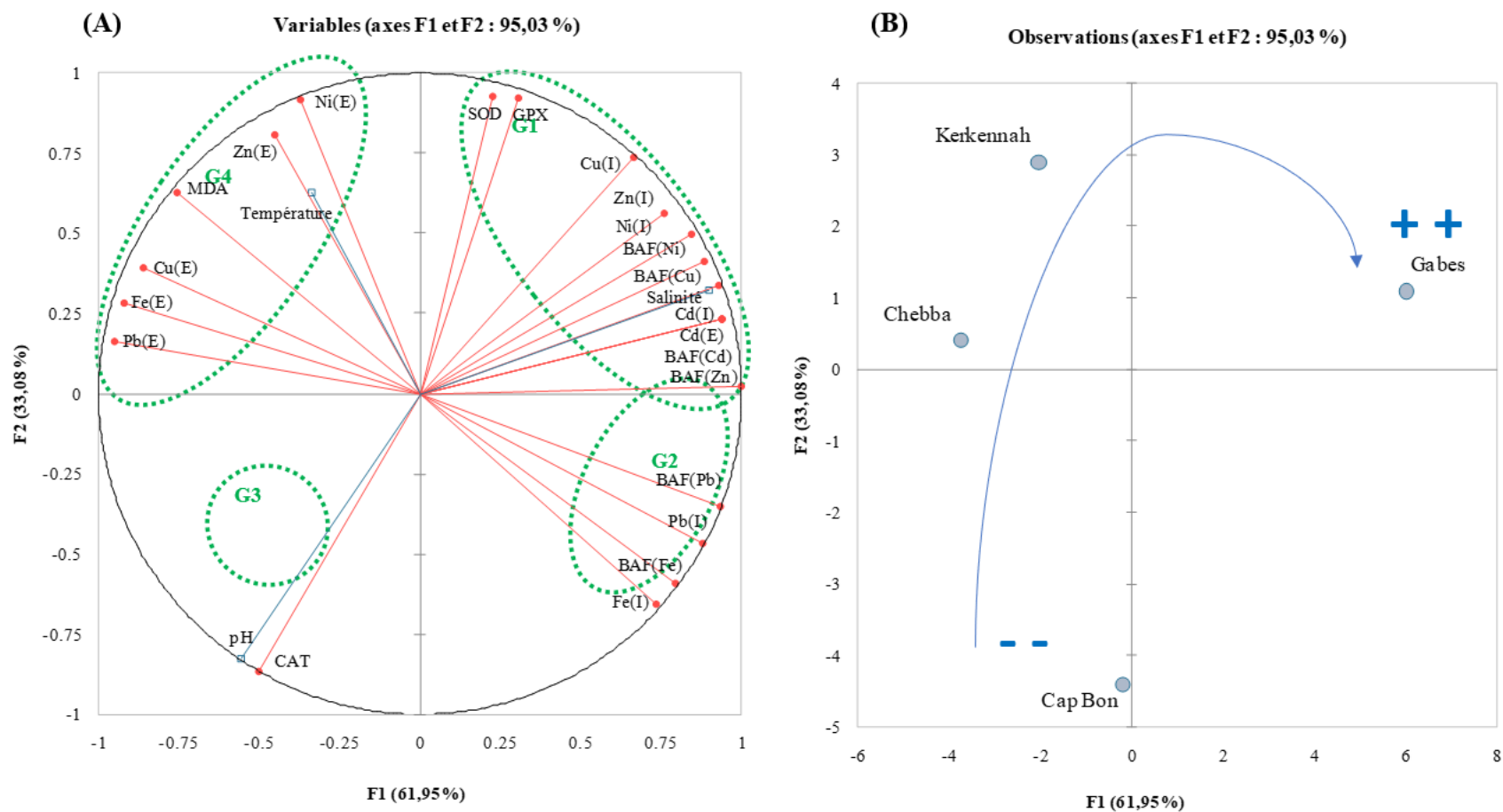


Figure 69: Représentation des descripteurs bio-physico-chimiques (A) et des observations correspondantes (B) dans l'espace des axes F1 et F2.
 (- -) pollution faible, (+ +) forte pollution

Suite à l'ACP, la classification réalisée en dendrogramme sur les concentrations des métaux dans les tissus, les BAF et les réponses antioxydantes, présente deux classes (C) (figure 70). La classe 1 (C1) est composée exclusivement de la zone Cap-Bon et Chebba. Cependant, la classe 2 (C2) caractérise les deux sites les plus pollués Gabès et Kerkennah. Cette classification illustre, encore une fois, donc un net gradient nord-sud de pollution.

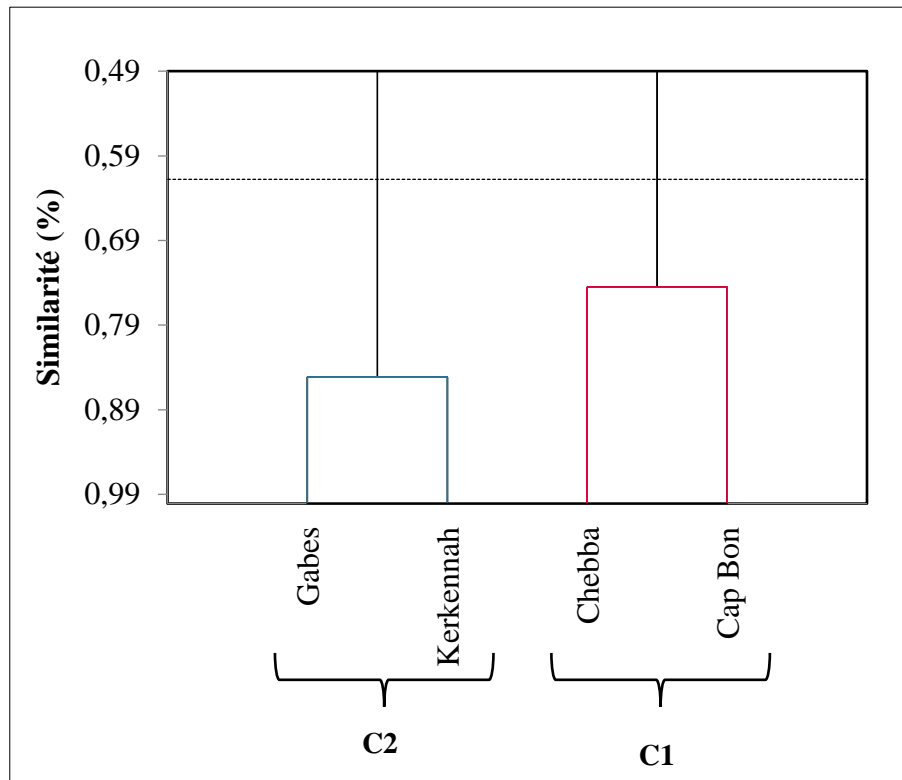


Figure 70 : Analyse hiérarchique montrant les associations entre les différents sites étudiées

En conclusion, les dosages des ETM dans l'eau et la quantification de leur bioaccumulation chez *P. caerulea* ainsi que les réponses du système antioxydant ont montré que cette espèce est également une bioindicateur des effets ou d'altération (« sentinelle ») suite à la présence des ETM dans l'environnement.

Sensibilité comparée entre *Littorina littorea* et *Patella vulgata*

Littorina littorea et *Patella vulgata* constituent les deux espèces de gastéropodes les plus abondantes sur les côtes Atlantiques et les plus utilisés en écotoxicologie (Daguzan, 1975; Davies et Cliffe, 2000; Noventa et al., 2011). Nos résultats de toxicité comparative entre l'aluminium et le plomb sur ces deux modèles montrent que les patelles sont plus sensibles que

les littorines (tableaux 28). Diverses hypothèses ont été formulées pour expliquer cette différence : 1/ une séquestration possible de métaux sous forme de granule chez *L. littorea* (Mason et Nott, 1981), 2/ un mécanisme de régulation des métaux chez la littorine semblable à celui existant pour le cuivre (Depledge et Rainbow, 1990), 3/ une accumulation préférentielle des métaux au sein des patelles. Des études ont montré par exemple que le Pb s'adsorbe sur les composés glucosaminés du mucus déposé par la patelle lors de son déplacement. Celle-ci repassant sur son mucus lors de ces déplacements (*home finding*) cela favoriserait une accumulation du métal dans les tissus du gastéropode (Davies et Cliff, 2000 ; Nakhlé, 2003). Enfin, nous avons également posé l'hypothèse que l'opercule présent chez la littorine assurerait au-delà d'une protection contre la dessiccation et la prédation, un rôle protecteur contre les polluants. L'animal mis en contact avec une forte concentration de polluant se referme dans sa coquille (Moore, 1937; Newell, 1958), l'opercule pourrait alors absorber une partie des métaux présents à l'extérieur de l'animal. Des données de dosage métallique dans des patelles (dépourvues d'opercule) et littorines d'Atlantique montrent de façon significative que les *P. vulgata* bioaccumulent plus les métaux. De plus, des études ont montré que l'opercule est le tissu qui accumule effectivement fortement les métaux après le pied (Yap et Cheng, 2009).

Toxicité comparée entre l'aluminium et le plomb, et effet de l'acidification océanique

Les valeurs toxicologiques de référence (LOEC, LC10, LC30 et LC50) pour le plomb étaient largement inférieures à celles enregistrées pour l'aluminium ce qui était en accord avec l'étude de Shuhaimi-Othman et al. (2012). Ceci est probablement lié aux phénomènes complexes de la solubilité de l'aluminium qui dépend fortement du pH. En effet, la forme biodisponible de l'aluminium est l' Al^{3+} . Cette forme interagit très rapidement avec l'eau marine en se précipitant en un composé colloïdal peu ou pas biodisponible pour les organismes vivants. L'Al devient plus soluble à des pH acides et sa toxicité augmente (Botté et al., 2022a; Gensemer et al., 2018; Santore et al., 2018).

La biodisponibilité des métaux augmentant ainsi avec la diminution du pH (Zhou et al., 2018), cela nous a amené à nous interroger sur l'impact de l'acidification océanique prévue dans les modèles d'évolution du climat. L'acidification des eaux côtières pourrait donc favoriser la solubilité et la biodisponibilité des métaux (notamment l'Al), ce qui accentuerait leur toxicité pour la biocénose du milieu marin (Gensemer et Playle, 1999). Ivanina et Sokolova, (2015) et Shi et al., (2016) ont montré qu'un pH faible augmentait la solubilité du Cd et du Cu. De plus, il a été montré que l'acidification des océans augmentait déjà la toxicité de certains métaux tels

que Cd et Cu chez les bivalves et les polychètes (Lydersen et al., 1990; Campbell et al., 2014; Ivanina et al., 2014). Cronan et Schofield, (1979) et Driscoll et Schecher, (1990) ont suggéré que l'acidification des lacs ou le lessivage acide, seraient responsables de l'augmentation de la solubilité de l'aluminium et favoriseraient son transfert des milieux édaphiques aux milieux aquatiques. Massabuau et al., (1987) ont montré ainsi que l'acidification de l'eau douce induit le déclin des populations de poissons. Cette incidence de l'acidification des eaux pourrait se ressentir dans un premier temps dans des zones semi-fermées (comme la mer Méditerranée ou les baies) ou fermées (comme les lacs) où l'incidence de la diminution du pH sera plus prononcée.

Outre les effets de l'acidification des océans sur la biodisponibilité de l'aluminium, on peut également se demander quels seraient les effets de la hausse de la température environnementale. Des études ont montré qu'une augmentation de la température pourrait diminuer le taux de Al^{3+} (Lydersen et al., 1990). Ainsi, l'augmentation de la température pourrait modifier la spéciation de l'Al dans les milieux aquatiques et donc pourrait modifier son impact sur la faune marine et d'eau douce. Lydersen et al., (1990) ont essayé de simuler les effets extrêmes de réchauffement climatique et ont observé une diminution du taux d' Al^{3+} en augmentant la température de 25°C. Or la température ne devrait augmenter que de 2 à 6 °C en moyenne (Riebeek, 2010), donc le changement de spéciation de l'Al pourrait être mineur. Toutefois, cette question reste en suspens pour les autres métaux. Une nouvelle question peut alors être posée : est-ce qu'il pourrait y avoir un effet compensatoire entre l'augmentation de la température environnementale (qui diminue la biodisponibilité des ions métalliques) et l'augmentation de l'acidification des océans (qui favorise la conversion en ions métalliques) ?

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

L'évaluation régulière de la qualité de l'environnement est devenue une approche fondamentale répondant à une problématique sociétale actuelle focalisée sur la préoccupation de la conservation de la biodiversité et des écosystèmes. Malgré les recommandations du code de l'environnement (<https://www.legifrance.gouv.fr>, Article L219- 7 à 9), l'augmentation de l'occupation humaine de la zone estuarienne et littorale (habitations, activités économiques, culturelles et sportives) fait que ces écosystèmes souffrent malheureusement de l'incidence d'une pollution omniprésente très diversifiée (métaux, matière organique, plastique...). Pour estimer la présence et l'influence de la pollution, il est courant, en écotoxicologie marine ou terrestre, d'utiliser des espèces dite bioindicatrices.

La méta-analyse effectuée sur 123 publications portant sur l'usage des gastéropodes en écotoxicologie marine montre que parmi les espèces marines utilisées en biosurveillance les patelles et les littorines semblent être les modèles les plus fréquemment utilisés. De façon surprenant, peu de connaissances et d'outils associées à ces organismes sont disponibles. L'objectif de ce travail de thèse, a donc été de combler ce manque de connaissance et d'outils pour pouvoir mieux les utiliser à l'avenir en biosurveillance en combinant des méthodes de chimie de l'environnement et d'écotoxicologie. Ainsi, les objectifs principaux de ce travail doctoral ont été de caractériser les modèles *P. vulgata*, *L. littorea* (espèces d'Atlantique) et *P. caerulea* (espèce méditerranéenne) en analysant leur diversité génétique le long de leurs aires de répartition et d'établir la sensibilité de ces modèles face à des contaminations métalliques, de type aluminium ou plomb. En parallèle, nous avons établi des synthèses bibliographiques portant sur la biodisponibilité de ces deux métaux et leurs effets sur les invertébrés aquatiques. Des expériences en conditions contrôlées pratiquées sur les espèces d'Atlantique ont permis d'évaluer les réponses de ces gastéropodes aux contaminations aiguës et d'entrevoir le rôle joué par l'opercule dans la protection contre les métaux.

En conclusion, le premier volet de cette thèse focalisé sur l'étude de la diversité génétique des trois modèles abordés a révélé un fort brassage génétique entre les populations liées aux courants océaniques véhiculant les stades larvaires mais également à une répartition clinale observable du Nord au Sud pour les espèces d'Atlantique rappelant une expansion post-période glaciaire (Hewitt, 2000). Le deuxième volet axé sur l'analyse bibliographique nous a permis de mieux définir la toxicité potentielle de l'aluminium et regrouper les connaissances sur la toxicité du plomb en milieu marin. Enfin, le troisième volet de notre travail orienté sur l'approche écotoxicologique de l'aluminium et du plomb, nous a amené à favoriser l'usage des

patelles pour la biosurveillance. L'approche écotoxicologique combinant la biodisponibilité environnementale et écotoxicologique nous a permis de dévoiler une nouvelle caractéristique concernant le profil bioindicateur de *P. caerulea* en montrant qu'elle peut être utilisée comme espèce sentinelle ou bioindicatrice des effets de la contamination des écosystèmes par les ETM

En perspective de ce travail doctoral, plusieurs études pourraient être réalisées. Tout d'abord, des intoxications chroniques mimant plus une bioaccumulation environnementale permettraient d'entrevoir plus réellement les réponses des gastéropodes à la pollution métallique. Une approche focalisée sur les variations de l'expression génique de multiples biomarqueurs et des analyses de génotoxicité et d'épigenèse pourrait fournir des informations importantes pour la compréhension des effets de l'aluminium sur les animaux marins.

Une évaluation écotoxicologique plus élargie, basée sur l'utilisation de bio-essais pour des organismes de différents niveaux trophiques, en parallèle aux dosages directs des contaminants chimiques permettrait : 1/ de mieux appréhender la biodisponibilité des contaminants en zone côtière, 2/ d'adapter et de valider les seuils de toxicité, 3/ de définir une meilleure stratégie de gestion du littoral et de préservation des zones non impactées. Ce travail pourrait donc offrir des perspectives prometteuses pour le développement d'indices de biomarqueurs intégrés (Beliaeff et Burgeot, 2002) et de valeurs guides de référence (TGVs) (ISO 24032:2021; Louzon et al., 2020) pour l'évaluation de la biodisponibilité environnementale. Placé dans un contexte global, et étant donné que les patelles et les littorines entrent dans l'alimentation humaine, l'usage des gastéropodes marins pourrait trouver une application dans l'approche du contexte de *One-Health-Triad* (Essack, 2018) à travers l'établissement des indices de toxicité de type THQ (*target hazard quotient*), MI (*monthly intake*) ou PTMI (*the provisional tolerable monthly intake*) (Ben Salem et Ayadi, 2016; Rumisha et al., 2017) pour évaluer le risque potentiel de la santé publique à travers des ponts entre la santé humaine et la santé d'un organisme composant la faune du milieu marin.



ANNEXES

ANNEXES

Protocole CTAB pour l'extraction d'ADN

Les broyats des tissus mous (environ 50 mg) sont placés dans 600 µL de tampon d'extraction CTAB (CétylTriméthyl Ammonium Bromide ; Tris HCl 100 mM à pH 8, EDTA 20 mM à pH 8, NaCl 1,4 M et CTAB 2%), puis incubés 30 minutes à 60°C pour que le tampon agisse (impermeabilisation des parois cellulaires et conservation de l'ADN extrait). Puis, 600 µL de chloroforme/isoamylalcool (24 / 1) sont ajoutés afin d'isoler les acides nucléiques des composants cellulaires en se basant sur leur différence de solubilité.

Les échantillons sont alors centrifugés à 16 000 g pendant 10 minutes à 4°C afin de séparer les différentes phases : une phase aqueuse contenant les acides nucléiques hydrosoluble soluble, une phase intermédiaire contenant les protéines et une phase organique contenant les lipides et débris cellulaires. La phase aqueuse est récupérée et 30 µL d'acétate de sodium 3 M, ainsi que 1,3 mL d'éthanol 100° sont ajoutés ; le tout étant placé à -80°C pendant 30 minutes (ou à -20°C pendant une nuit) afin de précipiter l'ADN. Ensuite, les échantillons sont centrifugés à 16 000 g pendant 10 minutes, entraînant la séparation d'un culot d'ADN. Une étape de lavage de culot d'ADN est ainsi effectuée en ajoutant 250 µL d'éthanol 70°, puis une centrifugation d'une minute. Ce lavage est effectué deux fois pour éliminer les traces d'acétate de sodium. Enfin, le culot est séché sous vide pendant 15 à 20 minutes afin d'éliminer l'éthanol. Une fois séché, le culot est remis en suspension grâce à une hydratation en ajoutant 10 µl d'eau milli-Q stérile ou de l'eau « nuclease Free ».

Tableau des séquences d'amorces, de leur température d'hybridation (Tm) et de la taille théorique des fragments à amplifier

Gène	Amorce	Séquence de l'amorce (5'-3')	Tm (°C)	Taille attendue de l'amplicon
COI (<i>P. caerulea</i>)	COI F	5'-GAA TAT GAG CAG GTT TAG -3'	49,5	560 pb
	COI R	5'-CRGCT AAA ACA GGTAAWG-3'		
COI (<i>P. vulgata</i>)	COI F	5'-CAG TTT GTA TAC CGT CGT CG-3'	56,6	560 pb
	COI R	5'-CCT TCA ACA GCT CTT CTG GC-3'		
ITS (<i>P. caerulea</i>)	ITS 1	5'-GAC CGA ACT AAA GGC CTC ACA C-3'	61,2	1000 pb
	ITS2	5'-GGA AAG GCG TTC GAG CTT AAT C-3'		
D-Loop (<i>P. vulgata</i>)	F1R1	F1 5'-CATGTGTTTCGTAGTG TACCCTG-3' R1 5'-CCACTATGCAATTACACTAC-3'	56,5	1078 pb

	F2R2	F2 5'-GTACACAAGCATCACATGGGAC- 3' R2 5'-CCTCTACTAAATGGAATGGG- 3'	53,5	206 pb
--	------	---	------	--------

Protocole de ligation et de clonage

La ligation a été effectuée à l'aide du kit pGEM-T Vector System I (Promega). Le clonage a ensuite été réalisé en utilisant 200 µL de bactéries compétentes et 10 µL de produit de ligation PGEM-T. Ce mélange a été placé 30 minutes dans la glace, puis 42 secondes à 42°C afin de créer des pores dans les membranes bactériennes pour que le plasmide puisse y pénétrer. Ensuite, les tubes ont été plongés 3 minutes dans la glace afin de refermer les pores. 250 µL de milieu de culture SOC ont été ajoutés, puis les tubes ont été placés pendant 1 heure dans l'incubateur avec agitation à 37°C, favorisant la croissance bactérienne. Les bactéries ont alors été étalées sur une gélose contenant un milieu LB agar, 50 µL de X-gal, 50 µL d'ampicilline et 10 µL d'IPTG. Cela favorise la croissance des bactéries ayant intégré le vecteur et permet la sélection de celles ayant intégré l'insert. Après une nuit dans un incubateur à 37°C, les bactéries blanches sont repiquées dans le milieu LB et placées dans un incubateur à agitation à 37°C. Ensuite, une PCR (utilisant des amorces dont la séquence complémentaire est présente de part et d'autre de l'insert) et une électrophorèse ont été réalisées afin d'assurer la présence de l'insert dans le plasmide des bactéries.

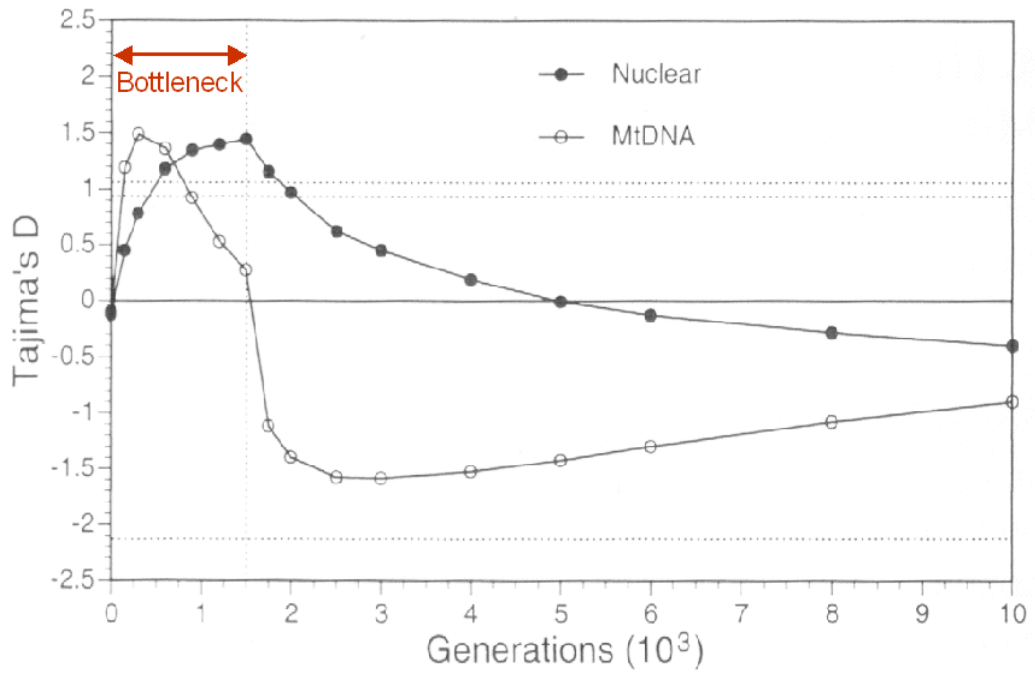
Les variations de Fst

$F_{st} = 0$: Aucune structuration de population (panmixie).

$F_{st} = 1$: la diversité génétique est expliquée par la structuration de la population principalement induite par l'existence de barrières aux flux de gènes et donc aucune diversité génétique partagées.

$F_{st} \geq 0,3$: une structuration génétique modérée.

$F_{st} \geq 0,5$: une subdivision assez forte des populations.



Evolution du D de Tajima pendant et après un goulot d'étranglement (Fay et Wu, 1999)

Tableau : Coordonnées GPS des sites d'échantillonnage

Site	Coordonnées GPS	
Cap Bon (CB)	10°54'25.12''E	37°11'09.2''N
Chebba (C)	11°82'24.0'' E	35°14'30.88'' N
Kerkennah (K)	11°75'34.3'' E	34°41'26.00'' N
Gabès (G)	10°65'87.9'' E	33°53'48.72'' N

Tableau : Certaines caractéristiques des divers éléments traces étudiés

Elément trace	Absorbance λ (nm)	Concentration d'étalon (mg. L ⁻¹)			Limite de détection (mg. L ⁻¹)	DMA ($\mu\text{g/g}$) (IAEA, 2003)	Limite de sécurité pour l'eau ($\mu\text{g/L}$) (USEPA, 1999)
Zn	213.86	1	3	5	0.012	67.1	90
Ni	232.00	1	5	10	0.07	0.6	74
Cu	324.75	1	5	10	0.035	3.28	4.8
Cd	228.80	1	3	5	0.012	0.189	42
Pb	283.31	1	3	5	0.085	0.12	210
Fe	248.33	1	5	10	0.08	146	---

Préparation du cytosol

L'extraction a été faite à froid. Le fragment d'organe a été broyé dans 2 ml de TBS pH 7.4 (solution, 1) à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-turax. Les homogénats contenus des tubes ont été centrifugés à 9000 tours/min à 4°C durant 15 minutes, afin de récupérer le cytosol (surnageant) qui a été rapidement conservé à -20°C et qui a servi pour le dosage de MDA, des protéines et de l'activité des enzymes antioxydantes.

Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode de Lowry et *al* (1951), dans des tubes en plastique, nous avons introduit dans l'ordre :

- 0.2 ml de cytosol dilué
- 2 ml de mélange réactionnel composé de Na₂CO₃ 2% dans NaOH 0.1 N (4g/l); tartrate double de Na et de K 2% et CuSO₄ 1% dans les proportions (50V/1V/1V).
- 0.2 ml de réactif de FOLIN (Sigma) préalablement dilué au ½ avec l'eau distillée et maintenu à 4°C à l'obscurité.

Après agitation, les tubes ont été mis à l'obscurité à la température ambiante pendant 30 minutes. Le réactif de Folin produit ainsi un complexe soluble, de couleur bleue, dont l'absorbance a été mesurée à 490 nm. La quantité de protéines, correspondant à chaque densité optique mesurée a été calculée en $\mu\text{g/ml}$, à partir d'un courbe étalon réalisée avec une solution de sérum albumine bovine (BSA) à 0.5 mg/ml.

Dosage du taux de la peroxydation lipidique (les substances TBARS)

Le dialdéhyde malonique ou MDA est le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique, notamment par la simplicité et la sensibilité de la méthode de dosage. Le MDA libre

n'est pas ou peu mesurable car il disparaît rapidement par formation d'adduits. La méthode de mesure repose donc sur une libération en milieu acide du MDA fixé.

Principe de la mesure :

Après traitement acide à chaud, les aldéhydes réagissent avec le TBA (acide thiobarbiturique) pour former un produit de condensation chromogénique consistant en 2 molécules de TBA est une molécule de MDA. L'absorption intense de cet aduit (=532 nm) rend cette mesure très sensible (Niehaus and Samuelsson (1968)).

Pour le milieu réactionnel, nous avons procédé le protocole expérimental suivant :

	Tube Blanc	Tubes à Essais
Extrait	0 µl	375 µl
TBS (PH=7,4)	525 µl	150 µl
TCA-BHT (à chaud)	375 µl	375 µl

Le contenu de ces tubes a été vortexé puis centrifugé à 1000 tours/ min pendant 10 minutes. Deux cents microlitres de surnageant ont été prélevés, ensuite 40 µl de HCl (0.6 M) et 160 µl d'acide thiobarbiturique (Tris – TBA : solution 2) ont été ajoutés. Les contenus ont été vortexés de nouveau puis incubés à 80°C pendant 10 min. La lecture des densités optiques a été faite à 530 nm dans une cuve en quartz. Cette densité optique, qui correspond à la formation du complexe (TBA–MDA), est directement proportionnelle à la concentration de MDA, et donc de lipides peroxydés. La loi de Beer –Lambert ($DO = E.C.L$) a été appliquée. La concentration de MDA a été calculée selon la formule suivante :

$$C = DO. 10^6 / E.L.X.Fd$$

Avec:

C : concentration de MDA en nmoles par milligramme de protéines.

Do : densité optique à 530 nm.

E : coefficient d'extinction molaire du MDA ; ($E = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

L : longueur du trajet optique = 0.779 cm.

X : concentration du cytosol en protéines (mg /ml).

Fd : facteur de dilution : $Fd = (VS1. VS) / (Vf. VF)$ avec :

VS1 : volume de prise de l'échantillon (125 µl)

VS : volume prélevé du surnageant (200 µl)

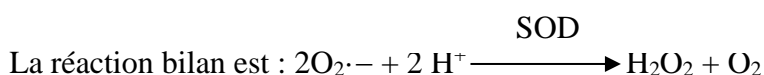
Vf : volume final à l'incubation à 80°C (400 µl)

VF : volume final intermédiaire à la centrifugation (300 µl) ; ici : Fd = 0.2083.

La superoxyde dismutase (SOD)

Principe

La méthode spectrophotométrique utilisée permet une mesure de l'activité de la SOD d'une manière indirecte, en utilisant le complexe riboflavine/méthionine producteur des anions superoxydes et la NBT. L'oxydation du NBT par l'anion superoxyde O_2^- est mesurée à 560 nm. La SOD issue des extraits entre en compétition pour l'utilisation de l' O_2^- et donc limite l'oxydation de la NBT. Dans un milieu aérobie, le mélange riboflavine, méthionine et NBT donne une coloration bleuâtre (Beauchamp and Fridovich (1971)).



Mode opératoire

Pour le milieu réactionnel, nous avons procédé selon le protocole expérimental suivant :

	Cuve de référence (zéro du spectrophotomètre)	Cuve illuminée		Concentration dans le milieu réactionnel
		Totale (B)	Echantillon(E)	
EDTA-Met	1000µl	1000 µl	1000 µl	EDTA (0.1mM)
Tampon Phosphate	892.2µl	892.2 µl	892.2µl	Met (13mM)
Echantillon	_____	_____	50 µl	_____
Tampon Phosphate	1000 – X µl	1000 µl	950 µl	50mM
NBT	85.2µl	85.2 µl	85.2 µl	75µM
Riboflavine	22.6µl	22.6 µl	22.6 µl	2µM

Incubation à la lumière (Lampe) pendant 20 min puis lecture de la DO à 580nm.

Calcul de l'activité SOD

L'activité SOD en pourcentage d'inhibition / mg de protéines :

$$Y = \frac{[(DO_B - DO_E) \times 100] \times 20 / C}{DO_B}$$

Avec : DO_B = DO du blanc à la lumière

DO_E = DO d'échantillon à la lumière

C : Concentration des protéines en (mg ml⁻¹).

20 = pour convertir l'activité de 50 µl à 1000 µl.

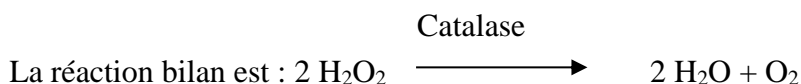
Activité SOD en $U_{SOD} \text{ mg}^{-1}$ de protéine = $Y/50$ (U_{SOD} correspond à 50% d'inhibition).

La catalase (CAT)

Principe

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique pour la cellule en eau et en dioxygène (Aebi, 1984).

La réaction se fait en deux étapes :



L'activité catalase CAT a été mesurée à 240nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible (JENWAY 6105) par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'Hydrogène (H_2O_2) en faisant réagir dans 100mM de tampon phosphate pendant 1min à pH 7.4 200µl de H_2O_2 (500mM) sur 20µl de S9, à une température d'incubation de 25°C. Les réactifs ont été fournis par sigma Aldrich. Les résultats ont été exprimés en µmoles de H_2O_2 par minute et par mg de protéines.

Mode opératoire

Pour le milieu réactionnel, les concentrations et les quantités des réactifs nécessaires au dosage de l'activité catalase sont résumés dans le tableau suivant.

	Essai (µl)	Blanc (µl)
Tampon phosphate (100mM ; pH 7.5)	780	800
H ₂ O ₂ (500mM)	200	200
S9 (1 à 1.5mg protéine/ml)	20	0

La lecture de l'absorption a été faite après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

Le coefficient d'extinction de H₂O₂ étant de 0.043 mM⁻¹cm⁻¹

L'activité catalasique CAT a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité CAT} = \frac{\Delta DO * d}{\epsilon * l * X * 0.02}$$

Avec :

ΔDO : variation de la densité optique par minutes c'est -à- dire pour :

Ai (Absorbance initiale) :15 secondes

Af (Absorbance finale) : 1minute

On convertit par minute : (Ai- Af)*4 / 3

d : dilution de l'échantillon au début ;

ε : Coefficient d'extinction 0.043 mM⁻¹ cm⁻¹ = 0,043 µmole cm-1ml-1

l : Largeur de la cuve (longueur du trajet optique) en cm ;

X : Quantité des protéines en mg/ml.

La glutathion peroxydase (GPx)

Principe

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée selon la méthode de Flohe et Gunzler (1984), modifiée ultérieurement en utilisant H₂O₂ comme substrat. L'activité GPx a été calculée par la diminution de taux de GSH réduit par rapport à la réaction non enzymatique « blanc ».

Mode opératoire :

Le surnageant (1 volume) a été mélangé avec le GSH 1 mM (2 volumes) et un blanc a été préparé [GSH 1 mM, NaKHPO4 (67 mM), pH 7.8]. Deux cents microlitres de H2O2 (1.3 mM) ont été ajoutés pour initier la réaction. La réaction a été arrêtée après 10 min par l'addition de TCA 1% (30 min). Après centrifugation, le milieu réactionnel contient 0.48 ml de surnageant, 2.2 ml Na2HPO4 (320 mM), et 0.32 ml DTNB (1 mM) a été préparée. La lecture a été effectuée à 412 nm dans les 5min. L'activité GSH-Px a été exprimée en µmoles de GSH oxydé/min/mg de protéines. L'activité GPx a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité GPx} = \frac{(\text{DOe} - \text{DOb}) * 0.04 * 5}{\text{DOb} * X * 10}$$

Avec :

DOb: la densité optique mesurée du blanc

DOe: la densité optique mesurée de l'échantillon

0.04: la quantité initiale de GSH par tube

5 : pour convertir l'activité par 1 ml

X : la concentration de protéines en mg/ml

10 : dix minutes le temps de la réaction.

Volumes des individus utilisés pour les tests de toxicité

Moyenne des volumes des *Patella vulgata* pour l'aluminium (homogénéité des lots : p = 0.01387)

Concentrations d'aluminium testées (g/L)	Volume de <i>P.vulgata</i> (en cm ³) (moyenne +/- SD)
0	3,567+/- 1,515
0,005	3,803+/- 1,696
0,05	3,968+/- 1,636
0,1	3,63+/- 1,800
0,2	2,953+/- 1,408
1	2,849+/- 1,408
2	4,313+/- 2,518

Moyenne des volumes des *Patella vulgata* pour le plomb (homogénéité des lots : p =0.4396).

Concentrations de plomb testées (g/L)	Volume de <i>P.vulgata</i> (en cm ³) (moyenne +/- SD)
0	4,361+/-1,862
0,0025	3,517+/-1,085
0,005	3,763+/-1,308
0,01	4,082+/-1,743
0,05	3,381+/-0,892
0,1	4,248+/-1,668
1	4,086+/-1,385
2	3,405+/-0,912

Moyenne des volumes des *Littorina littorea* pour l'aluminium (homogénéité des lots : $p=0.01705$).

Concentrations d'aluminium testées (g/L)	Volume des <i>L.littorea</i> (en cm ³) (moyenne +/- SD)
0	1,218+/-0,157
0.01	1,209+/-0,168
0.1	1,112+/-0,189
0.5	1,133+/-0,21
0.75	1,094+/-0,17
1	1,111+/-0,15
2	1,187+/-0,112
5	1,198+/-0,2

Moyenne des volumes des *Littorina littorea* pour le plomb (homogénéité des lots : $p=0.5497$).

Concentrations de plomb testées (g/L)	Volume des <i>L.littorea</i> (en cm ³) (moyenne +/- SD)
0	1,053+/-0,183
0.001	1,111+/-0,224
0.1	1,11+/-0,185
0.25	1,036+/-0,152
0.5	1,052+/-0,206
0.75	1,045+/-0,205
1	1,087+/-0,214
2	1,022+/-0,141

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abbott, R.T., 1974. American Seashells; The marine molluska of the Atlantic and Pacific coasts of north America, 2nd edition. ed. Van Nostrand Reinhold, New York.

Abdel Gawad, S.S., 2018. Acute toxicity of some heavy metals to the fresh water snail, *Theodoxus niloticus* (Reeve, 1856). The Egyptian Journal of Aquatic Research 44, 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.004>

Achary, M.S., Panigrahi, S., Satpathy, K.K., Prabhu, R.K., Panigrahy, R.C., 2016. Health risk assessment and seasonal distribution of dissolved trace metals in surface waters of Kalpakkam, southwest coast of Bay of Bengal. Regional Studies in Marine Science Complete, 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2016.03.017>

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro, in: Methods in Enzymology, Oxygen Radicals in Biological Systems. Academic Press, pp. 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)

Ahearn, G.A., Mandal, P.K., Mandal, A., 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. J Comp Physiol B 174, 439–452. <https://doi.org/10.1007/s00360-004-0438-0>

Akpiri, R.U., Konya, R.S., Hodges, N.J., 2019. Aluminium Induced DNA-damage and Oxidative Stress in Cultures of the Marine Sponge *Hymeniacidon perlevis*. Journal of Marine Science 2. <https://doi.org/10.30564/jms.v2i1.1070>

Al Kaddissi, S., 2012. Comparaison de la réponse (en termes d'accumulation, d'impacts cellulaires et génétiques) de l'écrevisse *Procambarus clarkii* après exposition à un polluant métallique (cadmium) et un polluant radiologique (uranium 238 et 233) (Thèse de doctorat). Bordeaux 1.

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. Environ. Toxicol. 29, 893–907. <https://doi.org/10.1002/tox.21817>

Ali, M., Soltan, M.E., 1996. The impact of three industrial effluents on submerged aquatic plants in the river Nile, Egypt. Hydrobiologia 340, 77–83. <https://doi.org/10.1007/BF00012737>

Al-Masri, M., 2002. Marine environmental studies on the syrian coast: Biomonitors. CIESM workshop on Mediterranean Mussel watch 18–21.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Amari, A., 1984. Contribution à la connaissance hydrologique et sédimentologique de la plate-forme des îles Kerkennah (Thèse de doctorat). Faculté des sciences de Tunis, Tunis.

Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., 2008. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Éd. Tec & Doc-Lavoisier, Paris.

Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Charbonnier, L., Mesnil, A., Rainbow, P.S., Wang, W.-X., 2008. Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from Western Europe and Asia. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2010–2022. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.041>

Annibaldi, A., Truzzi, C., Illuminati, S., Scarponi, G., 2009. Recent sudden decrease of lead in Adriatic coastal seawater during the years 2000–2004 in parallel with the phasing out of leaded gasoline in Italy. *Marine Chemistry* 113, 238–249. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2009.02.005>

Ansari, T.M., Marr, I.L., Tariq, N., 2004. Heavy Metals in Marine Pollution Perspective-A Mini Review. *Journal of Applied Sciences* 4, 1–20. <https://doi.org/10.3923/jas.2004.1.20>

Arrontes, J., Arenas, F., Fernández, C., Rico, J.M., Oliveros, J., Martínez, B., Viejo, R.M., Alvarez, D., 2004. Effect of grazing by limpets on mid-shore species assemblages in northern Spain. *Marine Ecology Progress Series* 277, 117–133. <https://doi.org/10.3354/meps277117>

Aschner, M., Jiang, G.C.-T., 2009. Toxicity studies on depleted uranium in primary rat cortical neurons and in *Caenorhabditis elegans*: what have we learned? *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 12, 525–539. <https://doi.org/10.1080/10937400903358942>

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.

Ayache, M., 2016. Modélisation d'éléments traces (T, ³He, Nd, ¹⁴C) en mer Méditerranée pour l'étude des cycles biogéochimiques et de la circulation océanique.

Ayari, J., Agnan, Y., Charef, A., 2016. Spatial assessment and source identification of trace metal pollution in stream sediments of Oued El Maadene basin, northern Tunisia. *Environ Monit Assess* 188, 397. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5402-4>

Aydın-Önen, S., Öztürk, M., 2017. Investigation of heavy metal pollution in eastern Aegean Sea coastal waters by using *Cystoseira barbata*, *Patella caerulea*, and *Liza aurata* as biological indicators. *Environ Sci Pollut Res Int* 24, 7310–7334. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8226-4>

Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16, 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>

Barabasz, W., Albińska, D., Jaśkowska, M., Lipiec, J., 2002. Ecotoxicology of Aluminium. Polish Journal of Environmental Studies 11.

Barchiesi, F., Branciarri, R., Latini, M., Roila, R., Lediani, G., Filippini, G., Scortichini, G., Piersanti, A., Rocchegiani, E., Ranucci, D., 2020. Heavy Metals Contamination in Shellfish: Benefit-Risk Evaluation in Central Italy. Foods 9, 1720. <https://doi.org/10.3390/foods9111720>

Barhoumi, B., Menach, K.L., Clérandeau, C., Ameer, W.B., Budzinski, H., Driss, M.R., Cachot, J., 2014. Assessment of pollution in the Bizerte lagoon (Tunisia) by the combined use of chemical and biochemical markers in mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Marine Pollution Bulletin 84, 379–390. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.05.002>

Barillet, S., Larno, V., Floriani, M., Devaux, A., Adam-Guillermin, C., 2010. Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure. Aquatic Toxicology 100, 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.08.002>

Barnes, D., Fraser, K., 2003. Rafting by five phyla on man-made flotsam in the Southern Ocean. Marine Ecology-progress Series - MAR ECOL-PROGR SER 262, 289–291. <https://doi.org/10.3354/meps262289>

Bartolomé, L., Bustamante, M., Navarro, P., Tajadura, J., Gorostiaga, J.M., Díez, I., Zuloaga, O., Etxebarria, N., 2011. The use of limpets as monitor of PAHs pollution in the Cantabrian coast. Continental Shelf Research 31, 1818–1826. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2011.08.001>

Bartosz, G., 2003. Generation of Reactive Oxygen Species in Biological Systems. Comments on Toxicology 9, 5–21. <https://doi.org/10.1080/08865140302420>

Bashir, I., Lone, F.A., Bhat, R.A., Mir, S.A., Dar, Z.A., Dar, S.A., 2020. Concerns and Threats of Contamination on Aquatic Ecosystems, in: Hakeem, K.R., Bhat, R.A., Qadri, H. (Eds.), Bioremediation and Biotechnology: Sustainable Approaches to Pollution Degradation. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–26. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35691-0_1

Bat, L., Bilgin, S., Gündoğdu, A., Akbulut, Çulha, M., 2001. Individual and combined effects of copper and lead on the marine shrimp, *Palaemon adspersus* Rathke, 1837 (Decapoda: Palaemonidae).

Batista, M.T.O., Rodrigues Junior, E., Feijó-Oliveira, M., Ribeiro, A.C., Rodrigues, E., Suda, C.N.K., Vani, G.S., 2014. Tissue levels of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in fish *Astyanax bimaculatus* from the Una River Basin. Revista Ambiente Água 9, 621–631. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1473>

Batley, G.E., 1989. Trace element speciation: analytical methods and problems. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Bauer, B., Fioroni, P., Ide, I., Liebe, S., Oehlmann, J., Stroben, E., Watermann, B., 1995. TBT effects on the female genital system of *Littorina littorea*: a possible indicator of tributyltin pollution. Hydrobiologia 309, 15–27. <https://doi.org/10.1007/BF00014468>

Bautz, A.-M., Bautz, A., Chardard, D., 2010. Mini manuel de biologie animale : cours QCM / Anne-Marie Bautz,... Alain Bautz,..., 2nd ed, Mini-manuel. Dunod. Paris.

Bazairi, H., Haj, S., Boero, F., Cebrian, D., Juan, S., Limam, A., Lleonart, J., Torchia, G., Rais, C., 2010. The Mediterranean Sea Biodiversity: state of the ecosystems, pressures, impacts and future priorities.

Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44, 276–287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)

Bebianno, M.J., Langston, W.J., Simkiss, K., 1992. Metallothionein induction in *Littorina littorea* mollusca prosobranchia on exposure to cadmium. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 72, 329–342. <https://doi.org/10.1017/s0025315400037735>

Beiras, R., Albentosa, M., 2004. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; implications for the implementation of seawater quality criteria. *Aquaculture* 230, 205–213. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00432-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00432-0)

Bejaoui, B., Raïs, S., Koutitonsky, V., 2004. Modélisation de la dispersion du phosphogypse dans le golfe de Gabès. Modelisation of the phosphogypsum spreading in the gulf of Gabes.

Bélangier, D., 2009. Utilisation de la faune macrobenthique comme bioindicateur de la qualité de l'environnement marin côtier (Essai). Université de Sherbrooke.

Belfiore, N.M., Anderson, S.L., 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutat. Res.* 489, 97–122. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(01\)00065-5](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(01)00065-5)

Belhaouari, B., Rouane Hacene, O., Bendaha, M., Zitouni, B., 2014. Effects of Metal Sulfates on Catalase and Glutathione-S-transferase of Marine Gastropod : *Osilinus turbinatus* 4, 191–196.

Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1316–1322. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>

Beliaeff, B., O'Connor, T.P., Claisse, D., 1998. Comparison of chemical concentrations in mussels and oysters from the United States and France. *Environ Monit Assess* 49, 87–95. <https://doi.org/10.1023/A:1005766321323>

Belkhodja, H., Missaoui, H., Salah Romdhane, M., 2012. Trace metals in molluscs *Patella caerulea* (Linnaeus, 1758) from Tunisian North Coasts, Mediterranean Sea. *Cah. biol. mar* 53, 243–254.

Belkhodja, H., Romdhane, M., 2013. *Corallina* sp. and *Patella caerulea* (Linnaeus, 1758) as quantitative biological indicators for trace metals in the Tunisian coastal waters. Rapp Comm Int Mer Médit 40:815. Rapp Comm Int Mer Medit 40:815.

Belli, N., Mesbah, L., Chebab, S., Tekouk, M., Leghouchi, E., 2010. Stress oxydant induit par la coexposition au plomb et au cadmium : deux contaminants des eaux souterraines de Oued Nil (Jijel - Algérie). Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science 23, 289–301. <https://doi.org/10.7202/044690ar>

Ben Charrada, R., 1997. Etude hydrodynamique et écologique du complexe Petit golfe – Lac de Tunis. Contribution à la modélisation de l'écosystème pélagique des eaux côtière Petit golfe de Tunis. Université de Tunis, Faculté des sciences., Tunisie, Tunis.

Ben Salem, Z., Ayadi, H., 2016. Assessment of heavy metal contamination levels and toxicity in sediments and fishes from the Mediterranean Sea (southern coast of Sfax, Tunisia). Environ Sci Pollut Res 23, 13954–13963. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6534-3>

Bergasa, O., Ramírez, R., Collado, C., Hernández-Brito, J.J., Gelado-Caballero, M.D., Rodríguez-Somozas, M., Haroun, R.J., 2007. Study of metals concentration levels in *Patella piperata* throughout the Canary Islands, Spain. Environ Monit Assess 127, 127–133. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9266-x>

Blandin, P., 1986. Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. Bull. Ecol. 17, 215–307.

Blum, J., Fridovich, I., 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. Archives of Biochemistry and Biophysics 240, 500–508. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90056-6)

Boaventura, D., Alexander, M., Santana, P.D., Smith, N.D., Ré, P., Fonseca, L.C. da, Hawkins, S.J., 2002. The effects of grazing on the distribution and composition of low-shore algal communities on the central coast of Portugal and on the southern coast of Britain. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 2, 185–206.

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. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 138, 411–427. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.04.009>

Bonacci, S., Iacocca, A., Fossi, S., Lancini, L., Caruso, T., Corsi, I., Focardi, S., 2007. Biomonitoring aquatic environmental quality in a marine protected area: A biomarker approach. Ambio 36, 308–315.

Bordbar, L., 2015. Influence of a Ferronickel Smelting Plant Activity on the Coastal Zone through Investigation of Metal Bioaccumulation on Two Gastropod Species (*Patella caerulea* and *Phorcus turbinatus*). Journal of Environmental & Analytical Toxicology s7. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.S7-004>

Botté, A., Seguin, C., Nahrgang, J., Zaidi, M., Guery, J., Leignel, V., 2022b. Lead in the marine environment: concentrations and effects on invertebrates. *Ecotoxicology* 31, 194–207. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02504-4>

Botté, A., Zaidi, M., Guery, J., Fichet, D., Leignel, V., 2022a. Aluminium in aquatic environments: abundance and ecotoxicological impacts. *Aquat Ecol.* <https://doi.org/10.1007/s10452-021-09936-4>

Boucheseiche, C., Cremille, E., Pelte, T., Pojer, K., 2002. Pollution toxique et écotoxicologie : Notions de base. Ed. (Guide technique No. 7). Agence de l'Eau Rhône Méditerranée et Corse, France.

Bouzaza, Z., 2018. Etude systématique, phylogénétique, phylogéographique et démographique de *Patella ferruginea* (Gmelin, 1791), *Patella caerulea* (Linnaeus, 1758) et *Cymbula safiana* (Lamarck, 1819) de la frange côtière Algérienne. Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.

Bowen, H.J.M., 1966. Trace elements in biochemistry. Academic Press, London; New York.

Branch, G.M., 1985. Limpets: their role in littoral and sublittoral community dynamics. The ecology of rocky coasts: essays presented to J.R. Lewis.

Brandhorst, W., Messaoud, H., 1977. Les conditions de milieu au large de la côte tunisienne.

Brooks, A.W., White, K.N., 1995. The localization of aluminium in the digestive gland of the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Tissue Cell* 27, 61–72. [https://doi.org/10.1016/s0040-8166\(95\)80010-7](https://doi.org/10.1016/s0040-8166(95)80010-7)

Brown, R.J., Galloway, T.S., Lowe, D., Browne, M.A., Dissanayake, A., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquat Toxicol* 66, 267–278. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.10.001>

Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., 2015. Organophosphorous biocides reduce tenacity and cellular viability but not esterase activities in a non-target prosobranch (limpet). *Environmental Pollution* 203, 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.04.001>

Bryan, G.W., Langston, W.J., Hummerstone, L.G., Burt, G.R., Ho, Y.B., 1983. An assessment of the gastropod, *Littorina littorea*, as an indicator of heavy-metal contamination in United Kingdom estuaries. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 63, 327–345. <https://doi.org/10.1017/S0025315400070715>

Bryan, G.W., Potts, G.W., Forster, G.R., 1977. Heavy metals in the gastropod mollusc *Haliotis tuberculata* (L.). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 57, 379–390. <https://doi.org/10.1017/S0025315400021822>

Buffet, P.-E., Tankoua, O.F., Pan, J.-F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Bérard, J.-B., Risso, C., Guibbolini, M., Roméo, M., Reip,

P., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere* 84, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.003>

Burger, J., 2008. Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. *Sci Total Environ* 389, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.08.037>

C.R.D.A. (Commissariat Régionale de Développement Agricole), 2011. Rapport annuel des activités de pêche du gouvernorat de Mahdia.

Cabral-Oliveira, J., Pratas, J., Mendes, S., Pardal, M.A., 2015. Trace elements in edible rocky shore Species: effect of sewage discharges and human health risk implications. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 21, 135–145. <https://doi.org/10.1080/10807039.2014.890480>

Caesar, L., McCarthy, G.D., Thornalley, D.J.R., Cahill, N., Rahmstorf, S., 2021. Current atlantic meridional overturning circulation weakest in last millennium. *Nat. Geosci.* 14, 118–120. <https://doi.org/10.1038/s41561-021-00699-z>

Cajaraville, M.P., Orbea, A., Marigómez, I., Cancio, I., 1997. Peroxisome Proliferation in the Digestive Epithelium of Mussels Exposed to the Water Accommodated Fraction of Three Oils. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 117, 233–242. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(97\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(97)00057-1)

Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2003. Inorganics and Hormesis. *Critical Reviews in Toxicology* 33, 215–304. <https://doi.org/10.1080/713611040>

Caldeira, K., Wickett, M.E., 2003. Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425, 365–365. <https://doi.org/10.1038/425365a>

Campanella, L., Conti, M.E., Cubadda, F., Sucapane, C., 2001. Trace metals in seagrass, algae and molluscs from an uncontaminated area in the Mediterranean. *Environ. Pollut.* 111, 117–126. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(99\)00327-9](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(99)00327-9)

Campbel, P., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model, in: Tessier, A., Turner, D. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley and Sons, London, pp. 45–102.

Campbell, A.L., Mangan, S., Ellis, R.P., Lewis, C., 2014. Ocean Acidification Increases Copper Toxicity to the Early Life History Stages of the Polychaete *Arenicola marina* in Artificial Seawater. *Environ. Sci. Technol.* 48, 9745–9753. <https://doi.org/10.1021/es502739m>

Canbäck, B., André, C., Galindo, J., Johannesson, K., Johansson, T., Panova, M., Tunlid, A., Butlin, R., 2012. The *Littorina* sequence database (LSD)--an online resource for genomic data. *Mol Ecol Resour* 12, 142–148. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03042.x>

Cantillo, A.Y., 1998. Comparison of results of Mussel Watch Programs of the United States and France with Worldwide Mussel Watch Studies. *Marine Pollution Bulletin* 36, 712–717. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(98\)00049-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00049-6)

Carman, M., Allen, H., Tyrrell, M., 2009. Limited value of the common periwinkle snail *Littorina littorea* as a biological control for the invasive tunicate *Didemnum vexillum*. *Aquatic Invasions* 4. <https://doi.org/10.3391/ai.2009.4.1.30>

Carocci, A., Catalano, A., Lauria, G., Sinicropi, M.S., Genchi, G., 2016. Lead toxicity, antioxidant defense and environment. *Rev Environ Contam Toxicol* 238, 45–67. https://doi.org/10.1007/398_2015_5003

Carver, C., Chisholm, A., Mallet, A., 2003. Strategies to mitigate the impact of *Ciona intestinalis* (L.) biofouling on shellfish production. *Journal of Shellfish Research* 22, 621–631.

Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, C., 1997. Enzyme Activity Alteration by Cadmium Administration to Rats: The Possibility of Iron Involvement in Lipid Peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 346, 171–179. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0197>

Casas, S., 2005. Modélisation de la bioaccumulation de métaux trace (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, en milieu méditerranéen. Université de Toulon.

Cavé-Radet, A., 2018. Évolution de la tolérance aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) chez les spartines polyploïdes : analyses physiologiques et régulations transcriptomiques par les micro-ARNs (These de doctorat). Rennes 1.

CE, 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance), OJ L.

Cerchier, P., Pezzato, L., Moschin, E., Coelho, L.B., Olivier, M.G.M., Moro, I., Magrini, M., 2018. Antifouling properties of different Plasma Electrolytic Oxidation coatings on 7075 aluminium alloy. *International biodeterioration & biodegradation*.

Cervella, P., Ramella, L., Robotti, C.A., Sella, G., 1988. Chromosome analysis of three species of *Patella* (Archaeogastropoda). *Genetica* 77, 97–103.

Chang, A.L., Blakeslee, A.M.H., Miller, A.W., Ruiz, G.M., 2011. Establishment Failure in Biological Invasions: A Case History of *Littorina littorea* in California, USA. *PLOS ONE* 6, e16035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016035>

Chatenoux, B., Allenbach, K., Peduzzi, P., Lafitte, A., Touzi, S., Ben zakour, M., 2015. Intégration de la variabilité et des changements climatiques dans les stratégies nationales GIZC : contribution à l'actualisation du plan de gestion intégrée des zones côtières de l'archipel de Kerkennah. Plan-bleu : Environnement et développement en Méditerranée. URL <https://planbleu.org/publications/integration-de-la-variabilite-et-des-changements-climatiques-dans-les-strategies-nationales/> (accessed 3.31.22).

Checa, A.G., Jiménez-Jiménez, A.P., 1998. Constructional morphology, origin, and evolution of the gastropod operculum. *Paleobiology* 24, 109–132. <https://doi.org/10.1017/S0094837300020005>

Cheggour, M., Chafik A. et Benbrahim S., 2002. Biomonitoring of the moroccan coasts: outlook of the Mediterranean Mussel watch in Morocco. *CIESM workshops series*. (15). 136p.

Cheng, H.-L., Xia, D.-Q., Wu, T.-T., Meng, X.-P., Ji, H.-J., Dong, Z.-G., 2006. Study on sequences of ribosomal DNA internal transcribed spacers of clams belonging to the Veneridae family (Mollusca: Bivalvia). *Yi Chuan Xue Bao* 33, 702–710. [https://doi.org/10.1016/S0379-4172\(06\)60102-9](https://doi.org/10.1016/S0379-4172(06)60102-9)

Chiffolleau, J., 2001. La contamination métallique. IFREMER.

Chiverrell, R.C., Thomas, G.S.P., 2010. Extent and timing of the Last Glacial Maximum (LGM) in Britain and Ireland: a review. *Journal of Quaternary Science* 25, 535–549. <https://doi.org/10.1002/jqs.1404>

Chouba, L., 2009. Bioaccumulation et tendance temporelle des métaux trace (Cd, Pb, Hg) dans les sédiments et chez les Mollusques bioindicateurs de la qualité du littoral tunisien. Thèse de Doctorat. Université 7 Novembre A Carthage, Tunisie : 211 p.

Chouba, L., 2016. La qualité chimique du littoral tunisien, Tendance des métaux trace. Éditions universitaires européennes.

Chouba, L., Tissaoui, C., El Abed, A., 2008. Etude de la concentration des métaux trace chez *Hexaplex trunculus* (Muricidae) le long du littoral Tunisien. Concentrations of trace metals in *Hexaplex trunculus* from Tunisian coast.

Chow, S., Ueno, Y., Toyokawa, M., Oohara, I., Takeyama, H., 2009. Preliminary analysis of length and GC content variation in the ribosomal first internal transcribed spacer (ITS1) of marine animals. *Mar Biotechnol* (NY) 11, 301–306. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9153-2>

Christiaens, J., 1973. Révision du genre *Patella* (Mollusca, Gastropoda). *Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle*. 182, 1305–1392.

Chrzanowski, Ł., Ławniczak, Ł., 2020. Biodegradation of conventional and emerging pollutants. *Molecules* 25, 1186. <https://doi.org/10.3390/molecules25051186>

Chuang, P.-S., Chen, M.-I., Shiao, J.-C., 2012. Identification of tuna species by a real-time polymerase chain reaction technique. *Food Chemistry* 133, 1055–1061. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.076>

Closset, M., Cailliau, K., Slaby, S., Marin, M., 2021. Effects of Aluminium contamination on the nervous system of freshwater aquatic vertebrates: A Review. *Int J Mol Sci* 23, 31. <https://doi.org/10.3390/ijms23010031>

Coissac, E., Riaz, T., Puillandre, N., 2012. Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Molecular Ecology* 21, 1834–1847. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05550.x>

Coleman, R.A., Underwood, A.J., Benedetti-Cecchi, L., Aberg, P., Arenas, F., Arrontes, J., Castro, J., Hartnoll, R.G., Jenkins, S.R., Paula, J., Della Santina, P., Hawkins, S.J., 2006. A continental scale evaluation of the role of limpet grazing on rocky shores. *Oecologia* 147, 556–564. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0296-9>

Collin, R., 2003. Phylogenetic relationships among calyptraeid gastropods and their implications for the biogeography of marine speciation. *Systematic Biology* 52, 618–640. <https://doi.org/10.1080/10635150390235430>

COMETE engineering, 2008. Caractérisation du golfe de Tunis - synthèse générale sur l'état du golfe de Tunis (Technical report), Etude de preinvestissement relative a la depollution du Golf de Tunis, Tunisie. Ministere de l'Environnement et du Développement durable, Tunis, Tunisie.

COMETE Engineering. 2001. Zone sensible Bordj El H'ssar – Kerkennah. 105 p.

Conti, M.E., Iacobucci, M., Cecchetti, G., 2007. A biomonitoring study: trace metals in seagrass, algae and molluscs in a marine reference ecosystem (Southern Tyrrhenian Sea). *International Journal of Environment and Pollution* 29, 308–332. <https://doi.org/10.1504/IJEP.2007.012808>

Conti, M.E., Mele, G., Finoia, M.G., 2017. Baseline trace metals in *Patella caerulea* in a central Tyrrhenian ecosystem (Pontine Islands archipelago and Lazio region coastal sites, Italy). *Environ Sci Pollut Res Int* 24, 8852–8865. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8572-x>

Convention de Barcelone, n.d. Décret n° 2014-1195 du 16 octobre 2014 portant publication de l'amendement de la liste des annexes II et III du protocole relatif aux aires spécialement protégées et à la diversité biologique en Méditerranée, signé à Barcelone le 10 juin 1995, adopté à Marrakech le 5 novembre 2009 (1) - Légifrance.

Convention de Berne, n.d. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats (ETS No. 104).

Côrte-Real, H.B.S.M., Hawkins, S.J., Thorpe, J.P., 1996a. An Interpretation of the taxonomic relationship between the limpets *Patella Rustica* and *P. Piperata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 76, 717–732. <https://doi.org/10.1017/S0025315400031416>

Côrte-Real, H.B.S.M., Hawkins, S.J., Thorpe, J.P., 1996b. Population differentiation and taxonomic status of the exploited limpet *Patella candei* in the Macaronesian islands (Azores, Madeira, Canaries). *Marine Biology* 125, 141–152.

Cowen, R.K., Paris, C.B., Srinivasan, A., 2006. Scaling of Connectivity in Marine Populations. *Science* 311, 522–527. <https://doi.org/10.1126/science.1122039>

Cravo, A., Bebianno, M.J., Foster, P., 2004. Partitioning of trace metals between soft tissues and shells of *Patella aspera*. *Environment International* 30, 87–98. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00154-5)

Cretella, M., Toscano, F., Scillitani, G., Picariello, O., 1990. Comparative morphology of soft parts of *Patella* L., 1758 from the Bay of Naples (Gastropoda: Patellidae).

Cronan, C.S., Schofield, C.L., 1979. Aluminum leaching response to acid precipitation: effects on high-elevation watersheds in the Northeast. *Science* 204, 304–306. <https://doi.org/10.1126/science.204.4390.304>

Cubadda, F., Conti, M.E., Campanella, L., 2001. Size-dependent concentrations of trace metals in four Mediterranean gastropods. *Chemosphere* 45, 561–569. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00013-3)

Cunningham, P., 1979. The use of bivalve molluscs in heavy metal pollution research. pp. 183–221. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-718260-5.50014-1>

Cutler, R.G., 1984. Urate and ascorbate: their possible roles as antioxidants in determining longevity of mammalian species. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 3, 321–348. [https://doi.org/10.1016/0167-4943\(84\)90033-5](https://doi.org/10.1016/0167-4943(84)90033-5)

Daby, D., 2006. Coastal pollution and potential biomonitors of metals in Mauritius. *Water Air Soil Pollut* 174, 63–91. <https://doi.org/10.1007/s11270-005-9035-4>

Daget, J., 1978. Les modèles mathématiques en écologie. *Limnology and Oceanography*, J. 1976. Les 23, 575–576. <https://doi.org/10.4319/lo.1978.23.3.0575>

Dagnino, A., Allen, J.I., Moore, M.N., Broeg, K., Canesi, L., Viarengo, A., 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers* 12, 155–172. <https://doi.org/10.1080/13547500601037171>

Daguzan, J., 1975. Contribution à l'écologie des Littorinidae (Mollusques Gastéropodes Prosobranches): recherches écophysiologicals chez quatre espèces, *Littorina neritoides* (L.), *Littorina saxatilis* (Olivi), *Littorina littorea* (L.), et *Littorina littoralis* (L.). Université.

Dallinger, R., Berger, B., Gruber, C., Hunziker, P., Stürzenbaum, S., 2000. Metallothioneins in terrestrial invertebrates: structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46, 331–346.

Dammak-Zouari, H., Hamza, A., Bouain, A., 2009. Gymnodiniales in the Gulf of Gabes (Tunisia). *Cahiers de Biologie Marine* 50, 153–170.

Davies, M.S., Beckwith, P., 1999. Role of mucus trails and trail-following in the behaviour and nutrition of the periwinkle *Littorina littorea*. *Marine Ecology Progress Series* 179, 247–257.

Davies, M.S., Cliffe, E.J., 2000. Adsorption of Metals in Seawater to Limpet (*Patella vulgata*) Pedal Mucus. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 228–234. <https://doi.org/10.1007/s001289910034>

De Almeida, E.A., Miyamoto, S., Bairy, A.C.D., de Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2004. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.02.020>

De Lisa, E., Carella, F., De Vico, G., Di Cosmo, A., 2013. The gonadotropin releasing hormone (GnRH)-like molecule in prosobranch *Patella caerulea*: potential biomarker of endocrine-disrupting compounds in marine environments. *Zoolog Sci* 30, 135–140. <https://doi.org/10.2108/zsj.30.135>

De Pirro, M., Chelazzi, G., Borghini, F., Focardi, S., 2001. Variations in Cardiac Activity Following Acute Exposure to Copper in Three Co-occurring but Differently Zoned Mediterranean Limpets. *Marine Pollution Bulletin* 42, 1390–1396. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00169-2)

De Wolf, H., Backeljau, T., Blust, R., 2000. Heavy metal accumulation in the periwinkle *Littorina littorea*, along a pollution gradient in the Scheldt estuary. *Sci Total Environ* 262, 111–121. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(00\)00601-x](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(00)00601-x)

Deb, S.C., Fukushima, T., 1999. Metals in aquatic ecosystems: mechanisms of uptake, accumulation and release-Ecotoxicological perspectives. *International Journal of Environmental Studies* 56, 385–417. <https://doi.org/10.1080/00207239908711212>

Depledge, M., Rainbow, P., 1990. Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 97. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(90\)90163-4](https://doi.org/10.1016/0742-8413(90)90163-4)

Depledge, M.H., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools, in: *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. CRC Press.

Desouky, M., 2012. Metallothionein is up-regulated in molluscan responses to cadmium, but not aluminum, exposure. *The Journal of Basic & Applied Zoology* 65, 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2012.07.008>

Didierlaurent, S., Noël, P., 2021. *Patella caerulea* | DORIS [WWW Document]. URL <https://doris.ffessm.fr/Especies/Patella-caerulea-Patelle-bleue-1845> (accessed 3.17.22).

Dinis, T.C., Maderia, V.M., Almeida, L.M., 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 315, 161–169. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1485>

Dinter, I., Manos, P.J., 1972. Evidence of a pheromone in the marine periwinkle *Littorina littorea*., in: *The Veliger*. California Malacozoological Society., Berkeley, CA :, pp. 45–47.

Doellman, M.M., Trussell, G.C., Grahame, J.W., Vollmer, S.V., 2011. Phylogeographic analysis reveals a deep lineage split within North Atlantic *Littorina saxatilis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278, 3175–3183. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0346>

Doglioli, A.M., 2020. Notes sur la Circulation Générale en Méditerranée pour le cours d'Océanographie Générale, Université d'Aix-Marseille, Marseille, France. https://people.mio.osupytheas.fr/~doglioli/Doglioli_NotesCours_CirculationGeneraleMediterranee.pdf

Donald, K., Kennedy, M., Spencer, H., 2005. Cladogenesis as the result of long-distance rafting events in South Pacific topshells (Gastropoda, Trochidae). *Evolution; international journal of organic evolution* 59, 1701–11. <https://doi.org/10.1554/04-553.1>

Dorta, D.J., Leite, S., DeMarco, K.C., Prado, I.M.R., Rodrigues, T., Mingatto, F.E., Uyemura, S.A., Santos, A.C., Curti, C., 2003. A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *J. Inorg. Biochem.* 97, 251–257. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(03\)00314-3](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(03)00314-3)

Douhri, H., Sayah, F., 2009. The use of enzymatic biomarkers in two marine invertebrates *Nereis diversicolor* and *Patella vulgata* for the biomonitoring of Tangier's bay (Morocco). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 394–399. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.07.016>

Doyle, JJ, Doyle, JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.

Dira, Z., 2009. Contribution à la compréhension du fonctionnement du golfe de Gabès : étude des caractéristiques dynamiques et structurales des communautés phyto-zooplanctoniques en relation avec la variabilité environnementale et les caractéristiques hydrographiques des zones côtières et océaniques (thesis). <http://www.theses.fr>. Besançon.

Dira, Z., 2018. Evaluation de la qualité des eaux de la zone côtière du golfe de Gabès à travers l'analyse physico chimique et zooplanctonique : Cas des côtes sud et nord de Sfax et de la zone de Ghannouch. Habilitation à diriger des recherches. (HDR). Faculté des sciences de Sfax.

Driscoll, C.T., Schecher, W.D., 1990. The chemistry of aluminum in the environment. *Environ Geochem Health* 12, 28–49. <https://doi.org/10.1007/BF01734046>

Duft, M., Schmitt, C., Bachmann, J., Brandelik, C., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., 2007. Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals- an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecotoxicology* 16, 169–182. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0106-0>

Duysak, Ö., Azdural, K., 2017. Evaluation of Heavy Metal and Aluminium Accumulation in a Gastropod, *Patella caerulea* L., 1758 in Iskenderun Bay, Turkey. *Pakistan journal of zoology* 49, 629–637. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.2.629.637>

EC, 2011. Commission Regulation (EU) No 420/2011 of 29 April 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance).

EFSA, 2011. Statement on tolerable weekly intake for cadmium. *EFSA Journal* 9, 1975. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1975>

El Ayari, T., Bierne, N., El Menif, N.T., 2018. Imposex incidence in *Stramonita haemastoma* (Gastropoda: Muricidae) from the Mediterranean and Atlantic coast after

Tributyltin global ban. *Journal of Sea Research* 134, 10–15.
<https://doi.org/10.1016/j.seares.2017.12.004>

El Rayis, O., Aboul-Dahab, M., Halim, Y., Riley J., 1997. Metal accumulation in Mex Bey. 7th International Conference « Environmental Protection is a must », Alexandria, Egypt., 53 – 59.

El Zrelli, R., Courjault-Radé, P., Rabaoui, L., Castet, S., Michel, S., Bejaoui, N., 2015. Heavy metal contamination and ecological risk assessment in the surface sediments of the coastal area surrounding the industrial complex of Gabes city, Gulf of Gabes, SE Tunisia. *Marine Pollution Bulletin* 101, 922–929. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.10.047>

Elangovan, R., White, K.N., McCrohan, C.R., 1997. Bioaccumulation of aluminium in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* at neutral pH. *Environmental Pollution* 96, 29–33. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(97\)00009-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00009-2)

Elderfield, H., Schultz, A., 1996. Mid-Ocean Ridge Hydrothermal Fluxes and the Chemical Composition of the Ocean. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 24, 191–224. <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.24.1.191>

El-Geziry, T.M., Bryden, I.G., 2010. The circulation pattern in the Mediterranean Sea: issues for modeller consideration. *Journal of Operational Oceanography* 3, 39–46. <https://doi.org/10.1080/1755876X.2010.11020116>

Ennouri, R., Chouba, L., Magni, P., Kraiem, M.M., 2010. Spatial distribution of trace metals (Cd, Pb, Hg, Cu, Zn, Fe and Mn) and oligo-elements (Mg, Ca, Na and K) in surface sediments of the Gulf of Tunis (Northern Tunisia). *Environ Monit Assess* 163, 229–239. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-0829-5>

Ensibi, C., Pringault, O., Hannaoui, W., Daly Yahya, M.N., 2015. Effects of Cadmium Exposure on Reproduction and Survival of the Planktonic Copepod *Centropages ponticus*. <https://doi.org/10.4172/2155-9910.1000159>

Eschweiler, N., Molis, M., Buschbaum, C., 2009. Habitat-specific size structure variations in periwinkle populations (*Littorina littorea*) caused by biotic factors. *Helgol Mar Res* 63, 119–127. <https://doi.org/10.1007/s10152-008-0131-x>

Espinosa, F., 2009. Populational status of the endangered mollusc *Patella ferruginea* Gmelin, 1791 (Gastropoda, Patellidae) on Algerian islands (SW Mediterranean). *Animal biodiversity and conservation*, ISSN 1578-665X, Vol. 32, No. 1, 2009, pags. 19-28 32. <https://doi.org/10.32800/abc.2009.32.0019>

Espinosa, F., González, A.R., Maestre, M.J., Fa, D., Guerra-García, J.M., García-Gómez, J.C., 2008. Responses of the endangered limpet *Patella ferruginea* to reintroduction under different environmental conditions: survival, growth rates and life-history. *Italian Journal of Zoology* 75, 371–384. <https://doi.org/10.1080/11250000801887740>

Espinosa, F., Guerra-García, J., García, J., 2007. Sewage pollution and extinction risk: An endangered limpet as a bioindicator? *Biodiversity and Conservation* 16, 377–397. <https://doi.org/10.1007/s10531-005-3014-3>

Espinosa, F., Rivera-Ingraham, G.A., 2016. Subcellular evidences of redox imbalance in well-established populations of an endangered limpet. Reasons for alarm? Mar. Pollut. Bull. 109, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.019>

Esposito, G., Pastorino, P., Prearo, M., 2022. Environmental stressors and pathology of marine molluscs. Journal of Marine Science and Engineering 10, 313. <https://doi.org/10.3390/jmse10030313>

Essack, S.Y., 2018. Environment: the neglected component of the One Health triad. The Lancet Planetary Health 2, e238–e239. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(18\)30124-4](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30124-4)

Ettajani, H., Berthet, B., Amiard, J.C., Chevolut, L., 2001. Determination of Cadmium Partitioning in Microalgae and Oysters: Contribution to the Assessment of Trophic Transfer. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40, 209–221. <https://doi.org/10.1007/s002440010165>

Exley, C., Mold, M.J., 2015. The binding, transport and fate of aluminium in biological cells. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, Special Section: Iron and Obesity 30, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.11.002>

Farombi, E.O., Adelowo, O.A., Ajimoko, Y.R., 2007. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. Int J Environ Res Public Health 4, 158–165. <https://doi.org/10.3390/ijerph2007040011>

Fatima, S., Iqbal, K.J., Atique, U., Javid, A., Khan, N., Iqbal, S., Majeed, H., Azmat, H., Khan, B.Y.A., Irfan, I., Shahid, M.T., Afzal, G., 2020. Toxic trace metals assessment in selected organs of edible fish species, sediment and water in Head Punjnad, Punjab, Pakistan. Punjab Univ. J. Zool. 35. <https://doi.org/10.17582/journal.pujz/2020.35.1.43.50>

Favier, A., 2003. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. undefined.

Feki, M., Brahim, M., Feki, W., MAHFOUDI, M., Sammari, C., Hamza, A., 2016. Seasonal and daily fluctuation of dinoflagellates during spring tide periods in kerkennah islands (southern coast of Tunisia). VIE ET MILIEU - LIFE AND ENVIRONMENT 66, 1–12.

Fernández, B., Campillo, J.A., Martínez-Gómez, C., Benedicto, J., 2010a. Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. Aquat Toxicol 99, 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.013>

Fernández, B., Campillo, J.A., Martínez-Gómez, C., Benedicto, J., 2010b. Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. Aquatic Toxicology 99, 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.013>

Fernández, N., Alborés, I., Aceña-Matarranz, S., 2016. Spatial variability of the reproductive cycle and physiological condition of *Patella* spp. (Mollusca Gastropoda) in the

NW of the Iberian Peninsula: Implications for exploitation. *Fisheries Research* C, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.02.010>

Figuerola, J., Green, A.J., 2002. Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshwater Biology* 47, 483–494. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2002.00829.x>

Fischer, W., Schneider, M., Bauchot, M.-L., Fisheries and Aquaculture Management Division, 1987. Fiches FAO d'identification des especes pour les besoins de la pêche. Méditerranée et Mer Noire (Zone De Pêche 37), Révision 1, Volume 2, FAO Species Identification Sheets for Fishery Purposes. FAO, Rome, Italy.

Fischer-Piette, E., 1948. Sur les éléments de prospérité des patelles et sur leur spécificité. *Journal de conchyliologie* 45–96.

Fischer-Piette, E., Gaillard, J.M., 1959. Les patelles, au long des Cotes Atlantiques iberiques et nord-marocaines. *Journal de Conchyliologie* 135–200.

Flohé, L., Günzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase, in: *Methods in Enzymology, Oxygen Radicals in Biological Systems*. Academic Press, pp. 114–120. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1)

Flora, S., Flora, G., Saxena, G., 2006. Environmental occurrence, health effects and management of lead poisoning. <https://doi.org/10.1016/B978-044452945-9/50004-X>

Fonollosa, E., Peñalver, A., Aguilar, C., Borrull, F., 2017. Bioaccumulation of natural radionuclides in molluscs from the Ebro Delta area. *Environ Sci Pollut Res* 24, 208–214. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7783-x>

Forbers, V.E., Rivière, J.-L., Forbes, T.L., 1997. *Ecotoxicologie: théorie et applications, Du labo au terrain*. Institut national de la recherche agronomique, Paris.

Foster, P., Chacko, J., 1995. Minor and trace elements in the shell of *Patella vulgata* (L.). *Marine Environmental Research* 40, 55–76. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(94\)00005-A](https://doi.org/10.1016/0141-1136(94)00005-A)

Frazier, J.M., 1979. Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Environmental Health Perspectives* 28, 75–79. <https://doi.org/10.1289/ehp.792875>

Frenzilli, G., Bocchetti, R., Pagliarecci, M., Nigro, M., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Regoli, F., 2004. Time-course evaluation of ROS-mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Mar. Environ. Res.* 58, 609–613. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.050>

Fretter, V., Graham, A., 1972. *British Prosobranch Molluscs. Their functional anatomy and ecology. With 317 fig., 755 pp.* - London: Ray Society (Ray Society Publication No. 144, 1962). Reprint: London: Walter J. Johnson Ltd. £ 8 8s. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 57, 953–953. <https://doi.org/10.1002/iroh.19720570626>

Frontier, S., 1976. Utilisation des diagrammes rang-fréquence dans l'analyse des écosystèmes- fdi:03630- Horizon. J. Rech. Oceanogr 1, 35–48.

Fu, Y.X., Li, W.H., 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics 133, 693–709. <https://doi.org/10.1093/genetics/133.3.693>

Gabbott, P.A., 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis.

Gabelle, C., Baraud, F., Biree, L., Gouali, S., Hamdoun, H., Rousseau, C., Van Veen, E., Leleyter, L., 2012. The impact of aluminium sacrificial anodes on the marine environment: A case study. Applied Geochemistry 27. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2012.07.001>

Gaitonde, D., Sarkar, A., Kaisary, S., Silva, C.D., Dias, C., Rao, D.P., Ray, D., Nagarajan, R., De Sousa, S.N., Sarker, S., Patill, D., 2006. Acetylcholinesterase activities in marine snail (*Cronia contracta*) as a biomarker of neurotoxic contaminants along the Goa coast, West coast of India. Ecotoxicology 15, 353–358. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0075-3>

Galarza, J.A., Carreras-Carbonell, J., Macpherson, E., Pascual, M., Roques, S., Turner, G.F., Rico, C., 2009. The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species. PNAS 106, 1473–1478. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806804106>

Garric, J., Morin, S., Vincent-Hubert, F., 2010. Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage. <https://doi.org/10.14758/SET-REVUE.2010.1.03>

Gaume, B., Bourgougnon, N., Auzoux-Bordenave, S., Roig, B., Le Bot, B., Bedoux, G., 2012. In vitro effects of triclosan and methyl-triclosan on the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 156, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.04.006>

Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Mouneyrac, C., 2001. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site. Biomarkers 6, 91–107. <https://doi.org/10.1080/13547500010000860>

Gensemer, R., Playle, R., 1999. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. Critical Reviews in Environmental Science and Technology - CRIT REV ENVIRON SCI TECHNOL 29, 315–450. <https://doi.org/10.1080/10643389991259245>

Gensemer, R.W., Gondek, J.C., Rodriguez, P.H., Arbildua, J.J., Stubblefield, W.A., Cardwell, A.S., Santore, R.C., Ryan, A.C., Adams, W.J., Nordheim, E., 2018. Evaluating the effects of pH, hardness, and dissolved organic carbon on the toxicity of aluminum to freshwater aquatic organisms under circumneutral conditions. Environmental Toxicology and Chemistry 37, 49–60. <https://doi.org/10.1002/etc.3920>

Gensemer, R.W., Playle, R.C., 1999. The Bioavailability and Toxicity of Aluminum in Aquatic Environments. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 29, 315–450. <https://doi.org/10.1080/10643389991259245>

Ghannem, N., Azri, C., Serbaji Mohammed, M., Yaich, C., 2010. Spatial distribution of heavy metals in the coastal zone of “Sfax-Kerkennah” plateau, Tunisia. *Environmental Progress & Sustainable Energy* 30, 221–233. <https://doi.org/10.1002/ep.10462>

Ghannem, N., Gargouri, D., Sarbeji, M.M., Yaich, C., Azri, C., 2014. Metal contamination of surface sediments of the Sfax–Chebba coastal line, Tunisia. *Environmental earth sciences*.

Ghosn, M., Mahfouz, C., Chekri, R., Ouddane, B., Khalaf, G., Guérin, T., Amara, R., Jitaru, P., 2020. Assessment of trace element contamination and bioaccumulation in algae (*Ulva lactuca*), bivalves (*Spondylus spinosus*) and shrimps (*Marsupenaeus japonicus*) from the Lebanese coast. *Regional Studies in Marine Science* 39, 101478. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101478>

Gibson, J.S., 1970. The Function of the operculum of *Thais lapillus* (L.) in resisting desiccation and predation. *Journal of Animal Ecology* 39, 159–168. <https://doi.org/10.2307/2893>

Goldberg, E.D., 1975. The mussel watch — A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 6, 111. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(75\)90271-4](https://doi.org/10.1016/0025-326X(75)90271-4)

Golding, L.A., Angel, B.M., Batley, G.E., Apte, S.C., Krassoi, R., Doyle, C.J., 2015. Derivation of a water quality guideline for aluminium in marine waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34, 141–151. <https://doi.org/10.1002/etc.2771>

Gorbushin, A.M., 2018. Immune repertoire in the transcriptome of *Littorina littorea* reveals new trends in lophotrochozoan proto-complement evolution. *Dev Comp Immunol* 84, 250–263. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.02.018>

Gourlay-Francé, C., Delmas, F., Mazzella, N., Tusseau-Vuillemin, M.H., 2010. Que sait-on de la biodisponibilité des contaminants dissous dans le milieu aquatique, *Sciences Eaux & Territoires* 6–11. <https://doi.org/10.14758/SET-REVUE.2010.1.02>

Govaert, G., Nadif, M., 2006. Fuzzy clustering to estimate the parameters of block mixture models. *Soft Computing* 10, 415–422. <https://doi.org/10.1007/s00500-005-0502-z>

Grajales, A., Aguilar, C., Sánchez, J.A., 2007. Phylogenetic reconstruction using secondary structures of Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2, rDNA): finding the molecular and morphological gap in Caribbean gorgonian corals. *BMC Evolutionary Biology* 7, 90. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-90>

Grall, J., Glemarec, M., 2003. L'indice d'évaluation de l'endofaune côtière I2EC, Bioévaluation de la qualité environnementale des sédiments portuaires et des zones d'immersion (pp. 51-86) : Editions Ifremer

Green, A.J., Jenkins, K.M., Bell, D., Morris, P.J., Kingsford, R.T., 2008. The potential role of waterbirds in dispersing invertebrates and plants in arid Australia. *Freshwater Biology* 53, 380–392. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01901.x>

Hamed, M.A., Emara, A.M., 2006. Marine molluscs as biomonitors for heavy metal levels in the Gulf of Suez, Red Sea. *Journal of Marine Systems* 3–4, 220–234. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2005.09.007>

Hamza-Chaffai, A., Amiard, J.C., Pellerin, J., Joux, L., Berthet, B., 2000. The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 127, 185–197. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(00\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(00)00147-X)

Hamza-Chaffai, A., Pellerin, J., Amiard, J.C., 2003. Health assessment of a marine bivalve *Ruditapes decussatus* from the Gulf of Gabès (Tunisia). *Environ Int* 28, 609–617. [https://doi.org/10.1016/s0160-4120\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/s0160-4120(02)00102-2)

Harrabi, M., Varela Della Giustina, S., Aloulou, F., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., Elleuch, B., 2018. Analysis of multiclass antibiotic residues in urban wastewater in Tunisia. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management* 10, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.05.006>

Hattour, A., Ben Mustapha, K., 2013. Le couvert vegetal marin du golfe de Gabes: cartographie et reseau de surveillance de l'herbier de posidonie. Institut national des sciences et technologies de la mer.

Hawkins, A.J.S., Bayne, B.L., 1984. Seasonal variation in the balance between physiological mechanisms of feeding and digestion in *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mollusca). *Marine Biology* 82, 233–240. <https://doi.org/10.1007/BF00392404>

Hawkins, S.J., Corte-Real, H.B.S.M., Pannacciulli, F.G., Weber, L.C., Bishop, J.D.D., 2000. Thoughts on the ecology and evolution of the intertidal biota of the Azores and other Atlantic islands. *Hydrobiologia* 440, 3–17. <https://doi.org/10.1023/A:1004118220083>

Hawkins, S.J., Hartnoll, R.G., 1983. Grazing of intertidal algae by marine invertebrates. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci* 270, 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

Hédouin, L., Metian, M., Teyssié, J.-L., Fowler, S.W., Fichez, R., Warnau, M., 2006. Allometric relationships in the bioconcentration of heavy metals by the edible tropical clam *Gafrarium tumidum*. *Sci Total Environ* 366, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.10.022>

HELCOM, 2019. Guidelines for sampling and determination of pH in seawater - expert interview: Jannica Haldin on biodiversity. URL <https://helcom.fi/helcom-expert-interview-jannica-haldin-on-biodiversity/> (accessed 6.12.21).

Helmuth, B., Mieszkowska, N., Moore, P., Hawkins, S.J., 2006. Living on the Edge of Two Changing Worlds: Forecasting the Responses of Rocky Intertidal Ecosystems to Climate Change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37, 373–404. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110149>

Henriques, P., Delgado, J., Sousa, R., 2017. Patellid limpets: An overview of the biology and conservation of keystone species of the rocky shores, in: Ray, S. (Ed.), *Organismal and Molecular Malacology*. IntechOpen, Zagreb, Croatia, pp. 71–95. <https://doi.org/10.5772/67862>

Herut, B., Kress, N., Shefer, E., Hornung, H., 1999. Trace element levels in mollusks from clean and polluted coastal marine sites in the Mediterranean, Red and North Seas. *Helgoland Marine Research* 53, 154–162. <https://doi.org/10.1007/s101520050021>

Hewitt, G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907–913. <https://doi.org/10.1038/35016000>

Highsmith, R., 1985. Floating and algal rafting as potential dispersal mechanisms in brooding invertebrates. <https://doi.org/10.3354/MEPS025169>

Hodgson, A.N., Ridgway, S., Branch, G.M., Hawkins, S.J., 1996. Spermatozoan morphology of 19 species of prosobranch limpets (Patellogastropoda) with a discussion of patellid relationships. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 351, 339–347. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0027>

Hoffmann, D., Angelucci, D., Villaverde, V., Zapata, J., Zilhão, J., 2018. Symbolic use of marine shells and mineral pigments by Iberian Neandertals 115,000 years ago. *Science Advances* 2018. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar5255>

Howard, A.G., Nickless, G., 1977. Heavy metal complexation in polluted molluscs I. Limpets (*Patella vulgata* and *Patella intermedia*). *Chemico-Biological Interactions* 16, 107–114. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(77\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0009-2797(77)90157-0)

Huet, M., Fioroni, P., Oehlmann, J., Stroben, E., 1995. Comparison of imposex response in three Prosobranch species. *Hydrobiologia* 309, 29–35. <https://doi.org/10.1007/BF00014469>

Hung, T.C., Meng, P.J., Han, B.C., Chuang, A., Huang, C.C., 2001. Trace metals in different species of mollusca, water and sediments from Taiwan coastal area. *Chemosphere* 44, 833–841. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(00\)00491-4](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(00)00491-4)

Hyman, L.H., 1967. *The Invertebrates*, 1st edition. ed, *Mollusca I: Aplacophora, Polyplacophora, Monoplacophora, Gastropoda*. McGraw-Hill.

Icarus, J., Moore, M.N., 2004. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? *Marine Environmental Research, Twelfth International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms* 58, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.119>

Ifremer, 1995. *RNO. Surveillance du milieu marin. Travaux du réseau national d'observation de la qualité du milieu marin*. Edition 1995.

Ikpesu, T., Ogbomida, E., 2017. Occurrence of pesticides residues in soft tissue of *Buccinum undatum* and *Littorina littorea* from Brackish water and intertidal zone of the lower Atlantic ocean. *International Journal of Food Safety, Nutrition, Public Health and Technology* 9, 975–8712.

INS, 2013. Répertoire National des Entreprises [WWW Document]. Institut National des Statistiques. URL <http://ins.tn/fr/methode-1> (accessed 5.12.20).

Ivanina, A.V., Hawkins, C., Sokolova, I.M., 2014. Immunomodulation by the interactive effects of cadmium and hypercapnia in marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Fish & Shellfish Immunology* 37, 299–312. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.02.016>

Ivanina, A.V., Sokolova, I.M., 2015. Interactive effects of metal pollution and ocean acidification on physiology of marine organisms. *Current Zoology* 61, 653–668. <https://doi.org/10.1093/czoolo/61.4.653>

Jarraya, M., Hellal, M., 2014. Le territoire insulaire de l'archipel de Kerkennah (centre-Est tunisien).

Jebali, J., Banni, M., Almeida, E.A.D., Boussetta, H., 2007. Oxidative DNA damage levels and catalase activity in the clam *Ruditapes decussatus* as pollution biomarkers of Tunisian marine environment. *Environ Monit Assess* 124, 195–200. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9217-6>

Jeffreys, J.G., Sowerby, G.B., Sowerby, W., 1862. *British conchology, or, An account of the Mollusca which now inhabit the British Isles and the surrounding seas*. John Van Voorst, London.

Jenkins, S.R., Arenas, F., Arrontes, J., Bussell, J., Castro, J., Coleman, R.A., Hawkins, S.J., Kay, S., Martínez, B., Oliveros, J., F.Roberts, M., Sousa, S., Thompson, R.C., Hartnoll, R.G., 2001. European-scale analysis of seasonal variability in limpet grazing activity and microalgal abundance. *Marine Ecology Progress Series* 211, 193–203. <https://doi.org/10.3354/meps211193>

Jenkins, T.L., Castilho, R., Stevens, J.R., 2018. Meta-analysis of northeast Atlantic marine taxa shows contrasting phylogeographic patterns following post-LGM expansions. *PeerJ* 6, e5684. <https://doi.org/10.7717/peerj.5684>

Jensen, S.J.K., 2003. Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM Complete*, 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2003.08.037>

Johannesson, K., 2003. Evolution in *Littorina*: Ecology matters. *Journal of Sea Research* 49, 107–117. [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(02\)00218-6](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(02)00218-6)

Johnson, M.P., 2005. Is there confusion over what is meant by 'open population'? *Hydrobiologia* 544, 333–338. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1698-8>

Jones, M.-A., Stauber, J., Apte, S., Simpson, S., Vicente-Beckett, V., Johnson, R., Duivenvoorden, L., 2005. A risk assessment approach to contaminants in Port Curtis, Queensland, Australia. *Mar Pollut Bull* 51, 448–458. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.10.021>

Kallouche, M. el mustapha, 2018. Répartition et aspect écologique de la patelle commune méditerranéenne *Patella caerulea* (Linnaeus, 1758) : Côte Oranaise, Algérie nord occidentale. Université d'Oran.

Kang, S.-G., Choi, M.-S., Oh, I.-S., Wright, D.A., Koh, C.-H., 1999. Assessment of metal pollution in Onsan Bay, Korea using Asian periwinkle *Littorina brevicula* as a biomonitor. Science of The Total Environment 234, 127–137. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00168-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00168-0)

Kannan, K., Jain, S.K., 2000. Oxidative stress and apoptosis. Pathophysiology 7, 153–163. [https://doi.org/10.1016/s0928-4680\(00\)00053-5](https://doi.org/10.1016/s0928-4680(00)00053-5)

Karlsson, T.M., Vethaak, A.D., Almroth, B.C., Ariese, F., van Velzen, M., Hassellöv, M., Leslie, H.A., 2017. Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: Method development and microplastic accumulation. Mar Pollut Bull 122, 403–408. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.081>

Kaste, Ø., Skarbøvik, E., Greipsland, I., Gundersen, C.B., Austnes, K., Skancke, L.B., Guerrero, J.-L., Sample, J.E., 2018. The Norwegian river monitoring programme – water quality status and trends 2017. Norsk institutt for vannforskning.

Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Molecular Biology and Evolution 30, 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Keough, M.J., Quinn, G.P., King, A., 1993. Correlations between Human Collecting and Intertidal Mollusc Populations on Rocky Shores. Conservation Biology 7, 378–390. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1993.07020378.x>

Khebbeb, M.E., Nadji, S., Amrani, A., 2010. The effect of cadmium exposure on malonaldehyde and reduced glutathione concentrations in several tissues of a bivalve mollusc (*Ruditapes decussatus*) fished from Mellah lagoon (North East of Algeria). Annals of Biological Research 1, 166–173.

Kim, S.-J., Rodriguez-Lanetty, M., Suh, J.-H., Song, J.-I., 2003. Emergent effects of heavy metal pollution at a population level: *Littorina brevicula* a study case. Marine Pollution Bulletin 46, 74–80. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00319-3](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00319-3)

Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. J Biol Chem 257, 5751–5754.

Kordel, W., Dassenakis, M., Lintemann, J., Padberg, 1997. The importance of natural organic material for environmental processes in waters and soils. IUPAC Pure Appl Chem 69.

Koufopanou, V., Reid, D.G., Ridgway, S.A., Thomas, R.H., 1999. A molecular phylogeny of the patellid limpets (Gastropoda: Patellidae) and its implications for the origins of their antitropical distribution. Mol Phylogenet Evol 11, 138–156. <https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0557>

Kremling, K., 1976. Determination of trace metals, in: *Methods of Seawater Analysis*. Strauss Offsetdruck, D-69509 Morlenbac, pp. 183–191.

Kumar, G., Kunal, S., Menezes, M., 2012. Genetic Stock Structure of Frigate Tuna (*Auxis thazard*) Along Indian Coast Based on PCR-RFLP Analyses of mtDNA D-Loop Region. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 12, 893–903.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

La Colla, N.S., Botté, S.E., Simonetti, P., Negrin, V.L., Serra, A.V., Marcovecchio, J.E., 2021. Water, sediments and fishes: First multi compartment assessment of metal pollution in a coastal environment from the SW Atlantic. *Chemosphere* 282, 131131. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131131>

Labrot, F., Ribera, D., Denis, M.S., Narbonne, J.F., 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers* 1, 21–28. <https://doi.org/10.3109/13547509609079343>

Ladhar-Chaabouni, R., Machreki-Ajmi, M., Hamza-Chaffai, A., 2012. Use of metallothioneins as biomarkers for environmental quality assessment in the Gulf of Gabès (Tunisia). *Environ Monit Assess* 184, 2177–2192. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2108-5>

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions (introduction), in: *Biomarqueurs En Écotoxicologie, Aspects Fondamentaux*. Elsevier Mason SAS.

Lavilla, I., Valverde, F., Gil, S., Costas, M., Pena-Pereira, F., Bendicho, C., 2011. Determination of total lead and lead species according to their lability in coastal seawater by Chelex-100 titration and electrothermal-atomic absorption spectrometry. *Chemical Speciation and Bioavailability* 23, 229–236. <https://doi.org/10.3184/095422911X13200816298430>

Le Roux, A., 2008. Les patelles (*Patella vulgata* L.), agents de la destruction de la couverture algale des estrans rocheux du Golfe du Morbihan. *Bulletin Société Sciences Naturelles ouest de la France* 30, 162–180.

Lee, H.J., Boulding, E.G., 2009. Spatial and temporal population genetic structure of four northeastern Pacific littorinid gastropods: the effect of mode of larval development on variation at one mitochondrial and two nuclear DNA markers. *Mol Ecol* 18, 2165–2184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04169.x>

Lewis, C., Guitart, C., Pook, C., Scarlett, A., Readman, J.W., Galloway, T.S., 2010. Integrated assessment of oil pollution using biological monitoring and chemical fingerprinting. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 1358–1366. <https://doi.org/10.1002/etc.156>

Li, L., Zheng, B., Liu, L., 2010. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. *Energy Policy - ENER POLICY* 2, 1510–1524. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2010.10.164>

Li, X., Hou, X., Mao, Q., Zhao, Y., Cheng, Y., Wang, Q., 2009. Toxic Effects of Copper on antioxidative and metabolic enzymes of the marine gastropod, *Onchidium struma*. Archives of environmental contamination and toxicology 56, 776–84. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9290-2>

Lima, F.P., Queiroz, N., Ribeiro, P.A., Hawkins, S.J., Santos, A.M., 2006. Recent Changes in the Distribution of a Marine Gastropod, *Patella rustica* Linnaeus, 1758, and Their Relationship to Unusual Climatic Events. Journal of Biogeography 33, 812–822.

Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E., Pascariello, M.F., Marinosci, L., Schettino, T., 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. Marine Pollution Bulletin 46, 324–330. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00403-4](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00403-4)

Locard, A., 1886. Catalogue général des mollusques vivants de France. Mollusques marins. Librairie Henri Georg, Lyon,.

López-Barea, J., 1995. Biomarkers in Ecotoxicology: an Overview, in: Degen, G.H., Seiler, J.P., Bentley, P. (Eds.), Toxicology in Transition, Archives of Toxicology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 57–79. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79451-3_6

Louzon, M., Pauget, B., Gimbert, F., Morin-Crini, N., de Vaufléury, A., 2020. Ex situ environmental risk assessment of polluted soils using threshold guide values for the land snail *Cantareus aspersus*. Science of The Total Environment 721, 137789. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137789>

Louzon, M., Pauget, B., Gimbert, F., Morin-Crini, N., Wong, J.W.Y., Zaldibar, B., Natal-da-Luz, T., Neuwirthova, N., Thiemann, C., Sarrazin, B., Irazola, M., Amiot, C., Rieffel, D., Sousa, J.P., Chalot, M., de Vaufléury, A., 2021. In situ and ex situ bioassays with *Cantareus aspersus* for environmental risk assessment of metal(loid) and PAH-contaminated soils. Integrated Environmental Assessment and Management 4480, 1–16. <https://doi.org/10.1002/ieam.4480>

Lowe, D.M., Moore, M.N., Bayne, B.L., 1982. Aspects of Gametogenesis in the Marine Mussel *Mytilus edulis* L. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 62, 133–145. <https://doi.org/10.1017/S0025315400020166>

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193, 265–275.

Lozano-Bilbao, E., Herranz, I., González-Lorenzo, G., Lozano, G., Hardisson, A., Rubio, C., González-Weller, D., Paz, S., Gutiérrez, Á.J., 2021. Limpets as bioindicators of element pollution in the coasts of Tenerife (Canary Islands). Environ Sci Pollut Res 28, 42999–43006. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15212-7>

Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquat. Toxicol. 101, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>

Lydersen, E., Salbu, B., Poleo, A.B.S., Muniz, W.P., 1990. The influences of temperature on aqueous aluminium chemistry. *Water Air Soil Pollut* 51, 203–215. <https://doi.org/10.1007/BF00158219>

Mabrouk, L., Hamza, A., Mahfoudi, M., Bradai, M., 2012. Spatial and temporal variations of epiphytic *Ostreopsis siamensis* on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves in Mahdia (Tunisia). *Cahiers de Biologie Marine* 53, 419–427.

Mann, S., 1988. Molecular recognition in biomineralization. *Nature* 332, 119–124. <https://doi.org/10.1038/332119a0>

Margalef, R., 1978. DAGET, J., 1976. Les modèles mathématiques en écologie. Masson, Paris. 172 p. 90F. *Limnology and Oceanography* 23, 575–576. <https://doi.org/10.4319/lo.1978.23.3.0575>

María, P., García-Estévez, N., García, J., Espinosa, F., Maestre, M., Pitarch-Moreno, C., Paramio, J., Cotaina, M., 2021. Recuperación del molusco protegido *Patella ferruginea* en peligro de extinción 50, 37–43.

Martins, G.M., Thompson, R.C., Hawkins, S.J., Neto, A.I., Jenkins, S.R., 2008. Rocky intertidal community structure in oceanic islands: scales of spatial variability. *Marine Ecology Progress Series* 356, 15–24.

Mason, A.Z., Nott, J.A., 1981. The role of intracellular biomineralized granules in the regulation and detoxification of metals in gastropods with special reference to the marine prosobranch *Littorina littorea*. *Aquatic Toxicology* 1, 239–256. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(81\)90018-7](https://doi.org/10.1016/0166-445X(81)90018-7)

Massabuau, J.-C., Fritz, B., Burtin, B., 1987. Mise en évidence de ruisseaux acides (pH<5) dans les Vosges. *Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie* 305, 121–124.

Mastouri, A., Chouba, L., El Abed, A., 1996. Etat environnemental du large des îles kerkennah synthèse des données bibliographiques.

Matson, C.W., Lambert, L.M., McDonald, T.J., Autenrieth, R.L., Donnelly, K.C., Islamzadeh, A., Politov, D.I., Bickham, J.W., 2006. Evolutionary Toxicology: Population-Level Effects of Chronic Contaminant Exposure on the Marsh Frogs (*Rana ridibunda*) of Azerbaijan. *Environmental Health Perspectives* 114, 547–552. <https://doi.org/10.1289/ehp.8404>

Maya, S., Prakash, T., Madhu, K.D., Goli, D., 2016. Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review. *Biomed Pharmacother* 83, 746–754. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.035>

McCoy, M.D., 2008. Hawaiian Limpet Harvesting in historical perspective: A review of modern and archaeological data on *Cellana* spp. from the Kalaupapa peninsula, Moloka'i Island. *pasc* 62, 21–38. [https://doi.org/10.2984/1534-6188\(2008\)62\[21:HLHIHP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2984/1534-6188(2008)62[21:HLHIHP]2.0.CO;2)

Ménot, G., Bard, E., Rostek, F., Weijers, J.W.H., Hopmans, E.C., Schouten, S., Damsté, J.S.S., 2006. Early Reactivation of European Rivers During the Last Deglaciation. *Science* 313, 1623–1625. <https://doi.org/10.1126/science.1130511>

Mensi, G.S., Moukha, S., Creppy, E.E., Maaroufi, M., 2008. Metals accumulation in marine bivalves and seawater from the lagoon of Boughrara in Tunisia [North Africa] 279–284.

Mezghani-Chaari, S., Machreki-Ajmi, M., Tremolet, G., Kellner, K., Geffard, A., Minier, C., Hamza-Chaffai, A., 2015. The endocrine-disrupting effect and other physiological responses of municipal effluent on the clam *Ruditapes decussatus*. *Environ Sci Pollut Res* 22, 19716–19728. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5199-7>

Meziti, A., 2009. Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* l'étude in vitro et in vivo. (magister). Université de Batna 2.

Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J., 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17, 235–248. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90079-5)

Mieszkowska, N., Leaper, R., Moore, P., Kendall, M., Burrows, M., Lear, D., Poloczanska, E., Hiscock, K., Moschella, P.S., Thompson, R.C., Herbert, R., Laffoley, D., Baxter, J., Southward, A.J., Hawkins, S., 2005. Assessing and predicting the influence of climatic change using rocky shore biota. *Occ. Publ. Mar. Biol. Assoc. UK* 20, 701–752.

Millero, F., Woosley, R., DiTrollo, B., Waters, J., 2009. Effect of ocean acidification on the Speciation of metals in seawater. *Oceanog.* 22, 72–85. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2009.98>

Miquel, G., 2001. Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé (Rapport d'information No. 261). Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, France.

MNHN, OFB, 2022. INPN - National inventory of natural heritage (INPN) [WWW Document]. Inventaire National du Patrimoine Naturel. URL <https://inpn.mnhn.fr/accueil/index> (accessed 4.10.22).

MolluscaBase Eds., 2022. MolluscaBase. Accessed at <https://www.molluscabase.org> on yyyy-mm-dd. <https://doi.org/10.14284/448>

Moore, H.B., 1937. The Biology of *Littorina littorea*. Part I. Growth of the Shell and Tissues, Spawning, Length of Life and Mortality. <https://doi.org/10.1017/S0025315400053844>

Moreno, C.A., Sutherland, J.P., Jara, H.F., 1984. Man as a Predator in the Intertidal Zone of Southern Chile. *Oikos* 42, 155–160. <https://doi.org/10.2307/3544787>

Mylonas, C., Kouretas, D., 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13, 295–309.

Nadella, S.R., Tellis, M., Diamond, R., Smith, S., Bianchini, A., Wood, C.M., 2013. Toxicity of lead and zinc to developing mussel and sea urchin embryos: Critical tissue residues

and effects of dissolved organic matter and salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 158, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.04.004>

Næs, K., Oug, E., Knutzen, J., 1998. Source and species-dependent accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in littoral indicator organisms from Norwegian smelter-affected marine waters. *Marine Environmental Research* 45, 193–207. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00033-0](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00033-0)

Nakhlé, K., 2003. Le mercure, le cadmium et le plomb dans les eaux littorales libanaises: apports et suivi au moyen de bioindicateurs quantitatifs (éponges, bivalves et gastéropodes). Université Paris 7.

Negri, A.P., Harford, A.J., Parry, D.L., Van Dam, R.A., 2011. Effects of alumina refinery wastewater and signature metal constituents at the upper thermal tolerance of: 2. The early life stages of the coral *Acropora tenuis*. *Mar Pollut Bull* 62, 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.01.011>

Newell, G.E., 1958. The behaviour of *Littorina Littorea* (L.) under natural conditions and its relation to position on the shore. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 37, 229–239. <https://doi.org/10.1017/S0025315400014922>

Niehaus, W.G., Samuelsson, B., 1968. Formation of Malonaldehyde from Phospholipid Arachidonate during Microsomal Lipid Peroxidation. *European Journal of Biochemistry* 6, 126–130. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1968.tb00428.x>

Noventa, S., Pavoni, B., Galloway, T.S., 2011. Periwinkle (*Littorina littorea*) as a sentinel species: a field study integrating chemical and biological analyses. *Environ Sci Technol* 45, 2634–2640. <https://doi.org/10.1021/es1039612>

Nriagu, J.O., 1983. Occupational exposure to lead in ancient times. *Sci Total Environ* 31, 105–116. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(83\)90063-3](https://doi.org/10.1016/0048-9697(83)90063-3)

Oehlmann, J., Bauer, B., Minchin, D., Schulte-Oehlmann, U., Fioroni, P., Markert, B., 1998. Imposex in *Nucella lapillus* and intersex in *Littorina littorea*: Interspecific comparison of two TBT-induced effects and their geographical uniformity. *Hydrobiologia* 378, 199–213. <https://doi.org/10.1023/A:1003218411850>

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., 2003. Molluscs as bioindicators. Trace Metals and other Contaminants in the Environment 6. [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80147-9](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80147-9)

Ololade, I.A., Lajide, L., Oladoja, N.A., Olumekun, V.O., Adeyemid, O.O., 2011. Occurrence and Dy-namics of Hydrocarbon in Periwinkles *Littorina littorea*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 11, 451–461.

Oros, D.R., Hoover, D., Rodigari, F., Crane, D., Sericano, J., 2005. Levels and Distribution of Polybrominated Diphenyl Ethers in Water, Surface Sediments, and Bivalves from the San Francisco Estuary. *Environ. Sci. Technol.* 39, 33–41. <https://doi.org/10.1021/es048905q>

Orton, J.H., 1928. Observations on *Patella Vulgata*. Part II. Rate of Growth of Shell. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 15, 863–874. <https://doi.org/10.1017/S0025315400009954>

Otegui, M.B.P., Zamprogno, G.C., França, M.A., Daros, B.N., Albino, J., Costa, M.B., 2019. Imposex response in shell sizes of intertidal snails in multiple environments. *Journal of Sea Research* 147, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2019.02.003>

Oueslati, A., 1993. Les côtes de la Tunisie: géomorphologie et environnement et aptitudes à l'aménagement. Université de Tunis I, Tunis.

Pagano, G., His, E., Beiras, R., De Biase, A., Korkina, L.G., Iaccarino, M., Oral, R., Quiniou, F., Warnau, M., Trieff, N.M., 1996. Cytogenetic, developmental, and biochemical effects of aluminum, iron, and their mixture in sea urchins and mussels. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 466–474. <https://doi.org/10.1007/BF00212429>

Palladino, G., Rampelli, S., Scicchitano, D., Musella, M., Quero, G.M., Prada, F., Mancuso, A., Seyfarth, A.M., Turroni, S., Candela, M., Biagi, E., 2021. Impact of Marine Aquaculture on the Microbiome Associated with Nearby Holobionts: The Case of *Patella caerulea* Living in Proximity of Sea Bream Aquaculture Cages. *Microorganisms* 9, 455. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020455>

Pampanin, D.M., Camus, L., Gomiero, A., Marangon, I., Volpato, E., Nasci, C., 2005. Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). *Marine Pollution Bulletin* 50, 1548–1557. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.06.023>

Pavlaki, M.D., Araújo, M.J., Cardoso, D.N., Silva, A.R.R., Cruz, A., Mendo, S., Soares, A.M.V.M., Calado, R., Loureiro, S., 2016. Ecotoxicity and genotoxicity of cadmium in different marine trophic levels. *Environmental Pollution* 215, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.010>

Pearson, W., 2014. BLAST and FASTA similarity searching for multiple sequence alignment. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1079, 75–101. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_5

Pechenik, J., 1999. On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic invertebrate life cycles. *Marine Ecology-progress Series - MAR ECOL-PROGR SER* 177, 269–297. <https://doi.org/10.3354/meps177269>

Peña Méndez, E.M., Astorga España, M.S., García Montelongo, F., 1996. Polychlorinated biphenyls in two mollusc species from the coast of Tenerife (Canary Islands, Spain). *Chemosphere* 32, 2371–2380. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(96\)00135-X](https://doi.org/10.1016/0045-6535(96)00135-X)

Pereira, J., Chaves, R., Bastos, E., Leitão, A., Guedes-Pinto, H., 2011. An Efficient Method for Genomic DNA Extraction from Different Molluscs Species. *International journal of molecular sciences* 12, 8086–95. <https://doi.org/10.3390/ijms12118086>

Pérez, S., Sánchez-Marín, P., Belals, J., Viñas, L., Besada, V., Fernández, N., 2019. Limpets (*Patella* spp. Mollusca, Gastropoda) as model organisms for biomonitoring environmental quality - ScienceDirect. Ecological Indicators 101, 150–162. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.01.016>

Pérez-López, M., Alonso, J., Nóvoa-Valiñas, M.C., Melgar, M.J., 2003. Assessment of heavy metal contamination of seawater and marine limpet, *Patella vulgata* L., from northwest Spain. Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering 38, 2845–2856. <https://doi.org/10.1081/ESE-120025835>

Perrier, R., 1930. La faune de la France illustrée, Delagrave. ed, Mollusques, bryozoaires, brachiopodes, protocordes, amphioxus, tuniciers. Paris.

Peters, K., Bundschuh, M., Schäfer, R.B., 2013. Review on the effects of toxicants on freshwater ecosystem functions. Environmental Pollution 180, 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.025>

Peuranen, S., Vuorinen, P.J., Vuorinen, M., Tuurala, H., 1993. Effects of acidity and aluminium on fish gills in laboratory experiments and in the field, in: Science of the Total Environment (Netherlands). Presented at the 2. European Conference on Ecotoxicology: Recent Advances in Ecotoxicology, Amsterdam (Netherlands), 11-15 May 1992.

Phillips, D.J.H., 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments—a review. Environmental Pollution (1970) 13, 281–317. [https://doi.org/10.1016/0013-9327\(77\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0013-9327(77)90047-7)

Phillips, D.J.H., Rainbow, P.S., 1994. Biomonitoring of trace aquatic contaminants. Chapman & Hall, London.

Phillips, D.J.H., Segar, D.A., 1986. Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: Programme design imperatives. Marine Pollution Bulletin 17, 10–17. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(86\)90797-6](https://doi.org/10.1016/0025-326X(86)90797-6)

Poppe, Guido.T., Goto, Y., 1991. European seashells, Volume I: Polyplacophora, Caudofoveata, Solenogastra, Gastropoda. Christa Hemmen, Wiesbaden.oks -. Verlag Christa Hemmen.

Poullaouec-Gonidec, P. (Ed.), 2018. Localisation des carrières et institutions participantes, in: Workshop Tunisie: Invention Paysagère Des Carrières de Mahdia, Thématique Architecture, Urbanisme et Aménagement. Presses de l'Université de Montréal, Montréal, pp. 68–69.

Prakash, N.T., Rao, K.S., 1995. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. Mol Cell Biochem 146, 107–113. <https://doi.org/10.1007/BF00944602>

Primost, M.A., Gil, M.N., Bigatti, G., 2017. High bioaccumulation of cadmium and other metals in Patagonian edible gastropods. Marine Biology Research 13, 774–781. <https://doi.org/10.1080/17451000.2017.1296163>

Provan, J., Bennett, K.D., 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology & Evolution* 23, 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.010>

Purchon, R.D., 1968. The biology of the Mollusca, 1st ed, International series of monographs on pure and applied biology. Pergamon Press, Oxford; New York.

Quiroz-Vázquez, P., Sigeo, D.C., White, K.N., 2010. Bioavailability and toxicity of aluminium in a model planktonic food chain (*Chlamydomonas–Daphnia*) at neutral pH. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters* 40, 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2009.10.007>

Rabaoui, L., Balti, R., Zrelli, R., Tlig-Zouari, S., 2013. Assessment of heavy metals pollution in the gulf of Gabes (Tunisia) using four mollusk species. *Mediterranean Marine Science* 15, 45. <https://doi.org/10.12681/mms.504>

Radulovici, A., Dufresne, F., Tita, G., 2010. Effet de l'insularité sur la génétique de populations des crustacés amphipodes de la zone intertidale marine : Le cas des Îles-de-la-Madeleine.

Radwan, M., El-Gendy, K., Gad, A., 2009. Oxidative Stress Biomarkers in the Digestive Gland of *Theba pisana* Exposed to Heavy Metals. *Archives of environmental contamination and toxicology* 58, 828–35. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9380-1>

Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution* 120, 497–507. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00238-5)

Ramade, F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie. Fondements et applications. Tec&Doc, France.

Ramírez, R., Tuya, F., Haroun, R.J., 2009. Efectos potenciales del marisqueo sobre moluscos gasterópodos de interés comercial (*Osilinus* spp. y *Patella* spp.) en el Archipiélago Canario. *Revista de biología marina y oceanografía* 44.

Readman, J.W., Kwong, L.L.W., Grondin, D., Bartocci, J., Villeneuve, J.P., Mee, L.D., 1993. Coastal water contamination from a triazine herbicide used in antifouling paints. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1940–1942. <https://doi.org/10.1021/es00046a027>

Regoli, F., 1998. Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Environ Contam Toxicol* 34, 48–63. <https://doi.org/10.1007/s002449900285>

Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, G.W., 2002b. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Mar. Environ. Res.* 54, 419–423. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00146-0)

Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G.W., Gorbi, S., Giuliani, S., Virno-Lamberti, C., Bompadre, S., 2002a. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and

susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Mar. Pollut. Bull.* 44, 912–922. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00120-0](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00120-0)

Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology* 31, 143–164. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00064-W](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00064-W)

Reguera, P., Couceiro, L., Fernández, N., 2018. A review of the empirical literature on the use of limpets *Patella* spp. (Mollusca: Gastropoda) as bioindicators of environmental quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148, 593–600. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.004>

Reid, D. g., Greenwood, P. h., 1989. The comparative morphology, phylogeny and evolution of the gastropod family Littorinidae. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 324, 1–110. <https://doi.org/10.1098/rstb.1989.0040>

Resing, J.A., Sedwick, P.N., German, C.R., Jenkins, W.J., Moffett, J.W., Sohst, B.M., Tagliabue, A., 2015. Basin-scale transport of hydrothermal dissolved metals across the South Pacific Ocean. *Nature* 523, 200–203. <https://doi.org/10.1038/nature14577>

Ridgway, S.A., Reid, D.G., Taylor, J.D., Branch, G.M., Hodgson, A.N., 1998. A cladistic phylogeny of the family Patellidae (Mollusca: Gastropoda). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 353, 1645–1671. <https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0316>

Riebeek, H., 2010. Global Warming [WWW Document]. URL <https://earthobservatory.nasa.gov/features/GlobalWarming> (accessed 4.23.22).

Riera, R., Hoyos, O.M., Castro, M. del C.B., Docoito, J.R., Fraga, J.N., Riera, R., Hoyos, O.M., Castro, M. del C.B., Docoito, J.R., Fraga, J.N., 2003. Distribución actual de las poblaciones de *Patella candei* D’Orbigny, 1840 (Mollusca: Gastropoda) en las islas Canarias. Una especie en peligro de extinción. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía* 19, 371–378.

Rivera-Ingraham, G.A., Malanga, G.F., Puntarulo, S.Á., Pérez, A.F., Ruiz Tabares, A., Maestre, M., González Aranda, R., Espinosa, F., García Gómez, J.C., 2013. Antioxidant defenses and trace metal bioaccumulation capacity of *Cymbula nigra* (Gasteropoda: Patellidae). <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1458-8>

Rivière, J.-L., 1993. Les animaux sentinelles. *Le Courrier de l’environnement de l’INRA* 20, 59–68. [hal-01207265](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01207265)

Rosenberg, G., 2014. A new critical estimate of named species-level diversity of the recent Mollusca. *American Malacological Bulletin* 32, 308–222. <https://doi.org/10.4003/006.032.0204>

Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J.R., John Elder, 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Marine Pollution Bulletin* 44, 671–679. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00333-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00333-2)

Rosseland, B.O., Eldhuset, T.D., Staurnes, M., 1990. Environmental effects of aluminium. *Environ Geochem Health* 12, 17–27. <https://doi.org/10.1007/BF01734045>

Rumisha, C., Leermakers, M., Elskens, M., Mdegela, R.H., Gwakisa, P., Kochzius, M., 2017a. Genetic diversity of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in relation to trace metal pollution at the Tanzanian coast. *Marine Pollution Bulletin* 114, 759–767. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.057>

Rumisha, C., Leermakers, M., Mdegela, R.H., Kochzius, M., Elskens, M., 2017b. Bioaccumulation and public health implications of trace metals in edible tissues of the crustaceans *Scylla serrata* and *Penaeus monodon* from the Tanzanian coast. *Environ Monit Assess* 189, 529. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6248-0>

Runham, N.W., Thornton, P.R., Shaw, D.A., Wayte, R.C., 1969. The mineralization and hardness of the radular teeth of the limpet *Patella vulgata* L. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 99, 608–626. <https://doi.org/10.1007/BF00340948>

Ruppert, E.E., Barnes, R.D., 1994. *Invertebrate zoology*. Fort Worth: Saunders College Publishing.

Sánchez-Marín, P., Beiras, R., 2012. Quantification of the increase in Pb bioavailability to marine organisms caused by different types of DOM from terrestrial and river origin. *Aquatic Toxicology* 110–111, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.12.015>

Santore, R.C., Ryan, A.C., Kroglund, F., Rodriguez, P.H., Stubblefield, W.A., Cardwell, A.S., Adams, W.J., Nordheim, E., 2018. Development and application of a biotic ligand model for predicting the chronic toxicity of dissolved and precipitated aluminum to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37, 70–79. <https://doi.org/10.1002/etc.4020>

Sá-Pinto, A., Branco, M., Harris, D.J., Alexandrino, P., 2005. Phylogeny and phylogeography of the genus *Patella* based on mitochondrial DNA sequence data. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 325, 95–110. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.04.025>

Sá-Pinto, A., Branco, M., Sayanda, D., Alexandrino, P., 2008. Patterns of colonization, evolution and gene flow in species of the genus *Patella* in the Macaronesian Islands. *Molecular Ecology* 17, 519–532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03563.x>

Sá-Pinto, A., Branco, M.S., Alexandrino, P.B., Fontaine, M.C., Baird, S.J.E., 2012. Barriers to gene flow in the marine environment: Insights from two common intertidal limpet species of the Atlantic and Mediterranean. *PLOS ONE* 7, e50330. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050330>

Sarker, S., Vashistha, D., Saha Sarker, M., Sarkar, A., 2018. DNA damage in marine rock oyster (*Saccostrea Cucullata*) exposed to environmentally available PAHs and heavy metals along the Arabian Sea coast. *Ecotoxicol Environ Saf* 151, 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.004>

Schmitt, R. j., Holbrook, S. j., Osenberg, C. w., 1999. Quantifying the effects of multiple processes on local abundance: a cohort approach for open populations. *Ecology Letters* 2, 294–303. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.1999.00086.x>

Scoupe, C., Ziemski, F., Müller, Y., 2021a. *Patella vulgata* | DORIS [WWW Document]. URL <https://doris.ffessm.fr/Especies/Patella-vulgata-Patelle-commune-1191> (accessed 3.21.22).

Scoupe, C., Ziemski, F., Müller, Y., 2021b. *Littorina littorea* (Linnaeus, 1758) [WWW Document]. URL [https://doris.ffessm.fr/Especies/Littorina-littorea-Bigorneau-1655/\(rOffset\)/20](https://doris.ffessm.fr/Especies/Littorina-littorea-Bigorneau-1655/(rOffset)/20) (accessed 7.6.21).

Segar, D.A., Collins, J.D., Riley, J.P., 1971. The distribution of the major and some minor elements in marine animals. Part. II. Molluscs. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 51, 131–136. <https://doi.org/10.1017/S0025315400006524>

Sellem, F., 1999. Biologie de l'oursin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) dans la région Sud-Est du Golfe de Tunis et effet des toxines du *Gymnodinium cf mikimotoi* sur l'embryogenèse de l'oeuf. Thèse de doctorat, Univ. De Tun. II, Tunisie, 251 p.

Serbaji, M., 2000. La gestion intégrée des zones côtières à travers l'utilisation de la télédétection et de l'outil SIG – Cas de la ville de Sfax (Tunisie). Faculté des sciences de Tunis.

Sharma, H., Singh, A., Sharma, C., Jain, S.K., Singh, N., 2005. Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer. *Cancer Cell Int* 5, 34. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-5-34>

Shi, W., Zhao, X., Han, Y., Che, Z., Chai, X., Liu, G., 2016. Ocean acidification increases cadmium accumulation in marine bivalves: a potential threat to seafood safety. *Sci Rep* 6, 20197. <https://doi.org/10.1038/srep20197>

Shiber, J.G., Chatila, T., 1978. Lead, cadmium, copper, nickel and iron in limpets, mussels and snails from the coast of ras Beirut, Lebanon. *Marine Environmental Research* 1, 125–134. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(78\)90005-3](https://doi.org/10.1016/0141-1136(78)90005-3)

Shnoudeh, A.J., Hamad, I., Abdo, R.W., Qadumii, L., Jaber, A.Y., Surchi, H.S., Alkelany, S.Z., 2019. Chapter 15 - Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles, in: Tekade, R.K. (Ed.), *Biomaterials and Bionanotechnology, Advances in Pharmaceutical Product Development and Research*. Academic Press, pp. 527–612. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814427-5.00015-9>

Shuhaimi-Othman, M., Nur-Amalina, R., Nadzifah, Y., 2012. Toxicity of metals to a freshwater snail, *Melanoides tuberculata*. *The Scientific World Journal* 2012, e125785. <https://doi.org/10.1100/2012/125785>

Siegel, D., Kinlan, B., Gaylord, B., Gaines, S., 2003. Lagrangian descriptions of marine larval dispersion. *Marine Ecology-progress Series - MAR ECOL-PROGR SER* 260, 83–96. <https://doi.org/10.3354/meps260083>

Silva, A.C.F., Hawkins, S.J., Boaventura, D.M., Thompson, R.C., 2008. Predation by small mobile aquatic predators regulates populations of the intertidal limpet *Patella vulgata* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 367, 259–265.

Silva, C.O., Simões, T., Novais, S.C., Pimparel, I., Granada, L., Soares, A.M.V.M., Barata, C., Lemos, M.F.L., 2017. Fatty acid profile of the sea snail *Gibbula umbilicalis* as a biomarker for coastal metal pollution. *Science of The Total Environment* 586, 542–550. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.015>

Silvestre, F., 2005. " Réponses à un stress environnemental induit par le cadmium chez un crustacé euryhalin, *Eriocheir sinensis*. Approche intégrative incluant une analyse du protéome (PhD Thesis). Thèse de Doctorat. Presses universitaires de Namur et Frederik Silvestre.

Sioen, I., Van Camp, J., Verdonck, F., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Willems, J., De Henauw, S., 2008. Probabilistic intake assessment of multiple compounds as a tool to quantify the nutritional-toxicological conflict related to seafood consumption. *Chemosphere* 71, 1056–1066. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.025>

Smaoui-Damak, W., Hamza-Chaffai, A., Bebianno, M.J., Amiard, J.C., 2004. Variation of metallothioneins in gills of the clam *Ruditapes decussatus* from the Gulf of Gabès (Tunisia). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 139, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.09.015>

Smith, J.E., Newell, G., 1955. The dynamics of the zonation of the common periwinkle (*Littorina littorea* (L.)) on a stony beach. <https://doi.org/10.2307/1878>

Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H., 2004. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquat Toxicol* 67, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.011>

Solé, M., Porte, C., Barcelo, D., Albaiges, J., 2000. Bivalves Residue Analysis for the Assessment of Coastal Pollution in the Ebro Delta (NW Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin* 40, 746–753. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00011-4](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00011-4)

Soltani, N., Amira, A., Sifi, K., Beldi, H., 2012. Environmental monitoring of the Annaba Gulf (Algeria): Measurements of Biomarkers in *Donax trunculus* and metallic pollution. *Bull. soc. zool. Fr* 1–4, 51–60.

Spanos, C., 2014. Analysis of Trace Elements in Seawater Using the Thermo Scientific iCAP 7000 Series ICP-OES Duo Applications Chemist, Thermo Fisher Scientific. Cambridge, UK, Application Note 43185, 5pp.

Stamou, A., Kamizoulis, G., 2008. Estimation of the effect of the degree of sewage treatment on the status of pollution along the coastline of the Mediterranean Sea using broad scale modelling. *Journal of environmental management* 90, 931–9. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.02.008>

Storelli, M.M., Marcotrigiano, G.O., 2005. Bioindicator organisms: Heavy metal pollution evaluation in the Ionian Sea (Mediterranean Sea—Italy). *Environ Monit Assess* 102, 159–166. <https://doi.org/10.1007/s10661-005-6018-2>

Szefer, P., Ali, A.A., Ba-Haroon, A.A., Rajeh, A.A., Geldon, J., Nabrzyski, M., 1999. Distribution and relationships of selected trace metals in molluscs and associated sediments from the Gulf of Aden, Yemen. *Environ Pollut* 106, 299–314. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(99\)00108-6](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(99)00108-6)

Taghizadeh, V., Imanpoor, M.R., Hosseinzadeh, M., Azarin, H., 2013. Effects of acidic water in combination with aluminum on swimming behavior and survival of yolk-sac larval in Goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *SpringerPlus* 2, 190. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-190>

Tajima, F., 1993. Simple Methods for Testing the Molecular Evolutionary Clock Hypothesis. *Genetics* 135, 599–607.

Tamasi, G., Cini, R., 2004. Heavy metals in drinking waters from Mount Amiata (Tuscany, Italy). Possible risks from arsenic for public health in the Province of Siena. *Sci Total Environ* 327, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.10.011>

Taylor, S.R., 1964. Abundance of chemical elements in the continental crust: a new table. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 28, 1273–1285. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(64\)90129-2](https://doi.org/10.1016/0016-7037(64)90129-2)

Thiel, M., Gutow, L., 2005. The ecology of rafting in the marine environment. II. The rafting organisms and community. *Oceanography and marine biology* 43, 279–418.

Touze, N., Galvin, Y., Lévêque, C., Souchon, Y., 1997. Etat de santé des écosystèmes aquatiques - les variables biologiques comme indicateurs.

Trenfield, M.A., Van Dam, J.W., Harford, A.J., Parry, D., Streten, C., Gibb, K., Van Dam, R.A., 2017. Assessing the chronic toxicity of copper and aluminium to the tropical sea anemone *Exaiptasia pallida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 139, 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.007>

Trenfield, M.A., Van Dam, J.W., Harford, A.J., Parry, D., Streten, C., Gibb, K., Van Dam, R.A., 2016. A chronic toxicity test for the tropical marine snail *Nassarius dorsatus* to assess the toxicity of copper, aluminium, gallium, and molybdenum. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 1788–1795. <https://doi.org/10.1002/etc.3331>

Trevizani, T.H., Figueira, R.C.L., Ribeiro, A.P., Theophilo, C.Y.S., Majer, A.P., Petti, M.A.V., Corbisier, T.N., Montone, R.C., 2016. Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms and sediments from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin* 106, 366–371. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.056>

Truscott, R., McCrohan, C.R., Bailey, S.E.R., White, K.N., 1995. Effect of aluminium and lead on activity in the freshwater pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 1623–1629. <https://doi.org/10.1139/f95-756>

Turrero García, P., Muñoz Colmenero, M., Prado, A., García Vázquez, E., 2014. Long-term impacts of human harvesting on shellfish: North Iberian top shells and limpets from the Upper Palaeolithic to the present. *Journal of Marine Systems*. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2014.05.011>

UNEP/IAE/FAO, 1984. Determination of total cadmium, zinc, lead and copper in selected marine organisms by flameless atomic absorption spectrophotometry. Reference methods for marine pollution studies 11–49.

UNEP/MAP, 2003. Programme d'actions Stratégiques : Deuxième rapport sur les points chauds de pollution en Méditerranée : Partie II : Rapports par pays révisés, Réunion des Coordonnateurs nationaux pour le MED POL. Sangemini, Italie.

UNEP/MAP/MED, 2020. Integrated Meetings of the Ecosystem Approach Correspondence Groups on IMAP Implementation (CORMONs) - Monitoring Guidelines/Protocols for Determination of Hydrographic Physical Parameters.

UNESCO, 1994. Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) core measurements, Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements, JGOFS.

USEPA, 1999. National Recommended Water Quality Criteria: Correction. United States Environmental Protection Agency, Office of Water.

Valentine, P., Carman, M., Blackwood, D., Heffron, E., 2007. Ecological observations on the colonial ascidian *Didemnum* sp. in a New England tide pool habitat. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342, 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.10.021>

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>

Van Dam, J.W., Trenfield, M.A., Harries, S.J., Streten, C., Harford, A.J., Parry, D., Van Dam, R.A., 2016. A novel bioassay using the barnacle *Amphibalanus amphitrite* to evaluate chronic effects of aluminium, gallium and molybdenum in tropical marine receiving environments. *Marine Pollution Bulletin* 112, 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.07.015>

Van Dam, J.W., Trenfield, M.A., Streten, C., Harford, A.J., Parry, D., Van Dam, R.A., 2018. Water quality guideline values for aluminium, gallium and molybdenum in marine environments. *Environ Sci Pollut Res* 25, 26592–26602. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2702-y>

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. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology 100, 187–190. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90151-I](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90151-I)

Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Etxebarria, N., Nieto, O., Beiras, R., 2014. Glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and acetylcholinesterase activities in mussels transplanted to harbour areas. *Science of The Total Environment* 470–471, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.073>

Viñas, J., Tudela, S., 2009. A Validated Methodology for Genetic Identification of Tuna Species (Genus *Thunnus*). *PLOS ONE* 4, e7606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007606>

Viñas, L., Pérez-Fernández, B., Soriano, J.A., López, M., Bargiela, J., Alves, I., 2018. Limpet (*Patella* sp) as a biomonitor for organic pollutants. A proxy for mussel? *Marine Pollution Bulletin* 133, 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.046>

Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, 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. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.05.018>

Wang, Q., Liu, B., Yang, H., Wang, X., Lin, Z., 2009. Toxicity of lead, cadmium and mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Meretrix meretrix* larvae. *Ecotoxicology* 18, 829–837. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0326-1>

Wang, S.-L., Xu, X.-R., Sun, Y.-X., Liu, J.-L., Li, H.-B., 2013. Heavy metal pollution in coastal areas of South China: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 76, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.08.025>

Wang, W., 1987. Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms — Overview. *Environment International* 13, 437–457. [https://doi.org/10.1016/0160-4120\(87\)90006-7](https://doi.org/10.1016/0160-4120(87)90006-7)

Watermann, B., Ide, I., Liebe, S., Witten, E.P., 1996. Hämocyteninfiltrationen und Granulocytome in Gastropoden und Bilvalviern, Indikatoren für Umweltbelastungen? In: Hoffmann, R., Bernoth, E.M. (Eds), *Tagung der Fachgruppe "Fischkrankheiten" in Verbindung mit der EAFP/Deutsche Sektion*. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Königswartha, pp. 218–229.

Watjen, W., Beyersmann, D., 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals* 17, 65–78. <https://doi.org/10.1023/a:1024405119018>

Wei, B., Yang, L., 2010. A review of heavy metal contaminations in urban soils, urban road dusts and agricultural soils from China. *Microchemical Journal* 94, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.09.014>

Wells, P.G., Lee, K., Blaise, C., Gauthier, J. (Eds.), 1997. *Microscale testing in aquatic toxicology: advances, techniques, and practice*. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9780203747193>

Werner, G.D.A., Gemmell, P., Grosser, S., Hamer, R., Shimeld, S.M., 2013. Analysis of a deep transcriptome from the mantle tissue of *Patella vulgata* Linnaeus (Mollusca: Gastropoda: Patellidae) reveals candidate biomineralising genes. *Mar Biotechnol* (NY) 15, 230–243. <https://doi.org/10.1007/s10126-012-9481-0>

Wesselmann, M., González-Wangüemert, M., Serrão, E.A., Engelen, A.H., Renault, L., García-March, J.R., Duarte, C.M., Hendriks, I.E., 2018. Genetic and oceanographic tools reveal high population connectivity and diversity in the endangered pen shell *Pinna nobilis*. *Sci Rep* 8, 4770. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23004-2>

WHO, 2011. Evaluation of certain food additives and contaminants: seventy-third [73rd] report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (No. VII). World Health Organization.

Wilbur, K.M., Yonge, C.M. (Eds.), 1964. *Physiology of Mollusca*. Academic Press, London, UK. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3241-6.50001-9>

Williams, E.E., 1964. The Growth and Distribution of *Littorina littorea* (L.) on a Rocky Shore in Wales. *Journal of Animal Ecology* 33, 413–432. <https://doi.org/10.2307/2562>

Williams, S.T., Reid, D.G., Littlewood, D.T.J., 2003. A molecular phylogeny of the Littorininae (Gastropoda: Littorinidae): unequal evolutionary rates, morphological parallelism, and biogeography of the Southern Ocean. *Mol Phylogenet Evol* 28, 60–86. [https://doi.org/10.1016/s1055-7903\(03\)00038-1](https://doi.org/10.1016/s1055-7903(03)00038-1)

Woodward, J. (Ed.), 2009. *The physical geography of the Mediterranean*, Oxford Regional Environments. Oxford University Press, Oxford, New York.

WWF, 2020. Le Littoral Tunisien [WWW Document]. URL https://wwf.panda.org/fr/wwf_action_zones/tunisie/littoral_tunisien/ (accessed 7.14.21).

Xie, J., Yang, D., Sun, X., Cao, R., Chen, L., Wang, Q., Li, F., Ji, C., Wu, H., Cong, M., Zhao, J., 2017. Combined toxicity of cadmium and lead on early life stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Invertebrate Survival Journal* 14, 210–220. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v14i1.210-220>

Yap, C.K., Cheng, W.H., 2009. Heavy metal concentrations in *Nerita lineata*: the potential as a biomonitor for heavy metal bioavailability and contamination in the tropical intertidal area. *Marine Biodiversity Records*. <https://doi.org/10.1017/S1755267209000505>

Yawetz, A., Manelis, R., Fishelson, L., 1992. The effects of aroclor 1254 and petrochemical pollutants on cytochrome P450 from the digestive gland microsomes of four species of mediterranean molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 103, 607–614. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(92\)90188-D](https://doi.org/10.1016/0742-8413(92)90188-D)

Ying, W., Ahsanullah, M., Batley, G., 1993. Accumulation and regulation of heavy metals by the intertidal snail *Polinices sordidus*. *Marine Biology* 116, 417–422. <https://doi.org/10.1007/BF00350058>

Yüzereroğlu, T.A., Gök, G., Çoğun, H.Y., Firat, Ö., Aslanyavrusu, S., Maruldalı, O., Kargin, F., 2010. Heavy metals in *Patella caerulea* (Mollusca, Gastropoda) in polluted and non-polluted areas from the Iskenderun Gulf (Mediterranean Turkey). *Environ Monit Assess* 167, 257–264. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1047-x>

Zaidi, M., Athmouni, K., Metais, I., Ayadi, H., Leignel, V., 2022. The Mediterranean limpet *Patella caerulea* (Gastropoda, Mollusca) to assess marine ecotoxicological risk: a case study of Tunisian coasts contaminated by metals. *Environ Sci Pollut Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18490-3>

Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J., 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 337–349. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00905-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00905-x)

Zhao, X., Zheng, M., Liang, L., Zhang, Q., Wang, Y., Jiang, G., 2005. Assessment of PCBs and PCDD/Fs along the Chinese Bohai Sea coastline using mollusks as bioindicators. *Arch Environ Contam Toxicol* 49, 178–185. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0130-0>

Zhou, L., Tan, Y., Huang, L., Fortin, C., Campbell, P.G.C., 2018. Aluminum effects on marine phytoplankton: implications for a revised Iron Hypothesis (Iron–Aluminum Hypothesis). *Biogeochemistry* 139, 123–137. <https://doi.org/10.1007/s10533-018-0458-6>

Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., 2008. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta* 606, 135–150. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.018>

Titre : Valorisation des gastéropodes marins en écotoxicologie par l'étude de leur diversité génétique et leurs réponses aux perturbations environnementales

Mots clés : Gastéropodes marins, métaux trace, enzymes antioxydantes, variabilité génétique, patelles, littorines, Tunisie, France

Résumé : L'étude de l'impact des pollutions anthropiques sur les organismes vivants est devenue un enjeu social majeur. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer l'utilisation des gastéropodes de type patelles (Patellogastropoda) et littorines (Caenogastropoda) comme organismes indicateurs de la qualité de leur environnement marin. Trois espèces ont été incluses dans ce travail : deux espèces de patelles (*Patella caerulea*, patelle méditerranéenne ; *P. vulgata*, patelle d'Atlantique) et une espèce de littorine (*Littorina littorea*, bigorneau commun).

La variabilité génétique de ces espèces a été appréhendée par l'usage des marqueurs génétiques (ADNmt : COI, D-Loop ou ADNr : ITS) afin de comprendre comment s'effectuent les réseaux d'interconnexion entre différentes populations. Cette étape a permis de mettre en évidence l'homogénéité génétique de ces espèces le long de leurs aires de répartition. Une légère différenciation génétique du Nord au Sud en Atlantique est observable pour *L. littorea* et *P. vulgata* tandis que *P. caerulea* est sans structuration génétique en Méditerranée (ceci pourrait être notamment expliqué par les courants marins assurant une large dispersion des stades larvaires). Une approche écotoxicologique in situ sur la patelle méditerranéenne (*P. caerulea*) prélevée le long des côtes tunisiennes [Nord au Sud : Cap Bon (CB), Chebba (C), Kerkennah (K) et Gabès (G)] a été réalisée en déterminant l'accumulation de métaux (Cd, Cu, Fe, Ni, Pb et Zn) dans l'eau et dans les tissus des patelles, en évaluant les réponses enzymatiques biochimiques antioxydantes (CAT, SOD, GPx) et la peroxydation lipidique (MDA).

L'étude a montré un gradient de contamination métallique croissant du Nord vers le Sud (les stations ont été classées comme suit : CB<C<K<G) illustré également par une variation inter-sites du taux de métaux dans les tissus de *P. caerulea* et au niveau des taux de réponses antioxydantes. Une approche écotoxicologique ex situ (en laboratoire) a été développée sur les modèles Atlantique (*P. vulgata*, *L. littorea*) pour estimer leurs sensibilités aux métaux (aluminium, plomb) lors de contamination aiguë (96h) en définissant leurs courbes dose/réponse et leurs niveaux de réponses enzymatiques antioxydantes lors d'intoxication à EC30 (96h). Les résultats ont révélé une sensibilité plus forte de *P. vulgata* aux métaux testés que pour la littorine. Cette différence pourrait s'expliquer par la présence d'un opercule chez la littorine jouant le rôle potentiel de tissu d'accumulation de polluants et permettant aussi à l'animal de se protéger dans sa coquille (minimisant le contact avec les métaux). De plus, les deux espèces testées pourraient présenter une efficacité de mécanisme de détoxification. En conclusion, ce travail montre que les gastéropodes marins, modèle écologiquement intéressant car assurant plusieurs fonctions (brouetteur, carnivore, détritivore), et entrant dans l'alimentation humaine, peuvent être de bons indicateurs de la présence de pollution métallique mais que des différences de sensibilité existent selon les espèces utilisées notamment si l'espèce présente un opercule ou pas.

Title : Valorization of marine gastropods in ecotoxicology by studying their genetic diversity and their responses to environmental disturbances

Keywords : Marine gastropods, trace metals, antioxidant enzymes, genetic variability, limpet, common periwinkle, Tunisia, France.

Abstract : The study of the impact of anthropogenic pollution on living organisms has become a major social issue. In this context, the objective of this thesis was to evaluate the use of gastropods such as limpets (Patellogastropoda) and periwinkles (Caenogastropoda) as indicator organisms of the quality status of their marine environment. Three species were included in the present study: two species of limpets (*Patella caerulea*, Mediterranean limpet; *P. vulgata*, Atlantic limpet) and one species of periwinkle (*Littorina littorea*, common periwinkle). The genetic variability of these species has been assessed by investigating genetic markers (mtDNA: COI, D-Loop or rDNA: ITS) in order to understand how the interconnection networks between different populations are carried out and to evaluate whether distinct genetic variability patterns may exist between different populations. This step made it possible to highlight the genetic mixture and homogeneity of these species along their native distribution areas. A slight genetic differentiation from North to South in the Atlantic is observable with *L. littorea* and *P. vulgata* while *P. caerulea* didn't show any genetic structuring in the Mediterranean (this could be explained in particular by the role of marine currents in the dispersal and passive transportation during the larva stages). An in situ ecotoxicological approach on the Mediterranean limpet (*P. caerulea*) sampled along the Tunisian coasts [from North to South : Cap Bon (CB), Chebba (C), Kerkennah (K) and Gabès (G)] was carried out by assessing the accumulation of metals (Cd, Cu, Fe, Ni, Pb and Zn) in the water and in the tissues of limpets and by evaluating the antioxidant enzymatic responses (CAT, SOD, GPx) and lipid peroxidation (MDA).

The study showed a gradient of metal contamination increasing from North to South (the stations were ranked as follows: CB<C<K<G) illustrated by an inter-site variation in concentrations of metals in the tissues of *P. caerulea* and levels of antioxidant responses. An ex-situ (in laboratory) ecotoxicological approach has been developed on Atlantic models (*P. vulgata*, *L. littorea*) to estimate their sensitivities to metals (aluminum, lead) during acute contamination (96h) by defining their dose/response curves and their levels of antioxidant enzymatic responses during intoxication at EC30 (96h). The results revealed a stronger sensitivity of *P. vulgata* to the studied metals compared to *L. littorea*. This difference could be explained by the presence of an operculum in periwinkles playing the potential role of pollutant accumulation tissue and also allowing the animal to protect itself in its shell (minimizing contact with metals). In addition, the two species tested could present an efficiency of detoxification mechanism. In conclusion, this work shows that marine gastropods, an ecologically relevant model because they perform several functions (grazer, carnivore, detritivore), and enter into human consumption, can be good indicators of the presence of metal pollution but that differences in sensitivity exist depending on the species used specially if the species has an operculum or not.