

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة 8 ماي 1945 قالمة

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité/Option: Biologie Moléculaire et Cellulaire

Département: Biologie

Thème

L'étude de deux biomarqueurs chez les bivalves mollusques (*Donax trunculus* et *Mytilus galloprovincialis*) du golfe d'Annaba

Présenté par:

Dilmi Loubna

Lellouche Bouthaina

Meciad Souhaila

Devant le jury composé de:

Président: Boumaza A. (MCB)

Université de Guelma

Examineur : Hamdikane M. (MAA)

Université de Guelma

Encadreur : Drif F. (MCB)

Université de Guelma

Jun 2018

Remerciements

Nous commençons par remercier Allah le tout puissant de nous avoir donné le courage, la santé, la volonté et l'amour du savoir pour pouvoir réaliser ce modeste travail.

D'abord émerveillé par son esprit scientifique de haut niveau et de son caractère de noblesse incomparable, je tiens à remercier le Dr. Drif Fahima. Je ne trouve pas d'expression idéale pour lui traduire ma reconnaissance, mais je lui exprime cordialement mes plus profonds remerciements.

Nos remerciements s'adressent aussi à M^e Abdenour Cherif, Professeur à l'Université d'Annaba, aux techniciens du laboratoire de l'Université d'Annaba et du laboratoire de l'Université de Guelma pour leur aide efficace, leur soutien moral et leurs encouragements.

J'exprime mes profonds remerciements aux membres du jury qui ont bien voulu évaluer ce travail :

Nous sommes conscientes de l'honneur que nous ont fait les Dr. Boumaza Aouatef en étant président du jury et Dr. Hamdikane Malika d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenus de près ou de loin.

Dédicace

À l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et matériel tout au long de ma vie, dans les moments difficiles et dans mes années d'études, ma source de joie, celui qui s'est toujours sacrifié pour ma réussite. Que Dieu te procure une bonne santé et une longue vie mon très cher papa. À lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, celle qui m'a transmis le courage et l'amour, pour son soutien moral et matériel, pour sa tendresse et pour ses encouragements durant mon parcours, à ma très chère maman que j'adore.

À mes très chers frères : Fares, Mourad, Seif, Achref et Imad.

À mes très chères sœurs : Ahlem, Lamia et Farida.

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je vous porte.

À mes nièces et mes neveux : Riham, Besma, Adem, Maram, Djaber, Yahia et Insaf. Pour toute l'ambiance dont vous m'avez entouré

Je leur dédie ce travail dont le plaisir leur revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements. Je vous dis merci et que dieu vous garde.

À mon trinôme : Bouthaina et Souhaila.

À tous mes amis, surtout Kawther, Wafa, Sara, Amina et Besma.

LOUBNA

Dédicace

A mon exemple éternel, mon moral et source de joie et de Bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, A mon père : ABD EL OUAHEB.

A la lumière de mes jours, la source de mes effort ma vie et mon bonheur ; maman DALILA.

A mon chère frère : NADHIR à mes chères sœurs : AMEL et MOUNA.

A ma grand-mère et mes grands pères : L'AID et RAMDHANE que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A ma tante et mes oncles chacun par son nom.

A mes chères cousines SOUAD et RACHIDA.

A tout la famille LELLOUCHE.

A mes chères sœurs et mon binômes LOUBNA et SOUHAILA.

A mes amies : MOUNA, HANEN, OMAIMA, NABILA, BESMA, MARWA....

A tout la promotion 2018. Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible.

BOUTHAINA

Dédicace

*A l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce travail que je
dédie :*

*A mes très chers parents la lumière de ma vie qui m'a soutenu tout
au long de ma vie dans les moments difficiles et dans mes études.
Vous m'avez apporté soutien, écoute et encouragements qui ont été
essentiels pendant ces années. Cette thèse est la tienne car grâce à
ton aide et à que ce travail a pu voir le jour...*

A mes chère sœurs Rima et Randa ,à mes frères Rabah et Aymen ,

*A mon mari, Fouzi qui m'a supporté tous les jours pendant la
rédaction, et sa patience envers moi*

*A ma famille au sens large, avec toutes mes excuses pour mon
manque de présence et d'attention ces dernières années.*

Que Dieu le tout puissant nous accorde un avenir meilleur.

Souhaila

TABLE DES MATIERE

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

INTRODUCTION 01

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. GENERALITES SUR LA POLLUTION 03

1. La pollution03
2. Les polluants.....03
3. Les métaux lourds..... 05
 - 3.1. Origine des métaux lourds..... 05
 - 3.2. Types des métaux lourds.....06
 - 3.3. Caractéristiques des métaux lourds.....06
 - 3.4. Toxicité des métaux lourds.....06
4. La bioaccumulation.....07

II. LE STRESS OXYDANT

1. Définition.....08
2. Origine du stress oxydant.....08
3. Conséquences du stress oxydant.....08
 - 3.1. Oxydation des acides nucléique.....08
 - 3.2. Peroxydation lipidique.....09
 - 3.3. Oxydation du groupement soufré.....10
 - 3.4. Au niveau des glucides.....10
 - 3.5 Autre conséquences biologiques.....11
4. Les maladies liées au stress oxydant.....12
5. Les radicaux libres.....12
 - 5.1. Définition.....12
 - 5.2. Source des radicaux libres.....13
 - 5.2.1. Production intracellulaire.....13
 - 5.2.2. Production extracellulaire.....14
 - 5.3 Importance des radicaux libres.....15

6. Les antioxydants	15
6.1 Définition.....	15
6.2 Système antioxydant	15
6.2.1 Les antioxydants enzymatiques	15
6.2.1.1. Les superoxydes dismutases	15
6.2.1.2. Les catalases	16
6.2.1.3. Les glutathion peroxydases	16
6.2.2. Les antioxydants non-enzymatiques	17
6.2.2.1. Les métallothionéines	17
6.2.2.2. Le glutathion	17
III. LES MOLLUSQUES BIVALVES.....	19
1. Présentation de l'espèce <i>Donax trunculus</i>	19
1.1. Morphologie.....	20
1.2. Classification de l'espèce	20
1.3. Physiologie	21
1.3.1. Nutrition.....	21
1.3.2. Reproduction.....	22
1.4. Habitat.....	22
2. Présentation de l'espèce <i>Mytilus galloprovincialis</i>	23
2.1. Morphologie.....	23
2.2. Classification.....	24
2.3. Physiologie.....	24
2.3.1. Nutrition.....	24
2.3.2. Respiration.....	24
2.3.3. Reproduction.....	25
2.4. Habitat	26
3. Bio indicateur	26

IV.MATERIEL ET METHODES

1. Matériel	27
1.1. Lieu d'études.....	27
1.2. Choix des sites.....	27
1.2.1. Présentation des sites de prélèvement de <i>Donax trunculus</i>	28
1.2.2. Présentation des sites de prélèvement de <i>Mytilus galloprovincialis</i>	30

1.3. Choix des espèces.....	32
1.4. Prélèvement des espèces	32
2. METHODES.....	33
2.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	33
2.2. Dosage du glutathione réduit (GSH).....	34
3. Histologie des gonades	35
4. Analyse statistique des résultats.....	36
V. RESULTATS ET DISCUSSION	
1. Résultats	38
1.1 Les bio marqueurs du stress oxydatif	38
1.1.1 Le malondialdéhyde (MDA)	38
1.1.2 le glutathion réduit (GSH)	43
1.1.3 L' histologie des gonades	49
2. Discussion	55
Conclusion et perspectives.	
Références bibliographiques	
Résumé	
Français	
Anglais	
Arabe	
Annexes	

Liste des figures

Figure 1: Les lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine Génétique des cellules.	9
Figure 2: Les différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène.	11
Figure 3: Sites de production intracellulaire des radicaux libres.	14
Figure 4: L'espèce <i>D. trunculus</i> .	20
Figure 5: Morphologie externe de la coquille.	20
Figure 6: Morphologie interne de l'espèce <i>D. trunculus</i> (-A- individu mâle ; -B- individu femelle).	22
Figure 7: Un échantillonnage de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> .	23
Figure 8: Système respiratoire et alimentaire chez la moule.	25
Figure 9: Morphologie interne de l'espèce <i>M. galloprovincialis</i> (-A- individu mal, -B- individu femelle).	26
Figure 10: Carte géographique de la côte d'Annaba, représentant les sites d'échantillonnages.	27
Figure 11: Site El-Bettah.	29
Figure 12: Site de Sidi Salem.	29
Figure 13: Site Boukhemira.	30
Figure 14: Site d'El-Henaya.	31

Figure 15: site Seybouse.	31
Figure 16: Site Boukhemira.	32
Figure 17: Présentant l'étape de l'inclusion (Enrobage).	36
Figure 18: Présentant la réalisation des coupes.	36
Figure 19: Les concentrations moyennes de MDA corporel en (nmol/g tissu) Chez les deux sexes de <i>D. trunculus</i> .	38
Figure 20: Les concentrations moyennes de MDA gonadique (nmol/g tissu) Chez les deux sexes de <i>D. trunculus</i> .	39
Figure 21: Les concentrations moyennes de MDA hépatoponcréatique en (nmol/g tissu) chez les deux sexes de <i>D. trunculus</i> .	40
Figure 22: Les concentrations moyennes de MDA corporel en (nmol/g tissu) Chez les deux sexes de <i>M. galloprovincialis</i> .	41
Figure 23: Les concentrations moyennes de MDA gonadique en (nmol/g tissu) Chez les deux sexes de <i>M. galloprovincialis</i> .	42
Figure 24: Les concentrations moyennes de MDA hépatoponcréatique en (nmol/g tissu) chez les deux sexes de <i>M. galloprovincialis</i> .	43
Figure 25: Les concentrations moyennes de GSH corporel en (nmol/g tissu) Chez les deux sexes de <i>D. trunculus</i> .	44
Figure 26: Les concentrations moyennes de GSH gonadique en (nmol/g tissu) Chez les deux sexes de <i>D. trunculus</i> .	45
Figure 27: Les concentrations moyennes de GSH hépatoponcréatique en (nmol/g tissu) chez les deux sexes de <i>D. trunculus</i> .	46
Figure 28: Les concentrations moyennes de GSH corporel en (nmol/g tissu) Chez les deux sexes de <i>M. galloprovincialis</i> .	47

Figure 29: Les concentrations moyennes de GSH gonadique en (nmol/g tissu) Chez les deux sexes de <i>M. galloprovincialis</i> .	48
Figure 30: Les concentrations moyennes de GSH hépatoponcréatique en (nmol/g tissu) chez les deux sexes de <i>M. galloprovincialis</i> .	49
Figure 31: Observation au microscope optique des coupes transversales d'une partie de la gonade mâle de l'espèce <i>D. trunculus</i> prélevée du site d'El-Bettah (A), Sidi Salem (B), Boukhemira (C) (gr×400 colorées par l'hématoxyline et l'éosine).	51
Figure 32: Observation au microscope optique des coupes transversales d'une partie de la gonade femelle de l'espèce <i>D. trunculus</i> prélevée du site d'El-Bettah (A), Sidi Salem (B), Boukhemira (C) (gr×400 colorées par l'hématoxyline et l'éosine).	52
Figure 33: Observation au microscope optique de coupe transversales d'une partie de la gonade mâle de l'espèce <i>M. galloprovincialis</i> prélevée du site d'El-Henaya (A), Seybouse (B), Boukhemira (C) (gr×400 colorées par l'hématoxyline et l'éosine).	53
Figure 34: Observation au microscope optique de coupes transversales d'une partie de la gonade femelle de l'espèce <i>M. galloprovincialis</i> prélevée du site d'El-Henaya (A), Seybouse (B), Boukhemira (C) (gr×400 colorées par l'hématoxyline et l'éosine).	54

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales espèces réactives.	13
---	-----------

Liste des abréviations

ADN : L'acide Désoxyribonucléique

AGE : Advanced glycation end Product

ANOVA : Analysis of variance

CAT : Catalase

COV : les composés organiques volatils

DDT : Dichloro Diphényl Trichloroéthane

DO : densité optique

DTNB: Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman

EDTA: Ethylène diamine tétra-acétique

ERO: Espèce réactive de l'oxygène

Es : Espace inter tubulaire

ETM : Eléments Traces Métallique

fo: follicule ovarienne

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂O : L'eau

GPx : Glutathion peroxydase

GR : glutathion réductase

GSH-Px : glutathion peroxydases

GSH: Glutathion réduit

GSSG: Glutathion oxyde

lu: Lumière tubulaire

MDA : Malondialdéhyde

MES : Matières en suspensions

ML : métaux lourds

MPO : myélopéroxydase

MTs : métallothionéines

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

-NH₂ : groupements amines

No: noyau

NO₂ : dioxyde d'azote

NO• : monoxyde d'azote

NOS : nitroso synthase

Nu: nucléole

og: ovogonie

OH• : Le radical hydroxyle

ONOOH : nitroperoxyde

ov: ovocyte

O₂⁻ : Anion superoxyde

R.L : Radicaux libres

ROOH : hydroperoxydes

ROS : espèces réactives de l'oxygène

-SH : Groupement sulfhydryle

SOD : Superoxydedismutase

SO₂ : dioxyde de soufre

Spd: spermatides

Spg: Spermatogonies

Spz: Spermatozoïdes

SSA : solution d'acide sulfosalicylique

TBA : Acide thiobarbéturique

tc: tissu conjonctif

TCA : Acide trichloroacétique

tr: tissu de réserve

Tris : Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane

tu: tubule

¹O₂: Oxygène singulet

4-HNE : Le 4-hydroxynonéal

Introduction

INTRODUCTION

La pollution est un problème dangereux qui menace les écosystèmes par ces effets néfastes sur la santé et l'environnement. Du fait de sa propagation, elle occupe différents compartiments, l'air, le sol et l'eau. En conséquence, une dégradation de la biodiversité biologique.

Particulièrement, la pollution des milieux marins résulte du rejet dans cet environnement par les activités humaines de quantités excessives de produits physiques ou chimiques toxiques (**Galloway et al., 2006**). Dont des fortes concentrations de molécules des pesticides, des hydrocarbures et des métaux lourds (**Joiris et al., 2000**) sont rejetées dans les mers.

Cependant, l'accumulation de ces contaminants conduit à un déséquilibre de différents processus biochimiques dans les tissus des êtres vivants, conduisant ainsi à une production des espèces réactives de l'oxygène. Lorsque cette dernière dépasse la capacité antioxydants, un stress oxydants est survenu (**Delattre et al., 2005**).

La production intracellulaire de ces espèces réactives peuvent entraînant des dommages oxydatifs à des macromolécules tel que la peroxydation lipidique (**Banni et al., 2014**), les cassures de brins d'ADN (**Rajaguru et al., 2003**) et les altérations des processus cellulaires (**Livingstone., 2003**).

Les bivalves, très largement répandues dans les milieux aquatiques sont utilisées comme bio-indicateurs de la pollution métallique (**Rainbow., 1995 ; Andral et al., 2004 ; Box et al., 2007**). Ils se nourrissent par filtration du plancton. Egalement, ces espèces ont développé des mécanismes de défense antioxydants (**Mates et al., 1999**).

Plusieurs études ont été effectuées sur les deux bivalves *Donax trunculus* et *Mytilus galloprovincialis* comme des espèces sentinelles traitant le sujet de la contamination métallique de la côte méditerranéenne (**Abdenour and Drif., 2009 ; Soltani et al., 2012 ; Melwani et al., 2014**).

En revanche, les antioxydants sont utilisés comme des bio-marqueurs pour contrôler l'oxydation et ses effets indésirables qui mettent en danger la santé de ces organismes (Galloway., 2006 ; Bessi and El Alami., 2009).

Dans ce concept, plusieurs travaux s'accroissent sur l'importance de bio-marqueurs pour évaluer la qualité de l'environnement marin (Halpern *et al.*, 2008), ainsi que l'utilisation des bio-indicateurs conduise à une meilleure compréhension des voies métaboliques (Livingstone., 2003), par les quelles les métaux traces exceptionnellement exercent leurs effet toxique au niveau cellulaire et tissulaire (Farrington *et al.*,1983; Deudero *et al.*, 2007). Les examens adoptés portent également sur les branchies, la glande digestive et l'hémolymphe.

Dans cet étude, notre travail vise à évaluer le degré de la contamination du golfe d'Annaba, on testant deux antioxydants: le malondialdéhyde (MDA) et le glutathion réduit (GSH) chez deux bivalves comestibles *Mytilus galloprovincialis* et *Donax trunculus* et confirmant finalement par l'étude histologique des gonades.

Synthèse
bibliographique

I. GENERALITES SUR LA POLLUTION

La pollution est définie comme une modification défavorable du milieu qui résulte en totalité ou en partie de l'action humaine, à travers des effets directs ou indirects, altérant des critères de répartition de flux d'énergie, des niveaux de radiation, de la constitution physicochimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes (**Barbault., 2000**).

Il existe de nombreux types de pollution dans l'environnement, notamment la pollution de l'air, du sol et de l'eau.

1. La pollution

▪ La pollution atmosphérique:

La pollution atmosphérique concerne la dégradation de l'air que nous respirons à cause de substances polluantes qui se retrouvent dans l'atmosphère. Les principaux polluants atmosphériques sont les particules fines, le dioxyde de soufre (SO₂), les oxydes d'azote (NO et NO₂), les composés organiques volatils (COV) etc.

▪ La pollution des sols:

Elle désigne toutes les formes de pollution touchant n'importe quel type de sol (agricole, forestier, urbain, etc.). Un sol pollué devient à son tour une source possible de diffusion directe ou indirecte de polluants dans l'environnement, via l'eau, les envols de poussières, émanations gazeuses ou via un transfert de polluants par des organismes vivants (bactéries et champignons).

▪ La pollution des eaux:

La pollution des eaux est l'introduction dans le milieu aquatique toute substance susceptible de modifier les caractéristiques physiques, chimiques et/ou biologiques de l'eau et de créer des risques pour la santé de l'homme. Ainsi, nuire la faune et la flore terrestres et aquatiques.

2. Les polluants

Un agent extérieur d'origine biologique, physique ou chimique. Cet élément soit naturelle ou résulte d'une synthèse se trouve à un niveau supérieur à celui qui doit exister dans tout composant de l'environnement peut être nocives.

La grande portion des polluants rejetés dans l'environnement parvient du milieu marin, soit indirectement par les rivières, le ruissellement ou l'atmosphère, soit directement par les rejets d'origine urbaine, agricole, ou industrielle. Il existe différents types de polluants:

- **Matières en suspensions:**

Elles désignent toutes les matières minérales ou organiques qui ne se solubilisent pas dans l'eau. Les MES confèrent à l'eau un aspect trouble au fur et à mesure que les sédiments se déposent au fond. Elles diminuent la luminosité dans l'eau, donc freinent la photosynthèse.

- **Sels minéraux:**

Présents naturellement dans l'eau en faible quantité, les sels minéraux (chlorures ou sulfates de calcium, de magnésium, de sodium ou de potassium) peuvent voir leur concentration s'élever à la suite de rejets industriels. Cela, peut nuire la biologie aquatique.

- **Matières organiques:**

Ce sont tous les déchets carbonés tels que la cellulose produite par les papeteries, le sucre et le lactosérum des industries agroalimentaires ainsi que les hydrocarbures (Koller., 2004).

- **Matières fertilisante:**

Les substances eutrophisantes ne peuvent être considérées comme contaminant chimique en termes de substance toxique. La présence d'azote et de phosphore en quantité excessive dans les cours d'eau entraîne la prolifération d'algues qui diminuent la luminosité et surtout consomment l'oxygène dissous dans l'eau (phénomène d'eutrophisation).

- **Les polluants chimiques:**

Certains polluants chimiques (des pesticides par exemple) sont particulièrement persistants. Ils résistent à la dégradation chimique et biologique. Les plus persistants sont les hydrocarbures chlorés comme le Dichloro Diphényl Trichloroéthane (DDT) qui s'accumule dans les tissus graisseux (Roberts *et al.*, 2006). Les métaux lourds tel que (plomb, mercure, cadmium, cuivre, zinc, nickel, chrome...etc.) forment une famille de polluants très dangereux.

3. Les métaux lourds

Ils constituent des polluants qui ne se dégradent pas dans l'environnement. Ces éléments s'accumulent dans les organismes vivants et peuvent contaminer l'ensemble d'une chaîne alimentaire (**Phillips., 1977**). En effet, plusieurs métaux lourds peuvent être très dangereux pour la santé de l'homme et pour les autres êtres vivants lorsqu'ils sont présents dans l'environnement à des concentrations élevées (**Fakayode., 2005**). Par contre certains sont des éléments nutritifs essentiels.

3.1 Origine des métaux lourds

Les métaux lourds peuvent provenir de plusieurs sources d'origine naturelles ou anthropiques.

- **Origine naturelle:**

Ces métaux lourds sont présents de façon naturelle dans le sol et sont majoritairement le résultat d'une altération de la roche mère du sous-sol. Toutefois, les différentes activités humaines contribuent également à augmenter leur quantité.

- **Origine anthropique:**

Les métaux provenant d'apports anthropiques sont présents sous des formes chimiques assez réactives et entraînent de ce fait des risques très supérieurs aux métaux d'origine naturelle qui sont le plus souvent immobilisés sous des formes relativement inertes (**Wesis et al., 1999**). Les sources anthropogènes sont les suivantes:

- Activités pétrochimiques
- Utilisation de combustibles fossiles (centrales électriques au charbon, chaudières industrielles, fours à ciment)
- Transport (véhicules et moteurs routiers et non routiers, embarcations)
- Incinération de déchets
- Produits (interrupteurs électriques, amalgames dentaires, éclairages fluorescents).
- Déchets urbains (eaux usées, boues d'épuration, ordures ménagères), agricoles.

3.2 Types des métaux lourds

- **Les métaux essentiels ou oligoéléments:**

Tous les métaux qui présentent un rôle biologique dans l'organisme tel que le zinc (Zn), cuivre (Cu), fer (Fe) magnésium (Mg) et manganèse (Mn). Ces éléments rentrent dans les réactions biochimiques de la matière vivante et ont ainsi un rôle nutritionnel (**Regoli., 1998**). Ces métaux sont les plus souvent liés à des protéines, exemple: le fer contenu dans l'hémoglobine et le manganèse présent dans la chlorophylle.

- **Les métaux non essentiels ou métaux toxiques:**

L'intérêt biologique pour les organismes vivants, ingérés à des doses minimales, ils sont toxiques; exemple: plomb, mercure, cadmium.

3.3. Caractéristiques principales des métaux lourds

Les métaux lourds ont de nombreuses propriétés et caractéristiques qui sont:

- Sont des éléments chimiques dont la masse volumique dépasse 5 g/cm^3 , bon conducteur de chaleur et d'électricité,
- Peuvent être classés en catégories selon leur aptitude à la complexation par un ligand donné.
- Les métaux lourds représentent 45% du corps humain. La plupart sont concentrés dans le squelette.
- Sa résistance est très haute stabilité, il n'est pas affecté par les facteurs météorologiques rapides et les composants de couleur.
- Ayant des caractéristiques de dureté et de malléabilité, se combinant aisément avec d'autres éléments pour former des alliages utilisés par l'homme depuis l'antiquité.
- Peuvent former des liaisons métalliques et perdre des électrons pour former des cations et forme des précipités non solubles avec les sulfures (**Lacoue-Labarthe., 2007**).

3.4. Toxicité des métaux lourds

Les concentrations environnementales des métaux traces (eau, air, sol, organismes) résultent d'apports anthropiques et naturels émis dans l'environnement, ils y sont redistribués dans les écosystèmes via les phénomènes de bioconcentration. Leurs présences affectent les

écosystèmes (**Donnier., 2007**) et ils s'avèrent toxiques potentiellement pour l'homme (**Loez et al., 1998**).

Du fait que, les éléments métalliques stimulent la réaction d'oxydation et favorisent la création de radicaux libres. Cette toxicité est due essentiellement à leur non dégradabilité et à leur tendance de s'accumuler dans les organismes vivants à court et/ou long terme. Ils peuvent provoquer une inhibition des métabolismes cellulaires tels que l'action inhibitrice de cuivre, plomb, mercure et de cadmium sur le système enzymatique à base de cytochrome P₄₅₀ (**Namour., 1992 ; Stien et al., 1997**). Des concentrations du métal peuvent altérer les tissus osseux (**Hemdan et al., 2006**), nerveux, hépatique (**Li and Lim., 2007**) et rénal (**Cai et al., 2001**).

En conséquence, ils peuvent induire des mutations dans le système immunitaire (**Kim et al., 2005**) et bloquer plusieurs enzymes nécessaires à la synthèse de l'hémoglobine. Ces effets sanguins aboutissent à une diminution du nombre des globules rouges et à une anémie .

Outre, les métaux sont considérés comme une substance cancérigène (**Viala., 1998**) pour l'homme est particulièrement nocive pour les nourrissons, les jeunes enfants et les femmes enceintes, et peut nuire de façon permanente au développement des enfants, y compris le développement intellectuel et le développement comportemental (**Jacques., 1999**).

4. La bioaccumulation

La bioaccumulation est le processus par lequel un organisme vivant absorbe une substance à une vitesse plus grande que celle avec laquelle il l'excrète ou la métabolise. Elle désigne donc la somme des absorptions d'un élément par voie directe et alimentaire par les espèces animales aquatiques ou terrestres. Le processus se déroule en trois temps (**Miquel., 2001**):

- L'assimilation
- La bioaccumulation par l'individu, ou bioconcentration
- La bioaccumulation entre individus, ou bioamplification

II. LE STRESS OXYDANT

1. Définition

En 1956 le stress oxydant est évoqué pour la première fois quand le chercheur Américain Denham Harman met l'hypothèse que le vieillissement peut être accéléré par une accumulation de dommages cellulaires et moléculaires provoqués par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Harman., 1956**). Par la suite, la notion de stress oxydant devient plus globale et peut désormais être définie comme un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et les capacités anti-oxydantes de l'organisme (**Favier., 2003**).

2. Origine du stress oxydant

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable, mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes.

Le stress oxydant peut avoir une origine endogène tels que la surproduction d'agent pro-oxydant d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants, ou une origine exogène tels les polluants photochimiques le tabac, les drogues, les radiations ionisantes ou les métaux lourds (**Favier., 1997**).

3. Conséquences du stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques qui ont subies:

3.1. Oxydation des acides nucléique

L'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Cinq classes principales de dommages oxydatifs par le radical hydroxyle OH• peuvent être générées: les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténares, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (**Cadet *et al.*, 2002**) (**Fig. 1**).

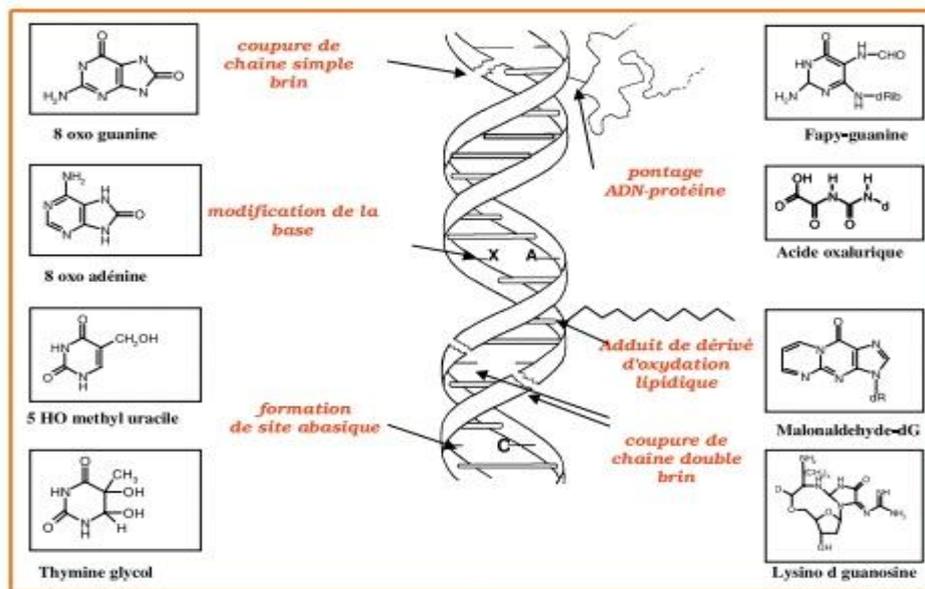


Figure 1: Les lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.

Ensuite, les ROS peuvent provoquer des mutations, ou endommager le mécanisme de réparation de l'ADN. Ils peuvent également induire des modifications au niveau de la transcription ou de la traduction de l'ADN et ainsi aboutir à la formation de protéines altérées. Ces modifications peuvent être à l'origine d'un vieillissement accéléré (Valko *et al.*, 2006). De plus, les lésions non réparés vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et entraîner soit des erreurs de lecture et de synthèse par des ADN polymérases trans-lésionelles infidèles aboutissant à une mutation ponctuelle dans le génome.

Ainsi, les radicaux libres ont notamment la capacité de pouvoir oxyder les bases nucléiques. La guanine est la base la plus touchée par ce phénomène et les dérivés oxydés les plus générés sont la 8-hydroxyguanine et la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (Dizdaroglu., 1992).

3.2. Peroxydation lipidique

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée oxydation des lipides ou peroxydation lipidique (mécanisme en chaîne de dégradation des acides gras membranaires conduisant à la formation d'hydroperoxydes

(ROOH) instables, responsables de la diminution de la fluidité membranaire, à l'altération irréversible de la membrane cellulaire entraînant la mort cellulaire) (**Esterbauer *et al.*, 1992**). Cependant, l'accumulation de ce dernier dans les membranes réduira l'activité des protéines transmembranaires (**Valko *et al.*, 2006**).

3.3. Oxydation du groupement soufré

Les protéines sont les constituants cellulaires les plus abondants et sont par conséquent des cibles importantes du stress oxydant. Des lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire, les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine détectables par leur fluorescence, des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées (**Favier., 2003**). Ces derniers qui sont modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...), deviennent hydrophobe et beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et essentiellement au protéasome. De plus, la nitration des protéines par addition du peroxy-nitrite sur les fonctions tyrosine peut induire de sévères modifications de fonction (**Baudin., 2006**).

3.4. Au niveau des glucides

Dans des conditions physiologiques, le glucose peut s'oxyder en présence des métaux traces, en libérant des cétoaldéhydes, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le OH·. Ces derniers qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde, formant un dérivé dénommé: Advanced glycation end Product (AGE) ou produit de Maillard. Ce phénomène de glycoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine.

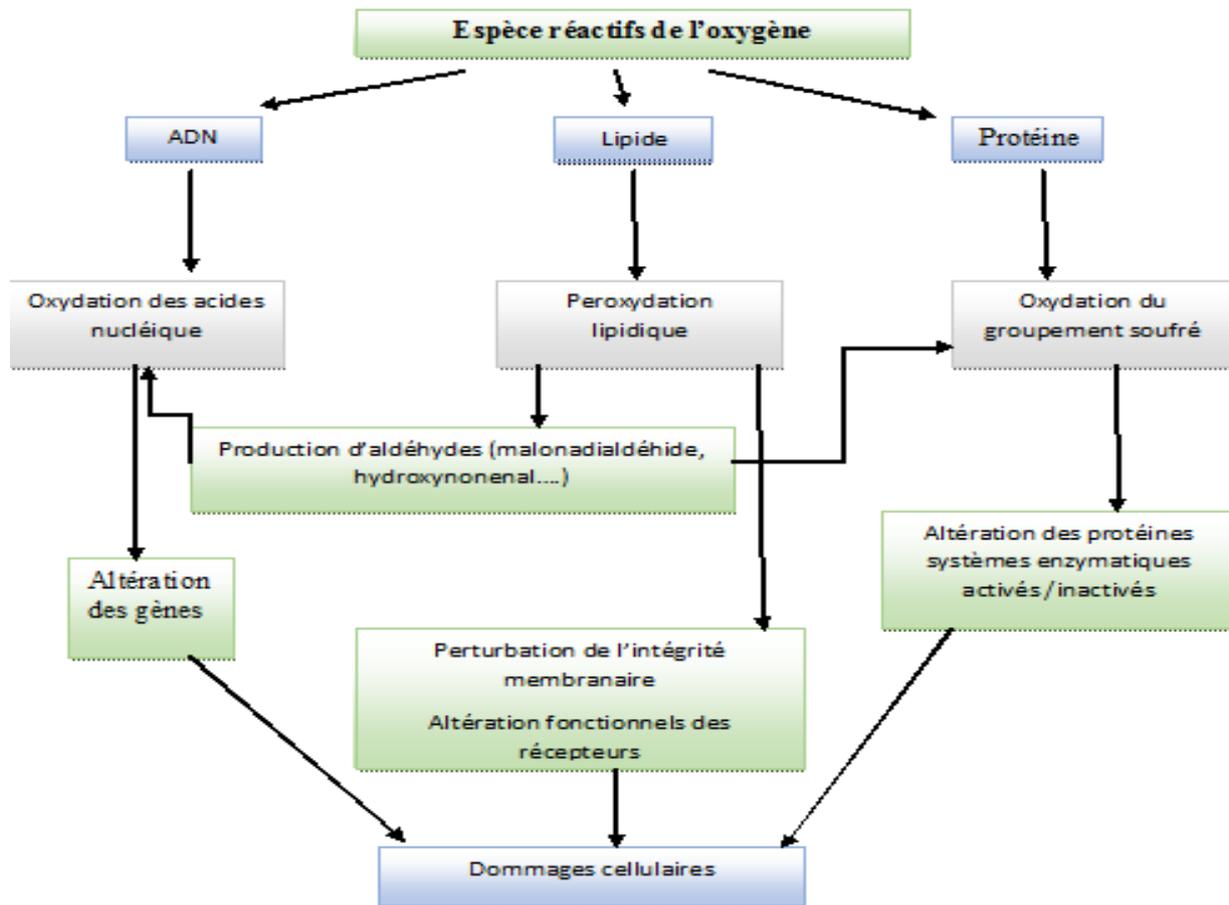


Figure 2: Les différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène

3.5. Autre conséquences biologiques

Ces derniers seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire:

Un faible stress augmentera la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion. Egalement un stress moyen facilitera l'apoptose, alors que un fort stress provoquera une nécrose et avec un stress violent la membrane cellulaire sera désorganiser, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le ce stress (Carcinogenèse, malformation des fœtus, fibrose, formation d'auto-anticorps, et immunosupression) (Favier., 2003).

4. Les maladies liées au stress oxydant

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydants et augmente la production mitochondriale de radicaux (Sohal *et al.*, 2002). Il sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: L'oxydation des lipides et celle de l'ADN via la formation de dérivés toxiques de l'oxygène sont respectivement impliquées dans le développement de maladies cardiovasculaires et du cancer (Isgaard *et al.*, 2002).

Il est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tels le diabète (Kusano and Ferrari., 2008), la maladie d'Alzheimer et les rhumatismes (Montagnier *et al.*, 1998), la recrudescence des cas d'Arthrose, polyarthrite rhumatoïde et de l'Inflammation (Zafrilla *et al.*, 2002).

5. Les radicaux libres

5.1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant un électron non apparié sur son orbitale externe, qui la rend très fortement réactive. Cette réactivité est variable suivant la nature du radical et des biomolécules qui sont la cible. Du fait, de sa très grande réactivité, un radical libre a une durée de vie très courte (10^{-3} à 10^{-6} seconde) (Lenaz *et al.*, 2002). Parmi les (ROS), on dénombre une majorité de radicaux libres.

Il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Ces radicaux dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle OH^{\cdot} ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\cdot} (Yoshikawa *et al.*, 2000).

D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (Favier., 2003) (Tab. 1).

Tableau 1 : Les principales espèces réactives (Poisson., 2013).

Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	oxygène singulet (1O_2)
Radical hydroxyle ($\cdot OH$)	Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
Monoxyde d'azote ($NO\cdot$)	Nitroperoxyde ($ONOOH$)

Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Yoshikawa *et al.*, 2000).

5.2. Source des radicaux libres

La production des EROs peut provenir d'un processus enzymatique ou non enzymatique (Thannickal., 2000).

5.2.1. Production intracellulaire

La réaction de réduction de l'oxygène dans la chaîne respiratoire mitochondriale, au cours de ce mécanisme, sont libérées deux formes de radicaux libres: le radical anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle $\cdot OH$ (Ji., 2001). La myéloperoxydase (MPO) produit l'acide hypochloreux qui amplifie la production des ERO (Serteyn *et al.*, 2003).

Ajoutant qu'il existe différents systèmes enzymatiques présents dans les cellules de notre organisme comme la superoxyde dismutase (SOD), la XO et la NO Synthase (NOS) produisent en permanence des ROS (Cadenas *et al.*, 2000). D'autres enzymes sont des sources de génération des radicaux libres tel que, les déshydrogénases, oxygénases, cyclo-oxygénase, les lipoxygénases, peroxydases et la xanthine oxydase (Fig. 3).

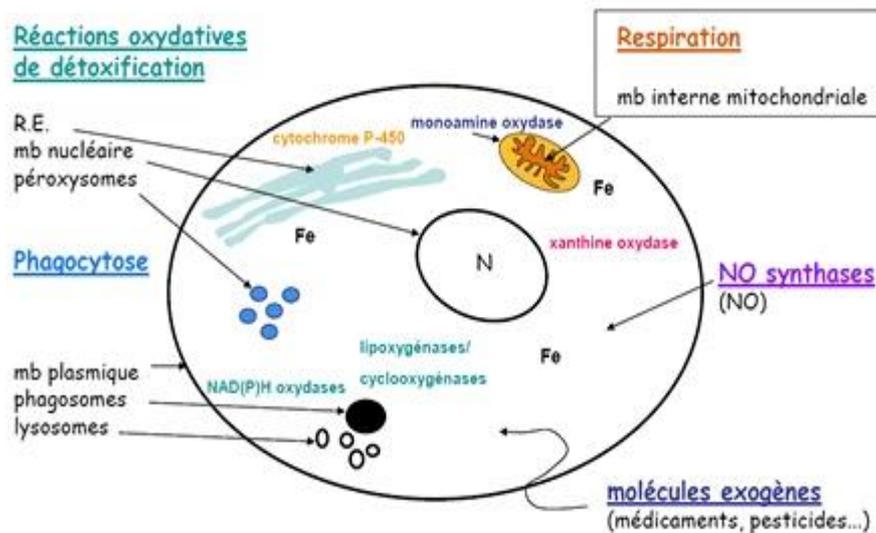


Figure 3: Sites de production intracellulaire des radicaux libres (Serteyn *et al.*, 2003).

De même, ils sont produits in vivo sous l'action de plusieurs systèmes biochimiques tel que: les neurones, les cellules endothéliales et phagocytaires ou les cellules du système immunitaire. Ainsi, une anomalie génétique aboutissant à un mauvais codage protéinique peut de même accroître la production de radicaux libres (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

5.2.2. Production extracellulaire

L'environnement dans lequel nous vivons tout comme notre mode de vie sont à l'origine d'une augmentation de la production de ROS dans notre organisme et sont générateurs du stress oxydant (Fearon *et al.*, 2011).

- L'exposition prolongée au soleil, ainsi les rayonnements UV induisent la synthèse O_2^- , $d'OH\cdot$, 1O_2 et $d'H_2O_2$ l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants (Chen *et al.*, 2012).
- L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2) présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels), ainsi qu'une alimentation « chimique » (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool...), sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres (Mena *et al.*, 2009) qu'une alimentation déséquilibrée (carences en vitamines et oligo-éléments) ou encore les situations cliniques (chirurgie, transplantation).

5.3. Importance des radicaux libres

Les radicaux libres ne sont pas uniquement toxiques, mais aussi indispensables à la vie et remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles. Ils jouent également un rôle bénéfique dans la synthèse de l'ADN, des hormones stéroïdes, des acides gras insaturés et dans la biosynthèse des mitochondries. Elles peuvent aussi contribuer à l'interruption de la chaîne d'oxydation des lipides. Leur capacité oxydante est utilisée dans des fonctions de signalisation et de transcription essentielles pour le fonctionnement normal et la survie des cellules. Bien que, dans l'apoptose des cellules cancéreuses, dans la réponse immunitaire **(Harman., 1956)**.

6. Les antioxydants

6.1. Définition

Les antioxydants sont des molécules qui, existent en faible concentration dans nos corps. Ils sont capables d'empêcher ou retarder l'oxydation les constituants cellulaires **(Halliwell and Whiteman., 2004)** par la neutralisation des radicaux libres.

6.2. Système antioxydant

Le système de défense antioxydant correspond à un ensemble d'antioxydants exogène et endogène, enzymatique et non-enzymatique **(Mates *et al.*, 1999)** pour contrôler l'oxydation et ses effets négatifs. Il comprend plusieurs lignes de défenses qui visent à prévenir la formation des radicaux libres, les neutraliser quand ils sont déjà formés, réparer leurs dégâts et/ou prévenir les conditions favorables à leur formation.

6.2.1. Les antioxydants enzymatiques

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate) **(Favier., 2006)**. Ce sont de véritables armes, qui ont chacune leur lieu et leur mode d'action, tout en agissant de manière complémentaire:

6.2.1.1. Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases sont le premier et le plus important élément de défense contre les ERO et plus particulièrement contre l'anion superoxyde **(Zelko *et al.*, 2002)**, il

existe trois isoformes qui diffèrent par leurs localisations et leurs cofacteurs : la SOD1, la SOD2 et la SOD3 (**Rae et al., 2001**).

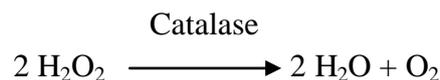
La SOD1 et la SOD3 ont pour cofacteur des ions cuivre ou zinc tandis que la SOD2 utilise des ions manganèse (**Hassan et al., 1988**). Leur principale fonction consiste à catalyser la décomposition du radical anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène moins toxique selon la réaction suivant:



6.2.1.2. Les catalases

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes, les hématies et les glutathion peroxydases (**Ganther., 1999**).

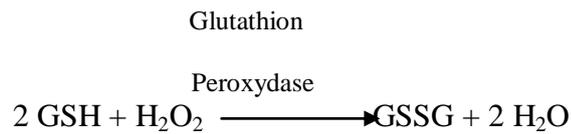
Elle diminue également la présence de $\text{OH}\cdot$ en catalysant sa décomposition quasi-instantanément après sa génération (**Fridovich., 1999**), leur rôle est de catalyser la dismutation du H_2O_2 selon la réaction suivant:



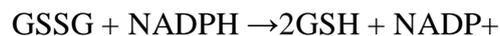
6. 2.1.3. Les glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases (GSH-Px) sont des enzymes à sélénium. Présentent dans les liquides extracellulaires ainsi que dans les cellules, au sein du cytosol et des mitochondries. Ces enzymes sont sans doute le principal système de protection car elles détruisent non seulement H_2O_2 , mais aussi les peroxydes organiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol.

Ensuite, la (GSH-Px) considérée comme un agent protecteur de l'hémoglobine. Elle catalyse également la réduction des hydroperoxydes et l'élimination des radicaux lipidiques par le glutathion réduit (**Brigelius-Flohe., 1999**).



D'autres enzymes à caractère antioxydant sont également présentes dans l'organisme ; t'elle que, la glutathion réductase (GR) associée au NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) qui permet la régénération du glutathion réduit.



6.2.2. Les antioxydants non-enzymatiques

Il s'agit de composés facilement oxydables présents dans le cytoplasme (glutathion, acide ascorbique) ou dans les membranes cellulaires (alpha-tocophérol, caroténoïdes). Ces antioxydants possèdent le caractère hydrophile ou lipophile (**Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003**). Ils sont trouvés en grande quantité dans l'alimentation (**Koechlin-Ramonatxo., 2006**).

6.2.2.1. Les métallothionéines

Les métallothionéines (MTs) sont des protéines à faible poids moléculaire (<7000 Da) présentes dans tous les organismes vivants. Elles sont riches en résidus de cystéine 20 à 30% de la totalité des acides aminés.

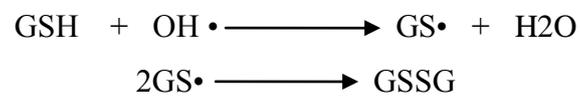
En effet, Les (MTs) appartiennent au groupe des biomarqueurs qui contribuent à limiter la toxicité des xénobiotiques, l'induction de MTs est une réponse biologique à une exposition métallique dans l'environnement, cette caractéristique est typique de biomarqueurs (**Lagadic *et al.*, 1997**). Plusieurs études ont montré que les MTs neutralisaient les radicaux libres comme l'OH• ou l'O₂•⁻ (**Kumari *et al.*, 1998**). La fonction de piègeur les EROs par les MTs ne se limite pas au radical hydroxyle, certains dommages de l'ADN induits par d'autres types d'ERO (peroxyde d'hydrogène, radical superoxyde) sont aussi inhibés par les MTs.

6.2.2.2. Le glutathion

Le glutathion ou le tri-peptide (L-γ-glutamyl-L-cystéinyglycine), c'est le plus abondant thiol non protéique libre au niveau cellulaire. De multiples fonctions sont assurées

par ce puissant antioxydant (**Vivancos et al., 2010**). Comme, il existe sous deux formes (glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG) et le rapport GSH/GSSG est hautement régulé par

le système glutathion réductase. Il maintient aussi le caractère nucléophile et radicalaire (**Baudin., 2006**)



III. LES MOLLUSQUES BIVALVES

Les mollusques sont des invertébrés, Elles sont représentées par environ 7000 espèces adaptées aux milieux aquatiques. Ce phylum renferme les métazoaires parmi les plus familiers. Ce sont des animaux à corps mou, la plus part d'eux pourvus d'une coquille externe.

Ces derniers sortent de leurs œufs avec leur coquille qui croit en même temps que l'animal par ajout de matière à la coquille existante. On distingue trois types de coquille, celle composée d'une, de deux ou plusieurs parties nommés valves, respectivement les univalve, les bivalves et les multivalves. La coquille est constituée de 89 à 99% de carbonate de calcium, du phosphate tricalcique, des silices, du sulfate de calcium, du carbonate et de magnésium. Essentiellement, elle est stratifiée de trois couches différentes.

Les bivalves sont constitués d'une coquille formée de deux parties distinctes et attachées, plus ou moins symétriques (**Spadem and Adagp., 1972**). La classe des bivalves regroupe un grand nombre d'espèces aquatiques particulièrement différentes. D'où ces espèces colonisent les eaux salées et les eaux douces.

Il s'agit généralement d'un groupe d'animaux fouisseurs, grâce à leur pied musculieux (**Fischer et al., 1987**). Certain d'eux vivent libre (les Donacidées la palourde et la coquille Saint-Jacques). D'autres peuvent s'attacher au substrat par le byssus (la moules) ou en cimentant une de leurs valves (huîtres).

1. Présentation de l'espèce *Donax trunculus*

Le bivalve *D. trunculus* est connue sous divers noms: haricot de mer, tenille ou filon tronqué, appartient à la famille des Donacidae (**Linnaeus., 1758**) c'est une espèce filtreuse, sédentaire, comestible et sentinelle. Elle est utilisée comme un excellent bioindicateur pour tester l'impact écotoxique des polluants sur plusieurs environnements marins (**Usero et al., 2005**) (Fig. 4).



Figure 4: L'espèce *D. trunculus*.

1.1. Morphologie

▪ Externe :

Ce bivalve possède une coquille solide, peu renflée, allongée triangulaire et de forme subrectangulaire, de couleur externe jaune clair au jaune foncé et d'une couleur interne du blanc au violet, elle est menue de stries de croissance (**Bougis., 1976**). Un charnière de deux petites dents cardinales et des dents latérale à chaque valve (**Fig. 5**).



Figure 5: Morphologie externe de la coquille

▪ **Interne :**

Le corps de l'espèce est mou, non segmenté, comprimé latéralement. Il est dépourvu de tête distincte (acéphale) ni appareil masticateur. La masse viscérale est enveloppée par un manteau, constituée de deux lobes qui sécrètent et supportent chacune des valves de la coquille. Les bords externes du manteau sont parfois plus au moins soudés, formant vers l'arrière deux siphon permettant l'entrée de l'eau (siphon inhalant et siphon exhalant). Les branchies sont de type eulamellibrance (**Mouëza., 1971**).

Qualifié, d'un pied, présentant un organe musculoux ventral et turgescent, constitue un point solide d'encrage pour l'animal. Le fouissage ou la locomotion sont également assurés par le pied (**Fisher et al., 1987**).

1. 2. Classification de l'espèce

Embranchement: Mollusques

Classe: Bivalves

Ordre: Eulamellibrance

Sous-ordre: Hétérodonta

Famille: Donacidae

Genre: *Donax*

Espèce: *trunculus* (**Linnaeus., 1758**)

1.3. Physiologie

1.3.1. Nutrition

Les donacidéés sont des animaux adaptés à un fouissage rapide et peu profond en milieu sableux plus ou moins agité (**Degiovanni and Mouëza., 1972**). Elles absorbent les particules en suspension les plus fines (suspensivore) ou récoltent celles déposées sur le sédiment grâce à leur siphon allongé (dipositivore). Ce sont des consommateurs microphages suspensivores, se nourrissant de phytoplancton (**Moueza and Chessel., 1976**), et de particules organiques en suspension (**Wade., 1964**).

1.3.2. Reproduction

L'espèce *D. trunculus* est gonochorique (Fisher *et al.*, 1987) d'où les sexes sont séparés et la fécondation est externe, les gamètes sont expulsés par le siphon exhalant dans le milieu extérieur (l'eau) où se déroule la fécondation.

La gonade n'est pas un organe anatomiquement distinct, mais s'étend de façon diffuse dans la masse viscérale (El-Hamidi., 2003). On peut la distinguer par la couleur de la gonade située au dessus du pied durant le stade d'activité sexuelle, D'où, le mâle présente une couleur blanche ou jaunâtre à produit sexuel blanc et visqueux, alors que la femelle montre une gonade bleue intense à produit sexuel bleu et granuleux (Mouëza and Frenkiel-Renault., 1973) (Fig. 6). La reproduction s'étale de février jusqu'à septembre, avec deux périodes d'activité sexuelle (Ansell *et al.*, 1980).

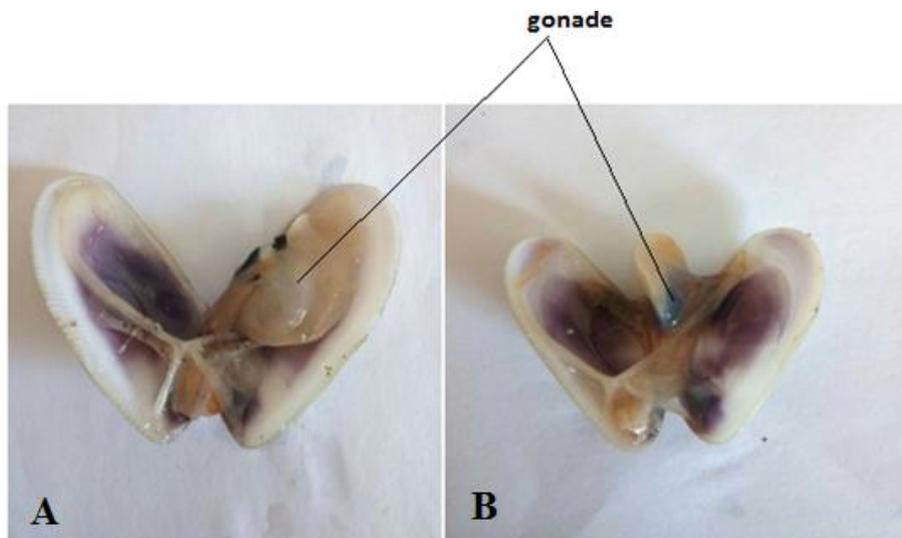


Figure 6: Morphologie interne de l'espèce *D. trunculus* (-A- individu mâle ; -B- individu femelle).

1.4. Habitat

Le *D. trunculus* est l'une des espèces les plus dominantes dans les milieux sédimentaire. Il s'observe sur toutes les plages faisant face au large. Cette espèce littorale est

très commune. Selon (Guillou., 1980), les zones colonisées par cette espèce sont fortement exposées aux houles.

Cependant, les travaux de (Bayed., 1998) soulignent que l'espèce est très abondante dans les zones de saturation et à cette raison, elle sera soumise en permanence à l'hydrodynamisme. De plus, se rencontre dans les zones Méditerranéenne, Lusitanienne, Mauritanienne, Indopacifique et Sénégalienne.

2. Présentation de l'espèce *Mytilus galloprovincialis* (Linnaeus., 1758)

Connue sous le nom de la moule bleue ou méditerranéenne. Elle appartient à la famille Mytilidae (Pélicypodes). Son corps est équivalve et le mode de sa nutrition est suspensivore et filtreux. De plus, l'espèce est très consommée par la population et utilisée comme un bioindicateur de pollution (Almeida *et al.*, 2004) (Fig. 7).



Figure 7: Un échantillonnage de la moule *Mytilus galloprovincialis*.

2.1. Morphologie

▪ Externe:

Le bivalve *M. galloprovincialis* est caractérisé par une coquille de couleur bleue violée et parfois sombre ou brune, elle recouvre les côtés droit et gauche du corps. Bien qu'elle, s'articule dorsalement autour d'un dispositif marginal appelé charnière qui permet d'observer trois ou quatre petites dents très peu développées et d'une structure élastique, le ligament. Elle est fermée par contraction d'un ou deux (parfois trois) muscles adducteurs qui s'insèrent chacun sur la face interne des deux valves (Beaumont and Truchot., 2004).

▪ **Interne:**

Il s'agit d'un corps mou, forme une masse viscérale globuleuse (**Gauroy., 1972**), non segmenté, sans tête différenciée (Acéphales), enveloppé dans un manteau. Ce dernier constituée de deux lobe de tissus et entoure les organes:

Un système nerveux est formé de trois paires de ganglions: une paire de ganglions cérébroïdes, une deuxième viscéraux, et une autre pédieux. Ces derniers réunis entre eux par des filets nerveux ou connectifs. De plus, une bouche présente une fente transversale dépourvue de radula et s'ouvre directement dans l'œsophage. Des branchies (expansions tégumentaires respiratoires) qui flottent dans la cavité palléale reliées chacune à la masse viscérale par l'axe branchial. Ainsi, un cœur formé d'un ventricule médian, traversé par le rectum et deux oreillettes (**Nicholson., 2002**).

2.2. Classification

Embranchement: Mollusques

Classe: Bivalve (Lamellibranches)

Sous classe: Ptériomorphe

Ordre: Mytiloidés

Famille: Mytilidés

Genre: *Mytilus*

Espèce: *galloprovincialis* (**Linnaeus., 1758**).

2.3. Physiologie

2.3.1. Nutrition

Concernant la répartition des moules, ces dernières prolifèrent dans les zones riches en plancton, de matière organique en suspension (**Wade., 1964**) par ailleurs, la surface corporelle de la moule absorbe la matière organique dissoute dans l'eau. Ces particules filtrées par l'eau de mer à travers les branchies et récupère les particules qui y sont retenues.

2.3.2 Respiration

Le courant de l'eau est très important dans différente fonction biologique de l'espèce, par estimation de la quantité filtrée à travers les branchies de 3 à 5 litre par heure. L'eau chargée en oxygène dissout, pénètre dans la cavité palléale via le siphon inhalant. Elle est filtrée par les filaments des deux paires de branchie lamelleuse avant d'être évacuée par le

courant exhalant, la respiration est donc branchiale. L'oxygène ainsi, capté pénètre dans l'hémolymphe pour être distribuer dans tout l'organisme, et rejette encore le gaz carbonique dans celle-ci (**Fig. 8**).

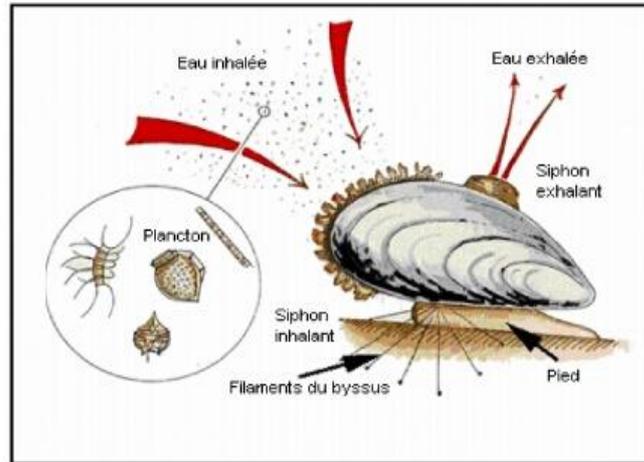


Figure 8: Système respiratoire et alimentaire chez la moule (MPO., 2003).

2.3.3. Reproduction

La reproduction de *M. galloprovincialis* est continue durant toute l'année (Naciri., 1998) avec une période de repos sexuel très réduite. Elle est externe et se fait dans l'eau de mer. Les tissus reproducteurs représentent un tiers important de la masse de chair (Duchemin., 2007). La gonade est composée de plusieurs conduits, ciliés et ramifiés et un nombre de sacs appelés follicules (Lucas., 1965). Chez le mâle, la gonade est de couleur jaunâtre, tandis que chez la femelle, elle est de couleur orangé (Fig. 9).

Les gonades se différencient par cinq stades de développement successives: repos sexuel, reprise d'activité génétique, gamétogénèse, maturation génitale et émission de gamètes.

Leur développement se fait en fin de l'automne lorsque la température diminue (Beaumont and Truchot., 2004).

Bien que, les sexes sont séparés (gonochorisme), il est fréquent d'observer dans les moulières que beaucoup d'animaux libèrent leurs gamètes simultanément (Lubet., 1959). Dans ce cas, la fécondation peut avoir lieu dans la cavité palléale. Le sperme actif semblerait sécréter ou

véhiculer une substance qui stimulerait les femelles mûres, entraînant la ponte, ce qui facilite la fécondation (Songy and Avezard., 1963).

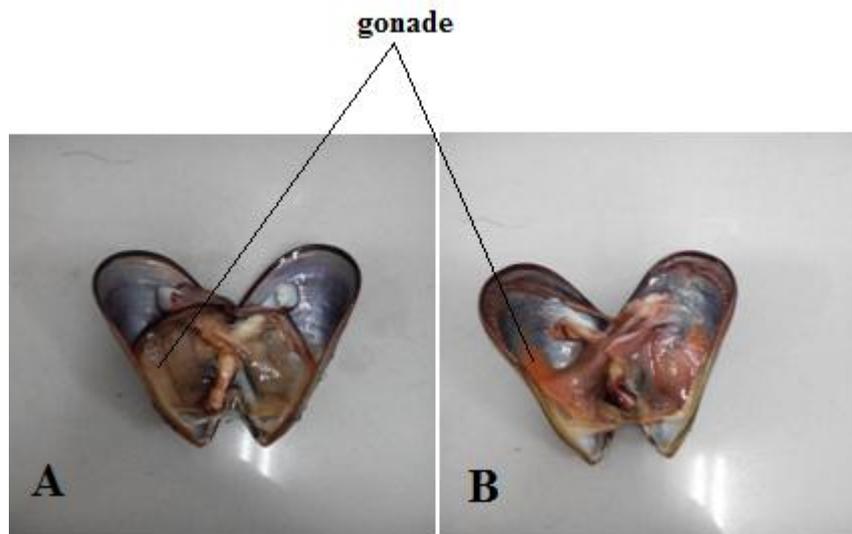


Figure 9: Morphologie interne de l'espèce *M. galloprovincialis* (-A- individu mâle,-B- individu femelle).

2.4. Habitat

M. galloprovincialis est originaire de la méditerranée, la mer noire et l'adriatique. Elle a fait l'objet de plusieurs introductions dans le monde: Afrique du sud, Est et Ouest de l'Amérique du Nord, Nord Est de l'Asie. Elle vit à faible profondeur, depuis le niveau le plus élevé de la zone intertidal jusqu'à environ 10 m en dessous. La moule vit en colonies, se développe sur les rochers solidement attachée grâce à des filaments très résistants (le byssus) (Songy and Avezard., 1963).

3. Les bio-indicateurs

Un bioindicateur est un organisme utilisé pour évaluer les conditions environnementales dans lesquelles il vit (Van Gestel and Van Brummelen, 1996; Kaiser., 2001; Markert *et al.*, 2003). Cet organisme est souvent choisi pour des études de biosurveillance. Bien que, les modifications physiologiques et morphologiques, son abondance ou son succès reproductif, reflètent les changements que l'habitat subit (Lévêque and Mounolou., 2008).

Matériel

Et

Méthodes

IV. MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1 Lieu d'études

La ville d'Annaba est la plus importante zone touristique et économique côtière située à l'est Algérien. Elle est caractérisée par une côte qui s'étend de 40 Km, limitée de l'est par le Cap Rosa ($8^{\circ} 15' E$ et $36^{\circ} 58' N$), et de l'ouest par le Cap de Garde ($5^{\circ} 16' E$ et $36^{\circ} 58' N$). La ville est considérée comme étant la plus polluée sur le territoire national et dans le nord Africain. Son golfe est contaminé par de grandes quantités de polluants d'origine urbaine, agricole, portuaire et aussi les par les activités industrielles.

1.2. Choix des sites

Les sites d'étude sont situés le long du golfe d'Annaba, six sites ont été sélectionnés (**Fig.10**).

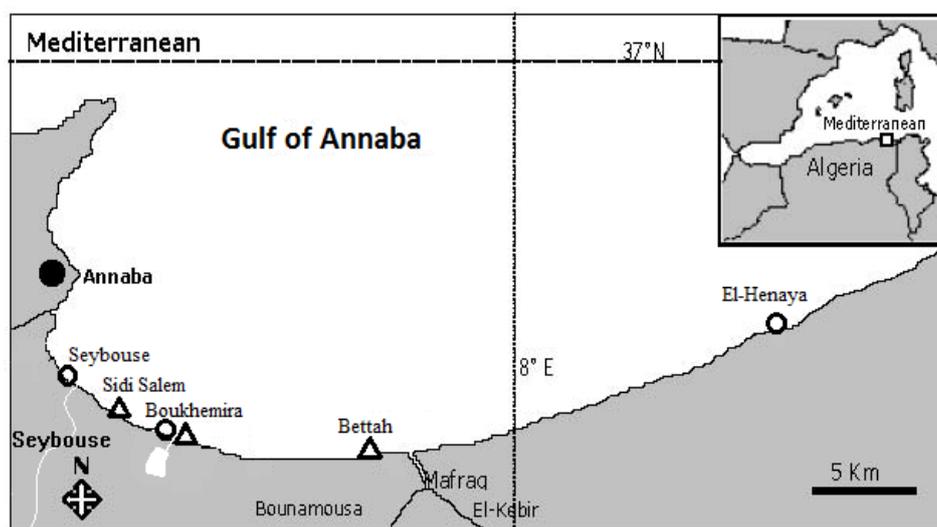


Figure 10: Carte géographique de la côte d'Annaba, représentant les sites d'échantillonnages.

Δ Sites d'échantillonnage de *D. trunculus*.

⊙ Sites d'échantillonnage de *M. galloprovincialis*.

1.2.1 Présentation des sites de prélèvement de *Donax trunculus*

- **Site 1 «El-Bettah»:** Le site se trouve exactement à ($7^{\circ} 56' 35 64''$ E et $36^{\circ} 50' 52 60''$ N). D'où les apports de l'estuaire de l'oued Mafragh considéré comme un site non pollué dans la mesure où la pollution sous entend les éventuels polluants situés en amont de l'oued et qui sont les agriculteurs occasionnels ne sont ni répertoriés, donc inscrits au registre de commerce, ni connus pour exercer une activité sédentaire et qui utilisent des fertilisants de manière anarchique (**Fig. 11 et 10**).



Figure 11: Site El-Bettah.

- **Site 2 «Sidi-Salem»:** Il est localisé selon les deux longitudes ($7^{\circ} 48' 55 44''$ E et $36^{\circ} 50' 55 22''$ N). Le site est exposé aux eaux brutes usées et non traitées de la ville d'Annaba. Il présente une plaie largement ouverte, renferme une bouche d'égout qui collectait jusqu'en 2008 date de sa fermeture après quarante années. Cette dernière entraînait des effets néfastes sur les écosystèmes. Des effets catastrophiques se poursuivront tant que la station d'épuration n'est pas opérationnelle. Ce site victime, reçoit des rejets industriels non traités (**Fig. 12 et 10**).

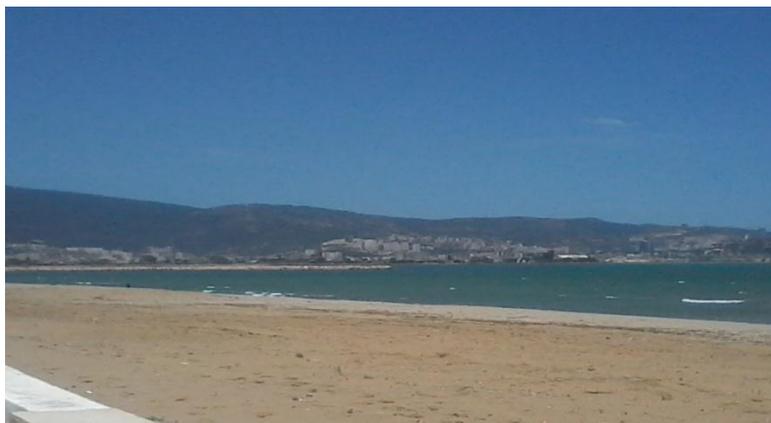


Figure 12: Site de Sidi Salem.

- **Site 3 «Boukhemira »:** Le site de Boukhemira, se localise entre la cité de Sidi Salem et d'El-Chatt, en face de l'aéroport Rabeh Bitat. Son orientation géographique est ($7^{\circ} 46' 25''$ E et $36^{\circ} 50'07''$ N). Il reçoit par le biais de l'oued Boukhemira de forte pression anthropique sous formes de rejets urbaines (**Fig.13 et 10**).



Figure 13: Site Boukhemira.

1.2.2. Présentation des sites de prélèvement de *Mytilus galloprovincialis*

- **Site 2 «El-Henaya»:** Le premier site de prélèvement a pour coordonnées ($8^{\circ} 07' 17 22''$ E et $36^{\circ} 54'26 76''$ N). Ce site a été retenu pour sa particularité à savoir son éloignement des zones industrielles et/ou urbanisées. En effet, il est situé à l'est de l'oued Mafragh et de Cap Rosa. El-Henaya n'étant pas qu'une appellation mais c'est aussi un attribut puisque elle veut dire pente abrupte. C'est pourquoi la plage a été

épargnée de la pollution et de son emplacement éloignée des routes et des décharges sauvages lui permis de jouer surtout d'un quasi normalité (Fig. 14 et10).



Figure 14: Site d'El-Henaya (Drif., 2012).

- **Site2 «le Seybouse»:** Le site de prélèvement a pour coordonnées (36° 52' 06 44" E et 7° 46' 25 27" N). Il se trouve non loin de l'oued du même nom qui charrie des déchets urbains. L'oued regorge de rejets de la zone industrielle et agricole tous proche ce qui amplifié les méfaits de la pollution, Ce site est le plus pollués (Fig.15).



Figure 15: Site Seybouse.

- **Site 3« Boukhemira »:** Le site est considéré comme un site polluée.

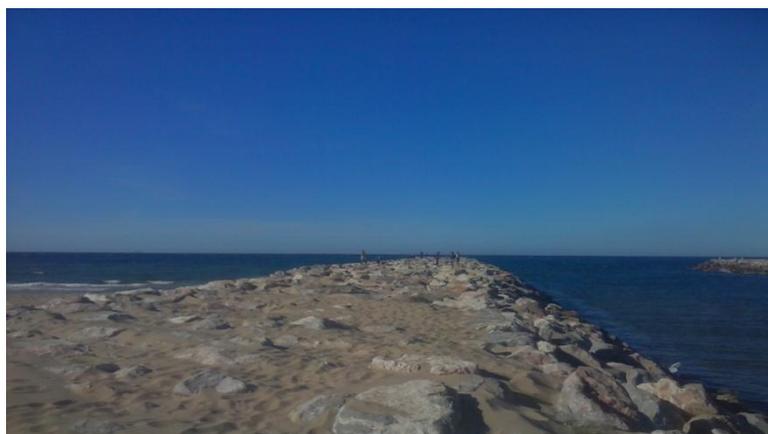


Figure 16: Site Boukhemira.

1.3. Choix des espèces

Le bivalve *Donax trunculus* (Linnaeus., 1758) est un mollusque comestible très répandu dans le golfe d'Annaba (Vassière and Fredj., 1963), il est très consommé par la population locale puisque c'est facile à l'échantillonner. C'est un organisme filtreur et sédentaire, qui se nourrit de phytoplancton et de la matière organiques en suspension.

La moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* (Linnaeus., 1758), est un mollusque bivalve considérée comme un excellent bioindicateur de la contamination des milieux marins dans lequel elle vit, puisqu'elle possède la propriété d'accumuler les contaminants présents dans ces milieux.

1.4. Prélèvement des espèces

- ***Donax trunculus*:**

Sur les trois sites d'échantillonnages, les tellines sont prélevées aléatoirement (sans choisir les dimensions) à main, durant le mois de Mars 2018. Elles sont rincées délicatement avec de l'eau de mer, ensuite les individus ont été séparés selon la nature du sexe. En précisant la coloration des gonades (blanchâtre pour les mâles et bleu intense pour les femelles), les individus sont placés dans des sachets pour les congeler. A raison, de les transportées au

laboratoire d'écophysiologie animal à Annaba dans une glacière pour effectuer les dosages. Le nombre d'effectifs utilisé dans le dosage été n=4.

▪ ***Mytilus galloprovincialis*:**

L'échantillonnage de *M. galloprovincialis* a été réalisé à main à l'aide d'un couteau durant la même période de l'échantillonnage précédant. Les échantillons ont été répartis selon sexe (coloration du tissu gonadique intégré dans le conjonctif du manteau: des lobes blanchâtres pour les mâles et orangés pour les femelles). Les mêmes étapes sont poursuivies pour la congélation et le transport au laboratoire, afin de réaliser les dosages.

2. Méthodes

2.1 Dosage du malondialdéhyde (MDA)

▪ **Principe :**

Le malondialdéhyde est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA). Les taux du MDA ont été évalués selon la méthode d'**Ohkawa et al. (1979)**. Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (95 °C) en présence de l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment coloré en rose. Finalement, lire la densité optique à 530 nm.

▪ **Préparation de l'homogénat :**

Le dosage de MDA a été fait au niveau du corps, l'hépatopancréas et les gonades des individus mâles et femelles choisis. Un poids de 100 mg de chaque tissu a été mis en présence de 9 ml de KCl, puis il a été broyé à froid (4 °C) en utilisant un broyeur mécanique pendant une minute pour obtenir un homogénat.

▪ **Mode opératoire :**

- Prendre 100 mg de l'échantillon + 9 ml KCl et homogénéiser.
- Prélever 200 µl de l'homogénat + 200 µl SDS .
- Ajouter 1,5 ml de glacial acetic acide et mélanger.
- Ajouter 1,5 ml d'acide thiobarbiturique (TBA).
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 95 °C pendant 1 h.

- Ajouter 1 ml H₂O distillée + 5 ml (n-butanol pyridine) et mélanger.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 4000 tours/min.
- Récupérer le surnageant et lire la densité optique à 530 nm contre le blanc.

▪ **Calcul de la concentration :**

$$[\text{MDA}](\text{nmol MDA/g tissu}) = \text{Absorbance} \times 2665$$

2.2 Dosage du glutathion réduit (GSH)

▪ **Principe :**

Le dosage du glutathion réduit a été réalisé selon la méthode de **Weckbecker and Cory (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman, DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela, une déprotéinisation de l'homogénat est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion. Ainsi, lire la densité optique par spectrophotomètre à 442nm.

▪ **Préparation de l'homogénat :**

Le dosage du GSH a été fait au niveau du corps, des gonades et de l'hétopancréas des individus mâles et femelles. Le poids de 100 mg de chaque tissu a été mis en présence de 4 ml d'une solution d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) (0,02 M) dans un bain de glace, ensuite broyés à l'aide d'un broyeur mécanique pour récupérer un homogénat.

▪ **Mode opératoire :**

- Prélever 0,8 ml de l'homogénat.
- Déprotéiniser en ajoutant 0,2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25 %.
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- Prélever 0,5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml du tampon Tris + EDTA (0.02 M d'EDTA) à pH 9,6.
- Mélanger et ajouter 0,025 ml de DTNB (0,01 M) (dissous dans le méthanol absolu).
- Laisser pendant 5 min à température ambiante pour la stabilisation de la couleur qui se développe instantanément.
- Lire à 442nm la densité optique.

▪ Calcule de la concentration :

La concentration du glutathion réduit est obtenue par la formule suivante:

$$[\text{GSH}] (\mu\text{M GSH mg pr.}) = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525}{13100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg proteins}}$$

3. Histologie des gonades

▪ Principe :

L'étude histologique des gonades des deux bivalves le *Donax trunculus* et de *Mytilus galloprovincialis* a été effectuée au niveau du laboratoire central d'anatomie et de cytologie pathologique de l'hôpital de Skikda. Afin, de confirmer les altérations tissulaire ont utilisant un microscope optique. La technique se repose sur les étapes suivantes: fixation, inclusion, coupe, coloration et montage.

▪ Technique :

Le tissu frais des gonades (mâle et femelle) de chaque site et des deux espèces a été préparé préalablement (durant la dernière semaine du mois de mai) dans des crachoirs contenant du formol pour la conservation.

- Fixation :

La fixation permet la conservation des structures et le durcissement des pièces, par immersion de l'échantillon dans un grand volume de liquide fixateur les échantillons séjournent un jour dans un appareillage (automate).

Dans un premier temps, une déshydratation par immersion successives dans des bains d'alcool à degré croissant (30 minutes dans un bain d'alcool à 70°, deux bains successifs de 15 minutes dans de l'alcool à 95° puis trois bains de 30 minutes dans de l'alcool à 100°). Ensuite, l'alcool est remplacé par du toluène (trois bains de 15 minutes chacun).

- **Inclusion (Enrobage):**

Pour cette étape, les échantillons sont placés dans une l'étuve portés dans un moulage de paraffine liquide. Après refroidissement, des blocs de paraffine durs ont été obtenus, à l'intérieur desquels se trouvent les échantillons inclus et orientés selon un plan de coupe choisi (**Fig. 17**).



Figure 17: Présentant l'étape de l'inclusion (Enrobage).

- **Coupe:**

Les coupes des blocs de paraffine, ont été réalisées à l'aide d'un microtome de type Leitz, avec une épaisseur de $6\mu\text{m}$. En suite, ils sont collés sur des lames de verre grâce à de l'eau albumineuse (**Fig.18**).



Figure 18 : Présentant la réalisation des coupes.

- **Coloration:**

Les lames doivent être déparaffinées avant de pouvoir être réhydratées (coloration à l'hématoxyline-éosine). Le déparaffinage consiste à chauffer les lames, jusqu'à fusion de la paraffine, avant de les immerger dans trois bains successifs de toluène en suite les colorées selon les étape suivant:

- Xylène.....10Mn
- Alcool.....15M
- Eaucouran.....5Mn
- Hemalun.....10Mn
- H₂O (Robinet) Passage
- Eosine15Mn
- H₂O (Robinet)Passage
- Alcool30 second
- Alcool.....30second
- Xylène + AcétonePassage

- **Montage:**

Après avoir subi une nouvelle déshydratation (deux bains d'alcool à 95° et 100°, trois bains de toluène), les lames colorées sont montées entre lames et lamelles avec une résine synthétique (EUKITT). Les lames sont alors prêtes pour être observées au microscope.

- **Observation:**

L'observation des coupes histologiques a été réalisée avec un microscope optique (Leika) avec le grossissement (×400). La prise de l'image au niveau du champ microscopique a été assurée à l'aide de l'appareil photo du portable.

4. Analyse statistique des résultats :

Les résultats obtenus sont exprimés par l'utilisation du logiciel MINITAB 17. L'analyse des données a été effectuée par application du test-t de Student, qui est basé sur la comparaison des moyennes deux à deux, et l'analyse de la variance (ANOVA à deux critères

de classification). Afin de tester les différences entre sites, sexes et interaction «site-sexe». Les différences sont considérées comme, pour un niveau de signification ($P < 0,05$).

Résultats

Et

Discussion

V. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats

1.1 Les biomarqueurs du stress oxydatif

1.1.1 Le malondialdéhyde (MDA)

▪ Le corps de *D. trunculus*:

Les résultats illustrés dans la **figure 19** concernant les concentrations du malondialdéhyde en (nmol/g tissu) au niveau du corps des individus mâles et femelles chez l'espèce *D. trunculus* ont montré généralement des augmentations des taux de MDA, ainsi que des variations significatives entre sites et sexes. Egalement, l'étude statistique avec le test-t de Student a enregistré des différences très hautement significatives ($P < 0,001$) entre le site 1 (El-Bettah) considéré comme témoin et le site 2 (Sidi Salem) et entre le site 1 et le site 3 (Boukhemira) chez les deux sexes. De plus, des différences hautement significatives ($P < 0,01$) et significatives ($P < 0,05$) entre les sites 2 et 3 chez les mâles et les femelles respectivement. Outre, l'analyse statistique ANOVA à deux critères de classifications a signalé un effet site très hautement significatif ($P < 0,01$) et un effet sexes hautement significatif ($P < 0,01$).

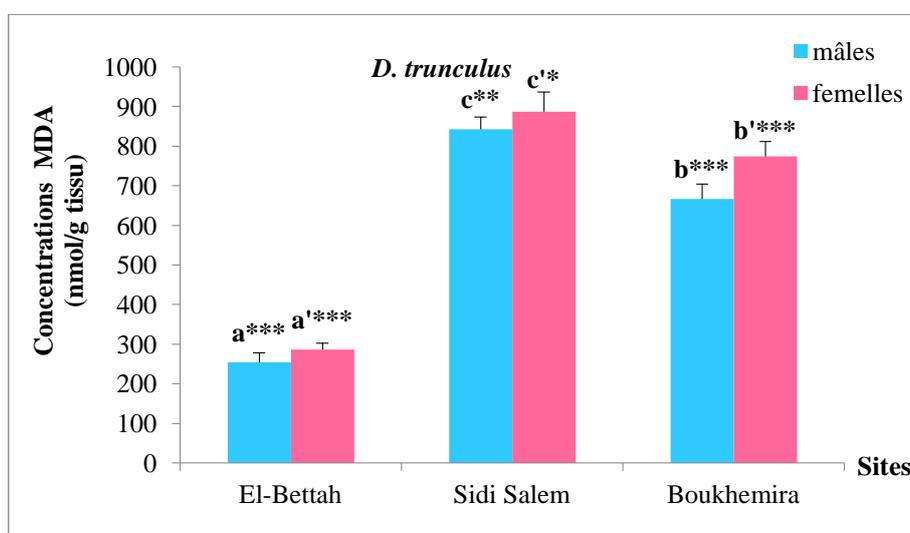


Figure 19 : Les concentrations moyennes de MDA corporel en (nmol/g tissu) chez les deux sexes de *D. trunculus*.

a : site1×site2 ; b : site1×site3 ; c : site2×site3 ; Pour les males

a' : site1×site2 ; b' : site1×site3 ; c' : site2×site3 ; Pour les femelles

* (P< 0,05): Différence significative comparant au témoin.

** (P< 0,01): Différence hautement significative comparant au témoin.

*** (P< 0,001): Différence très hautement significative comparant au témoin.

▪ **Les gonades de *D. trunculus*:**

Les concentrations de MDA ont montré des augmentations légères au niveau des gonades, d'où on a enregistré peu de différences significatives. L'étude statistique avec le test-t de Student a enregistré une différence significative entre les sites 1 et 2 ainsi qu'entre les sites 1 et 3 chez les femelles (**Fig. 20**). Cependant, l'analyse statistique ANOVA à deux critères de classification n'a signalé qu'un effet site significatif (P < 0,05).

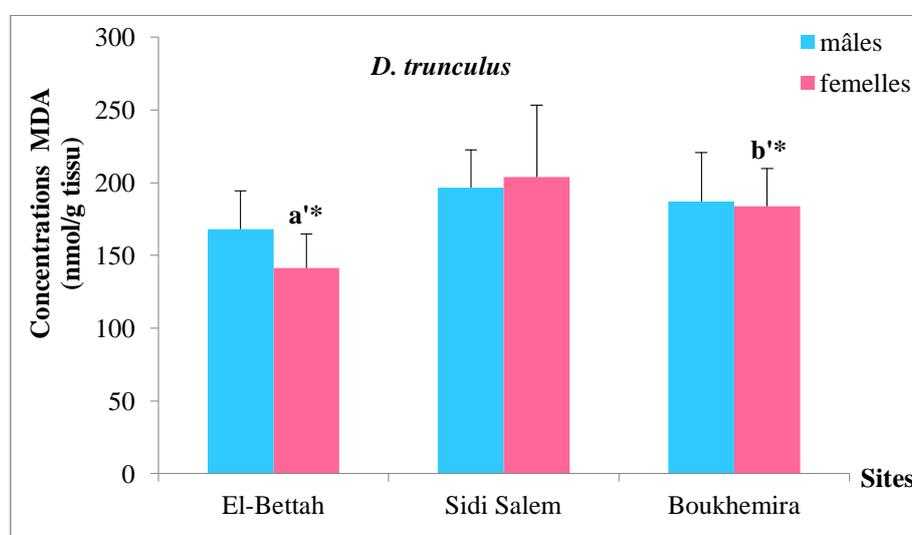


Figure 20: Les concentrations moyennes de MDA gonadique (nmol/g tissu) chez les deux sexes de *D. trunculus*.

a' : site1×site2 ; b' : site1×site3 ; Pour les femelles

* (P< 0,05) : Différence significative comparant au témoin.

▪ **L'hépatopancréas de *D. trunculus*:**

Les résultats montrés dans la **figure 21** sont relatifs aux variations des concentrations du MDA en (nmol/g tissu) au niveau de l'hépatopancréas chez le l'espèce *D. trunculus*. Les

faibles concentrations ont été enregistrées dans le site témoin, alors que les plus élevées ont été enregistrées sur les sites 3 et 2 chez les deux sexes. Cependant, l'étude statistique du test-t de Student a révélé des différences très hautement significatives ($P < 0,001$) entre le site témoin et le site 2 et entre les sites 1 et site 3 pour les femelles et les mâles respectivement. Outre, des différences hautement significatives ($P < 0,01$) entre les sites 1 et 3 chez les individus femelles et des différences significatives ($P < 0,05$) entre les sites 1 et 3 chez les mâles. D'autre part, l'analyse statistique ANOVA à deux critères de classification a signalé un effet site très hautement significatif ($P < 0,001$).

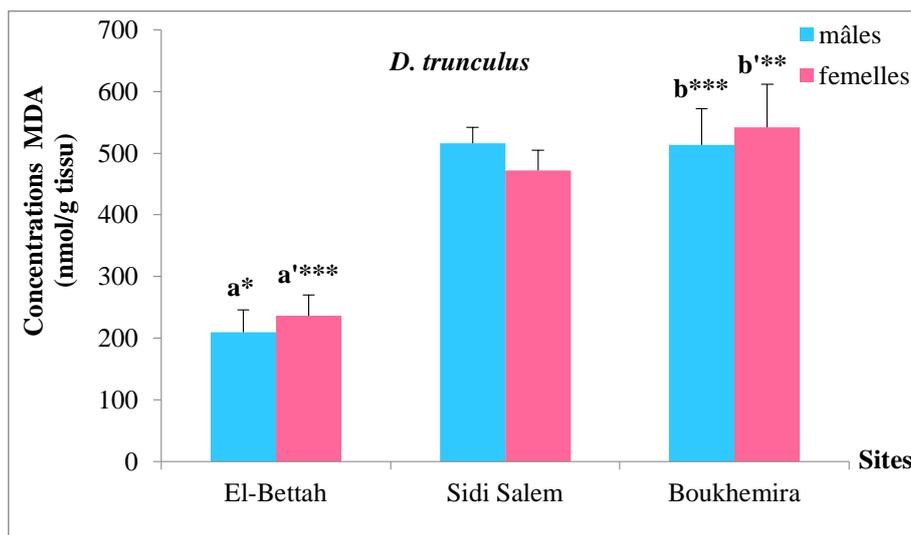


Figure 21 : Les concentrations moyennes de MDA hépatoponcréatique en (nmol/g tissu) chez les deux sexes de *D. trunculus*.

a : site1×site2 ; b : site1×site3 ; Pour les males

a' : site1×site2 ; b' : site1×site3 ; Pour les femelles

* ($P < 0,05$) : Différence significative comparant au témoin.

** ($P < 0,01$) : Différence hautement significative comparant au témoin.

*** ($P < 0,001$) : Différence très hautement significative comparant au témoin.

▪ **Le corps de *M. galloprovincialis*:**

Les concentrations moyennes corporelles du malondialdéhyde en (nmol/g tissu) chez l'espèce *M. galloprovincialis* ont été enregistrées sur la **figure 22** Concernant, l'analyse avec le test-t de Student une augmentation hautement significative ($P < 0,01$) a été signalée entre les sites 1 et 2 et une différence significative ($P < 0,05$) entre le site 2 et 3 chez les individus

mâles. Par ailleurs, l'analyse statistique ANOVA à deux critères de classification n'a montré aucun effet significatif.

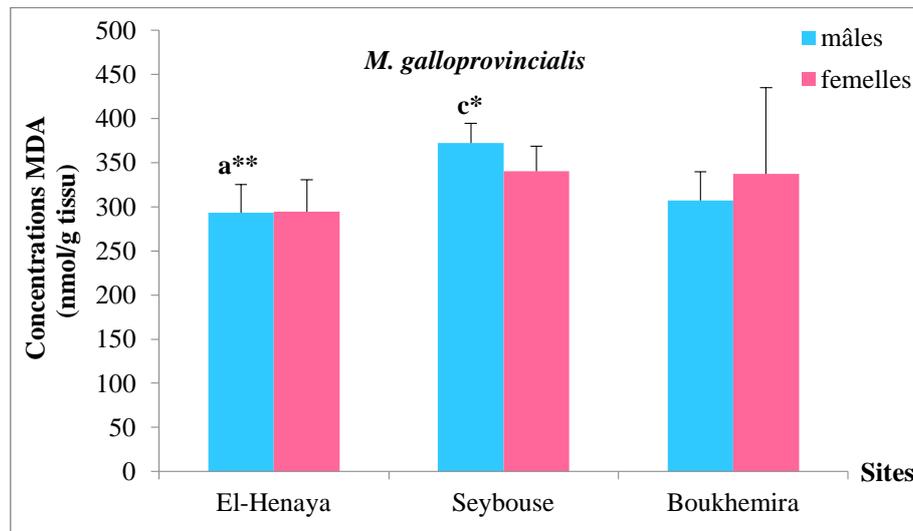


Figure 22: Les concentrations moyennes de MDA corporel en (nmol/g tissu) chez les deux sexes de *M. galloprovincialis*.

a : site1×site2 ; c : site2×site3 ; Pour les males

* (P< 0,05): Différence significative comparant au témoin.

** (P< 0,01): Différence hautement significative comparant au témoin.

▪ **Les gonades de *M. galloprovincialis*:**

En ce qui concerne les variations des concentrations moyennes de MDA en (nmol/g tissu) au niveau du tissu gonadique chez la moule *M. galloprovincialis*, une augmentation du taux de l'MDA a été révélée entre le site témoin et les deux sites 2 et 3. Également, une variation significative (P < 0,05) a été obtenue entre le site 1 et 2 chez les deux sexes et entre le site 1 et 3 chez les femelles (**Fig. 23**). Par contre, aucun effet significatif n'a été signalé avec l'analyse statistique ANOVA.

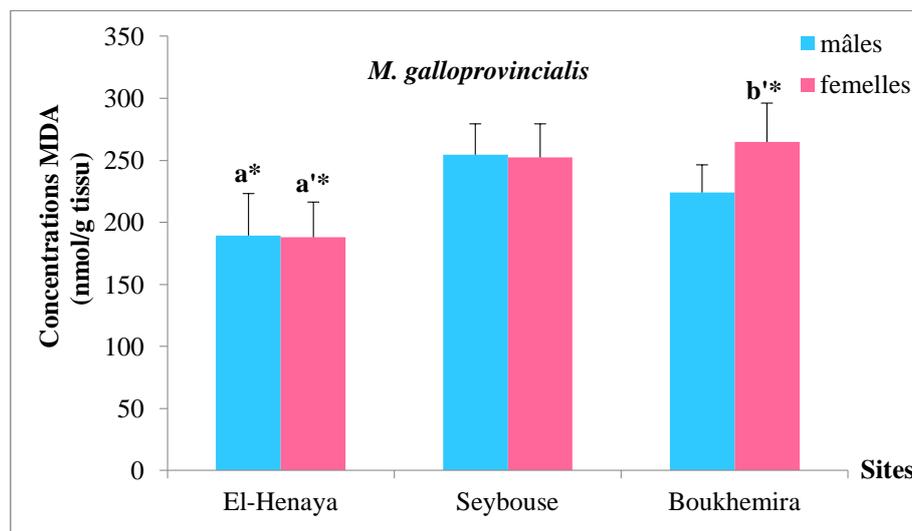


Figure 23: Les concentrations moyennes de MDA gonadique en (nmol/g tissu)
Chez les deux sexes de *M. galloprovincialis*

a : site1×site2 ; Pour les males

a' : site1×site2 ; b' : site1×site3 ; Pour les femelles

* (P< 0,05): Différence significative comparant au témoin.

▪ **L'hépatopancréas de *M. galloprovincialis*:**

Les résultats obtenus et illustrer sur la **figure 24** montrent les fluctuations des concentrations moyennes du malondialdéhyde en (nmol/gtissu) au niveau de l'hépatopancréas des individus de l'espèce *M. galloprovincialis*. D'où l'augmentation a été observée au niveau du site 2 de Seybouse suivi par le site 3 de Boukhemira par apport au site témoin d'El-Henaya. Cependant, l'étude statistique avec le test-t de Student a enregistré des différences très hautement significatives (P < 0,001) entre le site 1 et 2 chez les mâles et entre les sites 2 et 3 chez les femelles. Ainsi que, des différences hautement significatives (P < 0,01) entre le site 1 et 2 chez les femelles. De plus, le test-t de Student a signalé une différence significative (P < 0,05) entre le site 1 et 3 chez les deux sexes. Outre, l'analyse statistique ANOVA à deux critères de classification a signalé un effet site très hautement significatif (P < 0,001) et un effet interactions hautement significatif (P < 0,01).

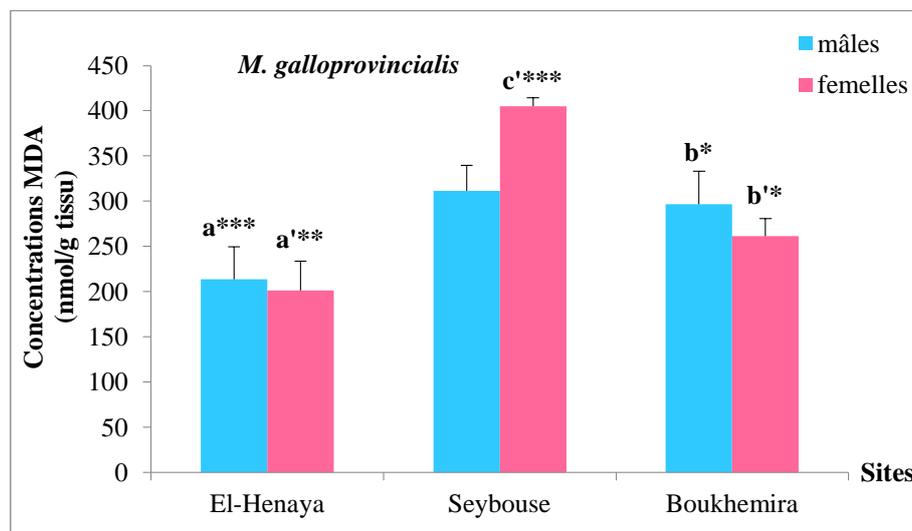


Figure 24: Les concentrations moyennes de MDA hépatoponcréatique en (nmol/g tissu) chez les deux sexes de *M. galloprovincialis*

a : site1×site2 ; b : site1×site3 ; Pour les males

a' : site1×site2 ; b' : site1×site3 ; c' : site2×site3 ; Pour les femelles

* (P< 0,05) : Différence significative comparant au témoin.

** (P< 0,01) : Différence hautement significative comparant au témoin.

*** (P< 0,001) : Différence très hautement significative comparant au témoin.

1 1.2 Le glutathion réduit (GSH)

▪ Le corps de *D. trunculus*:

Les résultats présentés dans la **figure 25** montrent les variations des taux de GSH en (nmol/g tissu) au niveau du corps des individus de l'espèce *D. trunculus*. L'analyse statistique avec le test-t a signalé des diminutions hautement significatives entre le site 1 d'El Bettah et site 2 de Sidi Salem et entre le site 2 et le site 3 de Boukhemira chez les deux sexes. Ajoutant, une diminution significative (P< 0,05) entre les sites 1 et 3 chez les mâles et les femelles. Pour l'analyse statistique ANOVA, on a signalé un effet site très hautement significatif (P< 0,001).

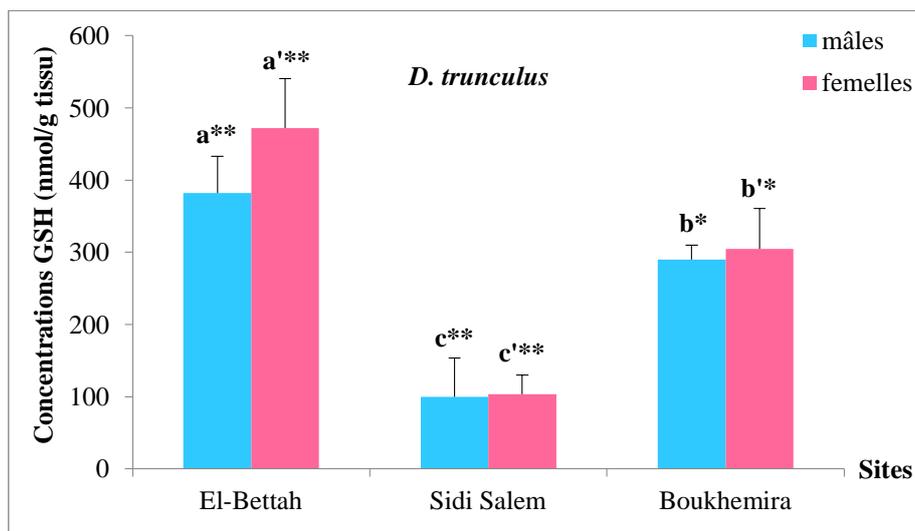


Figure 25 : Les concentrations moyennes de GSH corporel en (nmol/g tissu) chez les deux sexes de *D. trunculus*.

a : site1×site2 ; b : site1×site3 ; c : site2×site3 ; Pour les mâles

a' : site1×site2 ; b' : site1×site3 ; c' : site2×site3 ; Pour les femelles

* (P< 0,05) : Différence significative comparant au témoin.

** (P< 0,01) : Différence hautement significative comparant au témoin.

▪ **Les gonades de *D. trunculus*:**

Les concentrations de GSH gonadique en (nmol/g tissu) ont montré une diminution significative chez les deux sexes de l'espèce *D. trunculus*. Egalement, les analyses avec le test-t de Student ont signalé une différence significative de (P < 0,05) entre le site témoin et le site 2 et entre site témoin et le site 3 chez les mâles et les femelles respectivement (**Fig.26**). Bien que, l'analyse statistique ANOVA a signalé un effet sites très hautement significatif (P < 0,001).

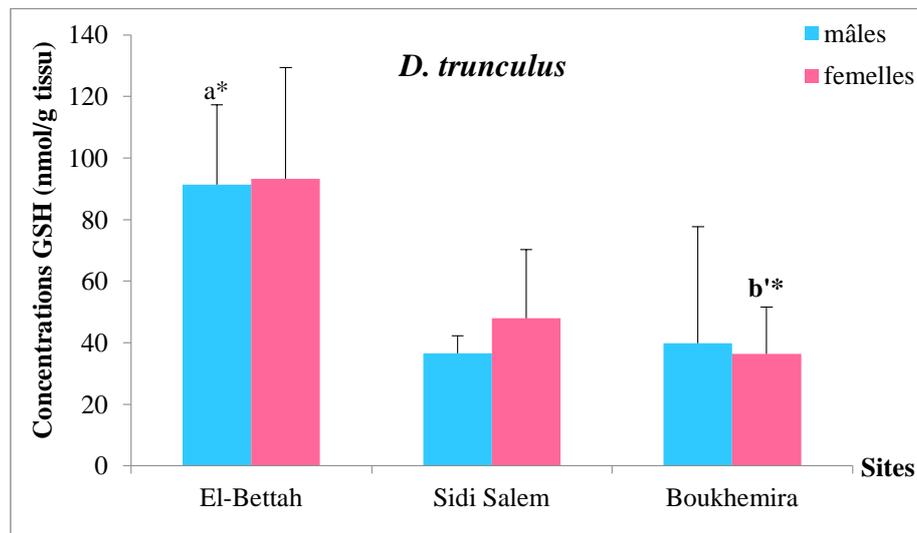


Figure 26: Les concentrations moyennes de GSH gonadique en (nmol/g tissu) chez les deux sexes de *D. trunculus*.

a : site1×site2 ; Pour les males

b' : site1×site3 ; Pour les femelles

* (P< 0,05) : Différence significative comparant au témoin.

▪ **L'hépatopancréas de *D. trunculus*:**

La comparaison deux à deux avec le test-t de Student à révélée peu de différence significatives et des niveaux bas de GSH en (nmol/g tissu) pour l'hépatopancréas de l'espèce. Egalement, une variation hautement significative (P<0,001) entre site1 et 2 chez femelles (**Fig.27**). D'autre part, l'analyse statistique ANOVA a signalé un effet sites hautement significatif (P<0,01).

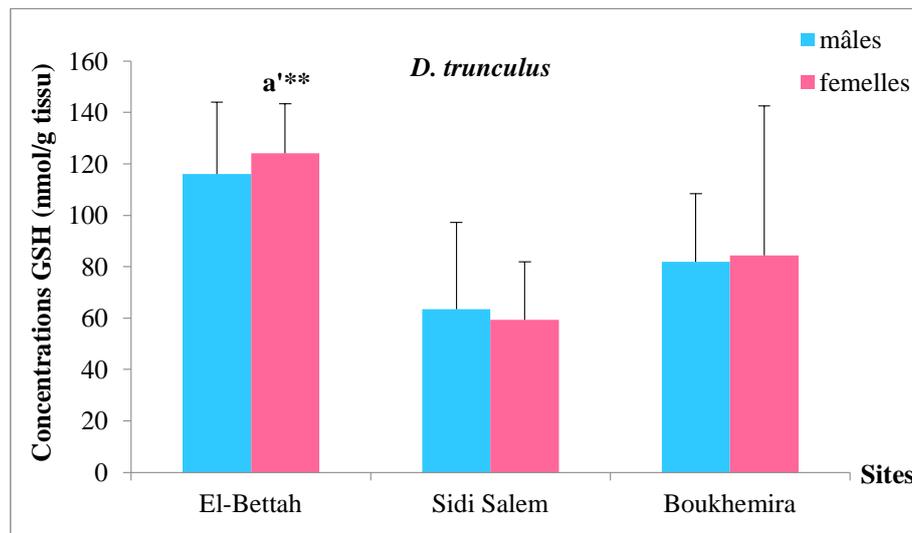


Figure 27: Les concentrations moyennes de GSH hépatoponcréatique en (nmol/g tissu)chez les deux sexes de *D. trunculus*.

a' : site1×site2 Pour les femelles

* (P< 0,05) : Différence significative comparant au témoin.

▪ **Le corps de *M. galloprovincialis*:**

Les résultats illustrés sur la **figure 28** concernant les concentrations du glutathion réduit en (nmol/g tissu) au niveau du corps des individus mâles et femelles de l'espèce *M. galloprovincialis* ont montré une diminution des taux de GSH pour le site 3 suivi par le site 2. Outre, l'étude statistique avec le test-t de Student a démontré des différences très hautement significatives (P< 0,001) entre le site témoin et le site 2 et entre site 1 et 3 chez les mâles et chez femelles respectivement. Bien que, des différences significatives (P< 0,05) entre le site témoin et le site 2 pour les femelles. Également, l'analyse statistique ANOVA a signalé un effet sexes significatif (P < 0,05) et un effet sites très hautement significatif (P < 0,001).

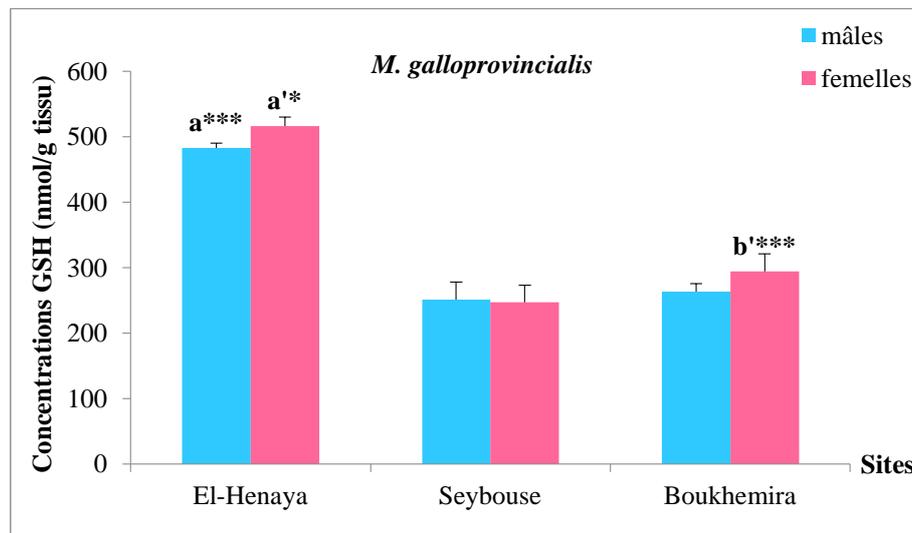


Figure 28: Les concentrations moyennes de GSH corporel en (nmol/g tissu) chez les deux sexes de *M. galloprovincialis*.

a : site1×site2 ; Pour les mâles

a' : site1×site2 ; b' : site1×site3 ; Pour les femelles

* (P< 0,05) : Différence significative comparant au témoin.

*** (P<0,001) : Différence très hautement significative comparant au témoin.

▪ **Les gonades de *M. galloprovincialis*:**

Les concentrations de GSH en (nmol/g tissu) ont montré une diminution légère au niveau du tissu gonadique, d'où on a enregistré peu de différences significatives. De plus, l'étude statistique avec le test-t de Student a révélé des différences significatives (P< 0,05) et hautement significative (P< 0,01) entre le site témoin et site 3 pour les femelles et les mâles respectivement (**Fig.29**) Toutefois, l'analyse statistique ANOVA a signalé un effet sites très hautement significatif (P< 0,001).

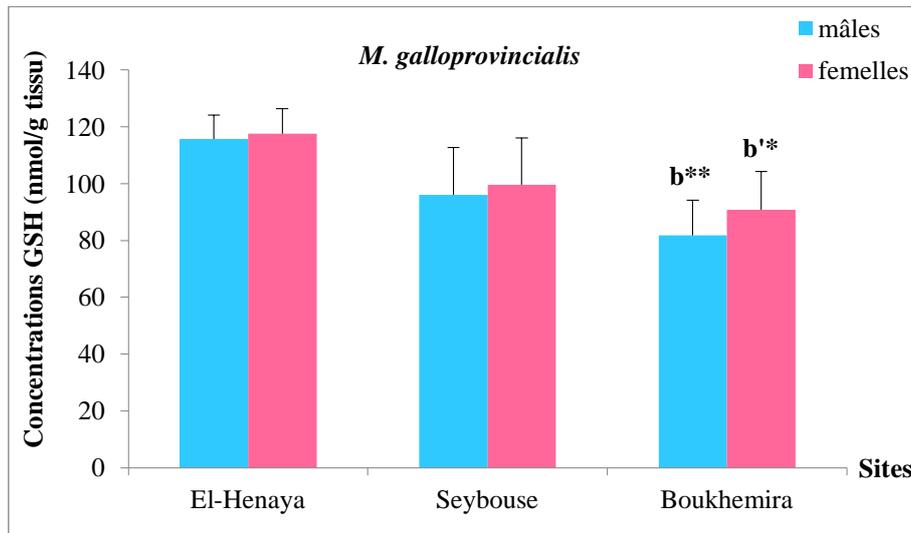


Figure 29 : Les concentrations moyennes de GSH gonadique en (nmol/g tissu) chez les deux sexes de *M. galloprovincialis*.

b : site1×site3 ; Pour les males

b' : site1×site3 ; Pour les femelles

* (P< 0,05) : Différence significative comparant au témoin.

** (P< 0,01) : Différence hautement significative comparant au témoin.

▪ **L'hépatopancréas de *M. galloprovincialis*:**

Les résultats du taux du GSH réduit en (nmol/g tissu) concernant l'organe hépatopancréas chez la moule *M. galloprovincialis* ont signalé une seule variation significative (P<0,05) entre site 2 et site 3 chez les mâles (**Fig.30**). D'autre part, l'analyse statistique ANOVA à deux critères de classification a enregistré un effet sites hautement significatif (P< 0,01).

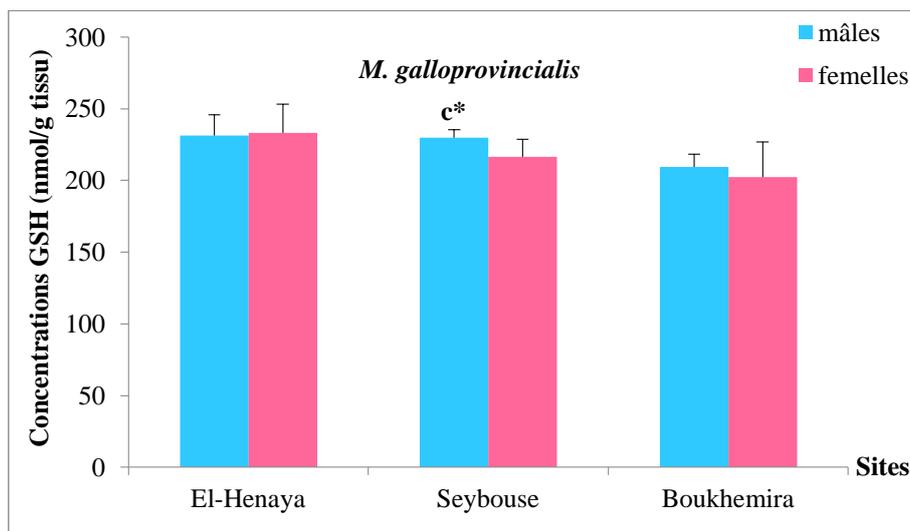


Figure 30 : Les concentrations moyennes de GSH hépatoponcréatique en (nmol/g tissu) chez les deux sexes de *M. galloprovincialis*.

c : site2×site3 ; Pour les males

* (P< 0,05) : Différence significative comparant au témoin.

1.1.3 L'histologie des gonades

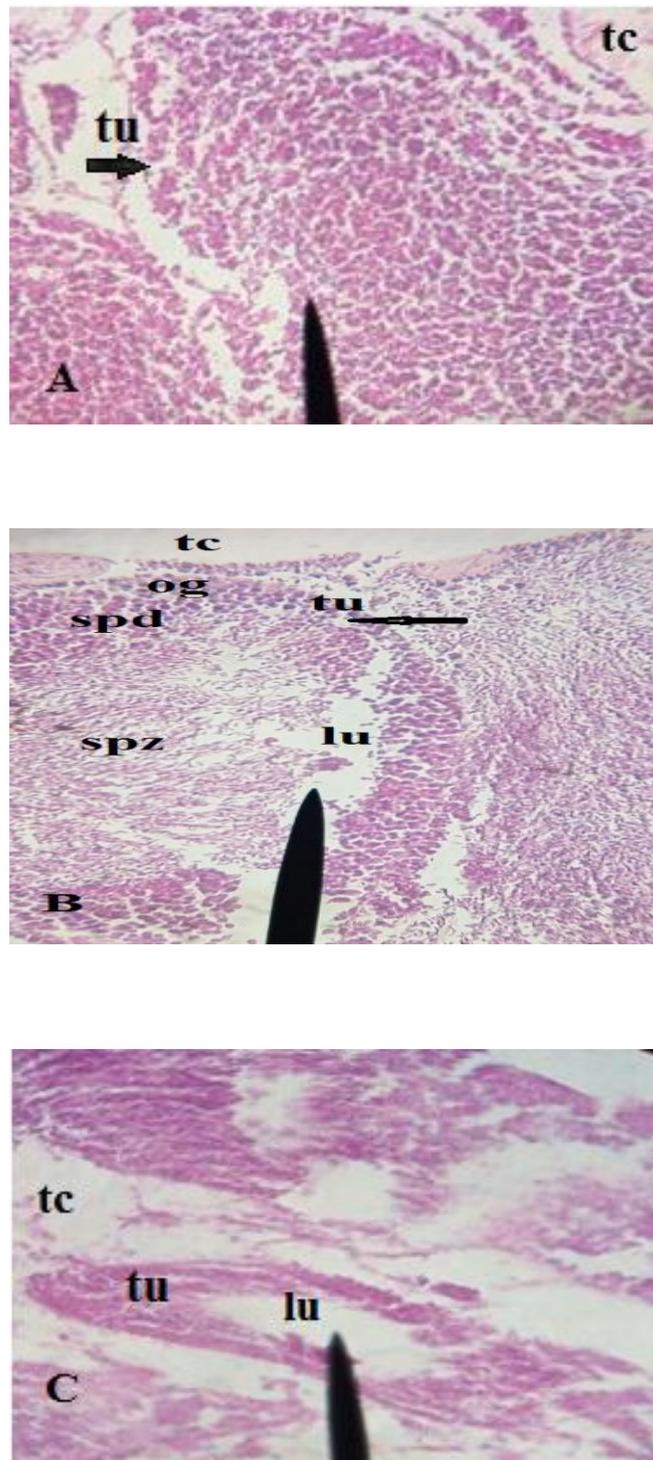
Une section histologique des gonades des groupes mâles témoins de l'espèce *D. trunculus* et *M. galloprovincialis* est illustrée dans la **figure (31A, 33A)**. Ces coupes montrent que la gonade est constituée d'un ensemble de tubules (ou ampoules) juxtaposés de différentes formes et tailles, au sein desquels vont évoluer les cellules germinales lors de la spermatogénèse. Les tubules sont séparés par un espace inter-tubulaire, maintenus cohérents par le tissu inter-tubulaire connectif. Une lumière intra-tubulaire bordée par un épithélium simple associant à l'intérieur plusieurs types cellulaires germinales polymorphes selon le stade du cycle sexuel (spermatogonies, spermatides et spermatozoïdes). Il est clairement apparu que la gonade mâle est en stade de maturation.

L'examen histologique des coupes du site 3 chez l'espèce mâle de *D. trunculus* et de *M. galloprovincialis* ont montrées des changements plus importants par rapport aux coupes du site 2. L'observation microscopique a mis en évidence des altérations importantes: des tubules qui

sont sévèrement endommagés. Bien qu'un rétrécissement des tubules exprimé par une dégénérescence très avancée des cellules, accompagné par un élargissement de la lumière tubulaire. Ainsi, un tissu inter-tubulaire plus important et plus élargit est figuré (**Fig. 30B, 33B**).

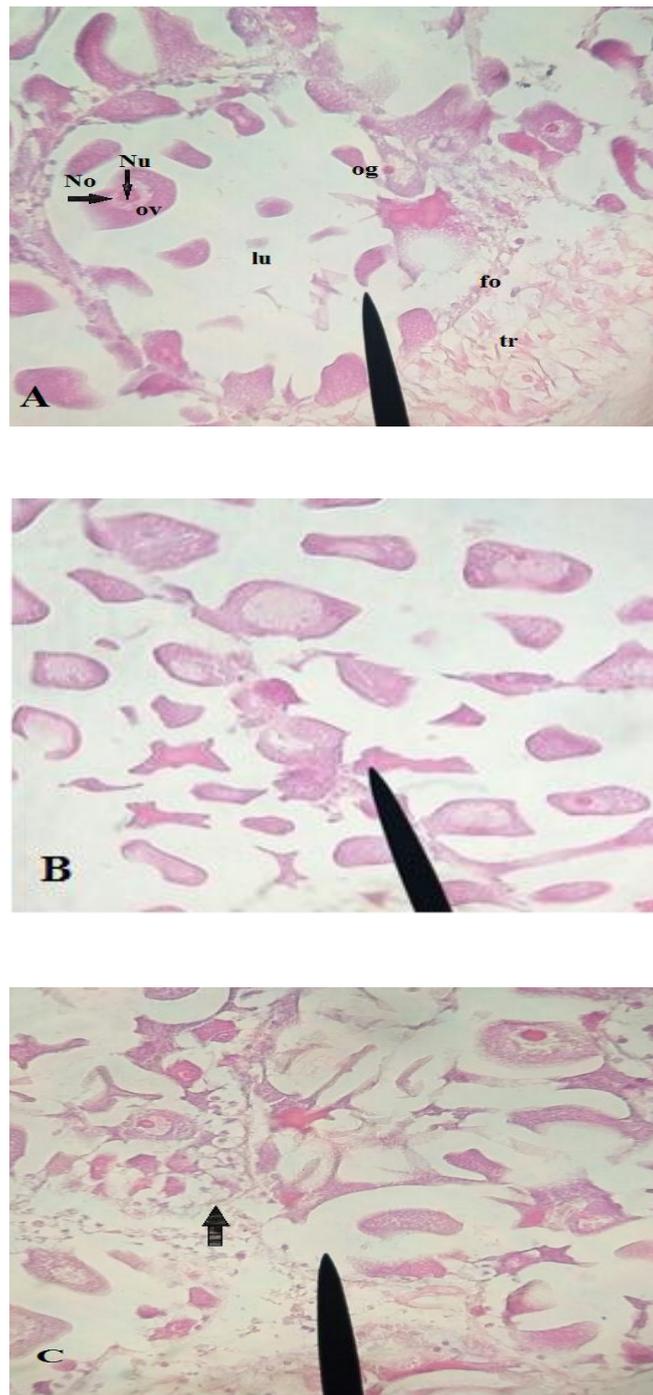
Concernant le tissu gonadique femelle témoin, les sections histologiques ont montrées chez les deux espèces que le tissu est formé d'un ensemble de follicules ovariennes (ampoules) à aspect différent. Chacune renferme un petit nombre d'ovocytes allongés, dont elles sont fixées à l'épithélium de la glande par leur pôle le plus étroit. Leur noyau est sphérique et possède un gros nucléole. Ces ovocytes, à maturité, sont assez éloignés les uns des autres sur la paroi folliculaire. D'où, on trouve plaquées contre celle-ci, des gonies (ovogonies). On les distingue par leur gros noyau dont la chromatine est fine, et par la présence d'un nucléole caractéristique.

D'après les observations des coupes histologiques du site 2 et 3 chez les deux espèces étudiées des détériorations sévères du tissu gonadique femelle ont été exprimées par: une destruction de l'épithélium ovarien, conduit à un éclatement des follicules ovariennes et une perte sévère des cellules. Ainsi qu'un rétrécissement a été marqué au niveau des coupes (**Fig.51B et C, 53B et C**).



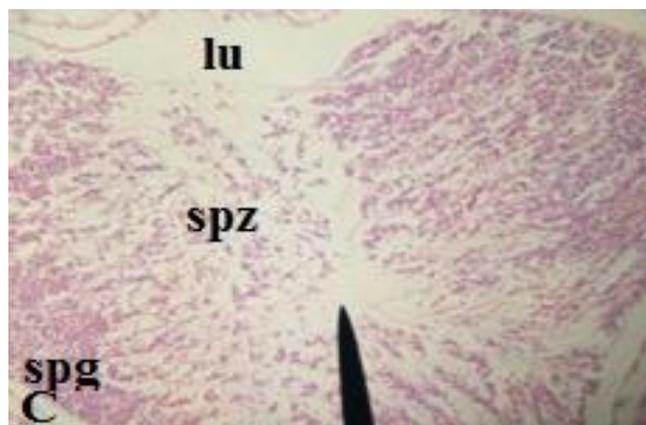
Es : Espace inter tubulaire ; **tc**: tissu conjonctif ; **tu**: tubule ; **lu**: Lumière tubulaire ; **Spg**: Spermatogonies ; **Spd**: seprmatides ; **Spz**: Spermatozoïdes

Figure 31 : Observation au microscope optique des coupes transversales d'une partie de la gonade mâle de l'espèce *D. trunculus* prélevée du site d'El-Bettah (A), Sidi Salem (B), Boukhemira (C) (gr×400 colorées par l'hématoxyline et l'éosine).



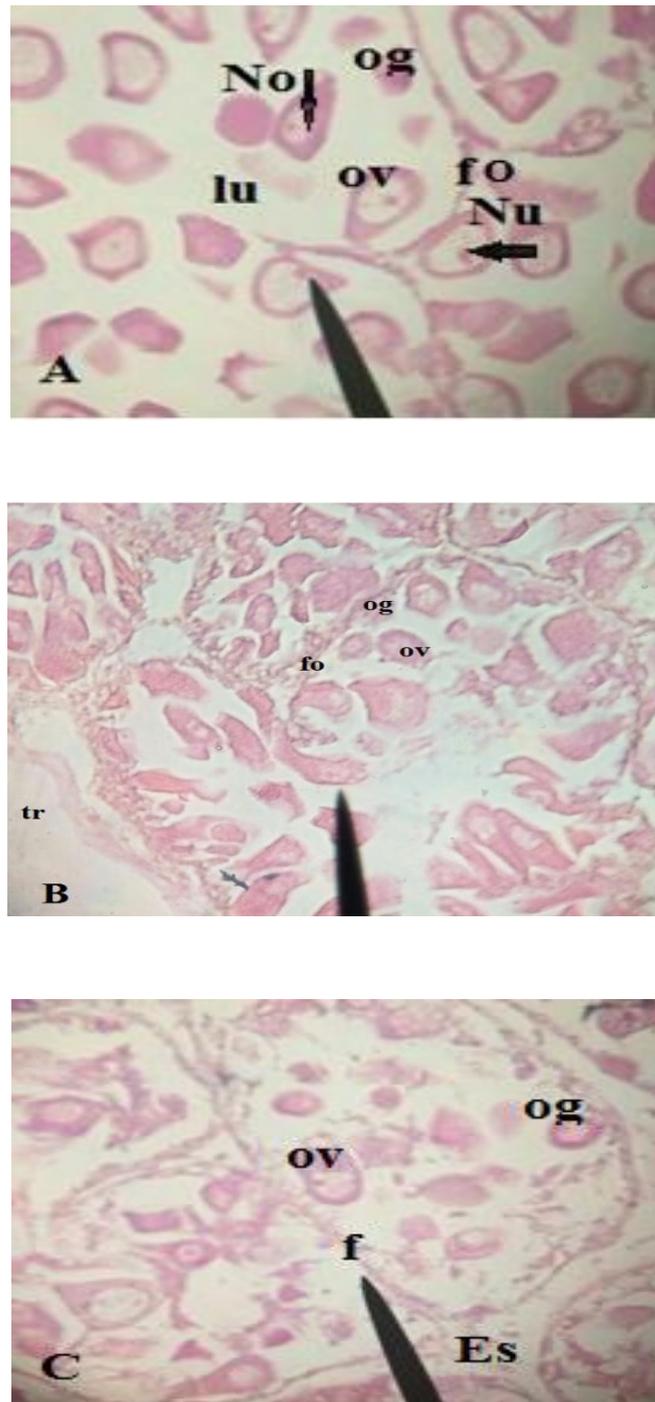
No: noyau ; **Nu:** nucléole ; **tr:** tissu de réserve ; **fo:** follicule ovarienne ; **og:** ovogonie ; **ov:** ovocyte.

Figure 32 : Observation au microscope optique des coupes transversales d'une partie de la gonade femelle de l'espèce *D. trunculus* prélevée du site d'El-Bettah (A), Sidi Salem (B), Boukhemira (C) (gr×400 colorées par l'hématoxyline et l'éosine).



Es : Espace inter tubulaire ; **tc**: tissu conjonctif ; **tu**: tubule ; **lu**: Lumière tubulaire ; **Spg**: Spermatogonies ; **Spt**: seprmatocyte ; **Spz**: Spermatozoïde

Figure 33 : Observation au microscope optique de coupe transversales d'une partie de la gonade mâle de l'espèce *M. galloprovincialis* prélevée du site d'El-Henaya (A), Seybouse (B), Boukhemira (C) (gr×400 colorées par l'hématoxyline et l'éosine).



No: noyau ; Nu: nucléole ; tc: tissu conjonctif ; f: follicule, og: ovogonie ; ov : ovocyt.

Figure 34 : Observation au microscope optique de coupes transversales d'une partie de la gonade femelle de l'espèce *M. galloprovincialis* prélevée du site d'El-Henaya (A), Seybouse (B), Boukhemira (C) (gr×400 colorées par l'hématoxyline et l'éosine).

2. Discussion

Le golfe d'Annaba reçoit de grandes quantités de contaminants provenant d'activités urbaines, agricoles, portuaires et industrielles (**Abdenmour et al., 2000**).

Ces polluants environnementaux provoquent fréquemment la formation d'espèces réactives de l'oxygène.

Du point de vue écotoxicologique, les mollusques bivalves de par leur mode de vie jouent un rôle important dans la bioaccumulation des polluants car ils ont l'avantage d'être en contact direct avec l'eau, le sédiment et la nourriture contaminée (**Gunther et al., 1999 ; Miller et al., 2000**).

Pour évaluer les effets de divers polluants sur les écosystèmes aquatiques plusieurs biomarqueurs sont utilisés, parmi eux le malondialdihyde MDA (**Hernández-Moreno et al., 2010 .; Wu et al., 2011**).

Les résultats obtenus ont indiqué des augmentations significatives de la peroxydation lipidique au niveau des corps des individus de l'espèce *D. trunculus*. Cette peroxydation est exprimée par le taux élevé de l'MDA.

Il est clairement observé des niveaux élevés de MDA surtout chez les femelles. Cette augmentation a été marquée sur le site 2 suivi par le site 3. Bien qu'elle est liée à une exposition à un milieu pollué ce de Sidi Salem qui est exposé à différents types de polluants englobant des déchets industriels fertilisantes provenant du complexe FERTIAL et des déchets domestiques véhiculés par l'oued Seybouse (**Abdenmour et al., 2010 ; Beldi et al., 2006**).

Concernant, le site Boukhemira est considéré comme un site pollué, parce qu'il est soumis aux influences des décharges de l'oued Boukhemira. Par contre, le site d'El-Bettah est soumis à un régime hydrodynamique, contribue à l'élimination de ces polluants. A cette raison qu'il est choisi comme site référence. Ce résultat a été confirmé par plusieurs études (**Drif., 2012**).

Cependant, les résultats de la peroxydation lipidique chez l'espèce *M. galloprovincialis*, ont connus des augmentations au niveau du corps chez les individus des deux sexes. Alors que, les concentrations les plus élevées sont enregistrées sur le site de Seybouse. Du fait que, le

site est fortement pollué parce qu'il reçoit des effluents industriels, municipale et agricoles par le biais de l'embouchure de l'oued Seybouse ont les comparant avec ceux d'El-Henaya qui est considéré comme un site non pollué, dû à son éloignement de toutes sortes de pollution.

D'ailleurs, plusieurs études sont réalisées sur la même espèce, montrent une corrélation positive entre la taille et la concentration de l'MDA.

Le cycle sexuel de *D. trunculus* dans la baie d'Annaba présente une période d'activité sexuelle qui débute fin de février (**Mouëza and Fenkiel-Renault., 1973**), sa nous a permis de distinguer nettement les gonades. Dont, les résultats montrent des concentrations élevés de l'MDA des gonades de l'espèce *D. trunculus* aux niveaux des sites 2 et 3 par rapport aux sites témoins.

Des taux élevés aussi de MDA sont indiqués au niveau des gonades chez l'espèce *M. galloprovincialis* sur les sites 2 et 3 par rapport de sites témoins. Bien que, l'augmentation était plus importante chez les femelles du site 3 suivi par le site 2.

Egalement, les variations des concentrations de MDA trouvées sont élevées au début du printemps par rapport aux autres saisons (**Drif., 2012**) et surtout chez les femelles. Plusieurs études ont signalées une augmentation des concentrations de MDA des gonades dans des régions polluées (**Soltani et al., 2012**).

Probablement cette augmentation aussi pourrait être la conséquence d'une combinaison de facteurs directement corrélés au poids (cycles sexuels, abondance de nourriture, température). Outre, elle peut être due à la diminution des antioxydants (**Ramesh and Pugalendi., 2006**) tels que, l'acide ascorbique et le tocophérol qui jouent un rôle coopératif très importants pour l'inhibition de l'oxydation des lipides et la formation de ses produits dangereux au niveau cellulaire (**Vertuani et al., 2004**).

Egalement, l'hépathopancréas est connue pour être l'organe majeur dans la détoxification des métaux (**Marigomez et al., 2002 .; Moore and Allen., 2002**). En ce qui concerne la spécificité du tissu dans le phénomène d'accumulation (**Irato et al., 2003**).

Chez le *D. trunculus* des variations très hautement significatives de l'MDA de l'hépatopancréas sont observées au niveau du site de Boukhemira chez les deux sexes, en les comparants aux deux témoins d'El-Bettah. Sauf, une augmentation a été marquée chez les mâles par rapport aux femelles de Sidi Salem.

Les résultats obtenus chez la moule *Mytilus galloprovincialis* montre une variation de concentrations pour les trois sites. La concentration de l'MDA et plus augmenter dans le site de Seybouse comparée avec le site d'El-Henaya, chez les individus femelles par apport aux mâles. Du fait que, se site véhicule des rejets de toutes sortes (urbains, industriels, ...etc.) qui sont trouvés excessivement dans la région (**Kremiling., 1988**). Cependant une augmentation moindre signalée dans le site de Boukhmira.

L'organisme possède des potentiels mécanismes de défense cellulaire non enzymatique contre ce stress oxydatif, parmi eux le glutathion réduit (GSH). Ce tripeptide (L - γ -glutamyl-L-Cysteinyl glycine) joue un rôle crucial dans les processus de défense antioxydant (**Arrigo., 1999**), c'est le composé thiol intracellulaire majeur. Il assure la protection des structures cellulaires et tissulaires (**Yo et al., 1993 ; Michelet et al., 1995**).

Il existe en équilibre entre deux formes, l'une réduite (GSH), et autre oxydée (GSSG). Le rapport GSH/GSSG est hautement régulé par le système glutathion réductase. Cependant si le niveau de stress excède la capacité de la cellule de réduire le GSSG, le GSSG peut s'accumuler (**Griffith and Mulcahy., 1999**).

De plus, le glutathion réduit est un cofacteur de plusieurs enzymes, qui catalysent la détoxification et l'excrétion de divers composés toxiques. Il agit en tant que donneur d'électrons et permet ainsi la désactivation des ROS (**Deneke and Fanburg., 1989 ; Winterbourn and Munday., 1990 .; De Leve and Kaplowitz., 1991**).

Cependant, les résultats obtenus chez *D. trunculus* montrent que le taux de GSH du corps est diminué considérable sur le site de Sidi Salem, comparant au témoin. De plus, des observations presque semblables ont été signalées chez les individus de *M. galloprovincialis*. Cette diminution est marquée successivement sur le site Seybouse suivi par le site de Boukhmira par apport au témoin. Bien que, la diminution est marquée chez les mâles pour les deux espèces. Egalement, elle peut être liée à sa consommation par les peroxydes générés par les contaminants.

D'après, les concentrations de GSH des gonades chez l'espèce *D. trunculus* les résultats ont montré des diminutions au niveau des sites 2 et 3. D'où, les femelles ont enregistré les plus fortes concentrations. En ce qui concerne les concentrations de GSH des gonades chez *M. galloprovincialis* ont montré des diminutions pareilles au niveau des gonades. Bien que, cette diminution est plus importante chez les mâles.

En revanche sur les résultats du GSH de l'hépatopancréas chez *D. trunculus*, une baisse des taux a été signalée sur les sites 3 et 2. Par contre, la diminution du GSH a été observée sur les sites 2 et 3 chez *M. galloprovincialis*.

Des auteurs suggèrent que cette diminution du GSH serait due à l'augmentation des activités de l'enzyme phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) au cours de la qu'elle le GSH jouerait le rôle de donneur d'électrons ou supplémentaires un rôle de séquestration du cuivre (**Freed-Man et al., 1989**). D'autres études ont montré une augmentation du taux de GSH (**Ait-Aissa et al., 2003**). Cette augmentation de glutathion correspond à un mécanisme précoce de défense cellulaire et serait suffisant pour prendre en charge les premières atteintes cellulaires, évitant ainsi l'apparition d'un stress oxydant plus important.

Des travaux sur les variations saisonnières chez *M. edulis* et *M. galloprovincialis* en hiver rapportent que les activités des systèmes de détoxification cellulaire, décrivent une diminution du glutathion réduit et du glutathion peroxydases, accompagnée d'une augmentation du taux de malondialdéhyde.

Généralement, les individus femelles apparaissent une sensibilité exprimée par des concentrations croissantes en MDA et contrairement des concentrations décroissantes en GSH. Bien que, cette sensibilité est marquée même chez les individus femelles, a propos de leurs cycles sexuels. Du fait que, la masculination est plus rapide que la fémisation (**(Mouëza and Fenkiel-Renault., 1973)**).

Les variations saisonnières du cycle reproducteur des bivalves et leurs développement gonadique a lieu lorsque la température diminue en fin d'automne. En hiver, la majorité des individus sont matures, et la ponte commence au printemps lorsque la température augmente.

Les bivalves entrent dans une phase de repos sexuel s'étalant d'août à novembre. De ce fait, les coupes histologiques sont réalisées à partir des fragments conservés à un moment récent après la ponte. En conséquent, les coupes témoins d'El-Bettah et d'El-Henaya des deux espèces présentant un aspect morphologique qui reflète exactement ce stade. Egalement, une l'apparition des tubules qui s'écroulent et se dégènèrent. Des amoébocytes attaquent les gamètes non pondus. Souvent, il existe dans le lumen des tubules réduits et des débris cellulaires.

L'examen histologique des coupes des autres sites ont montré au niveau du tissu gonadique des altérations cytologiques très importantes chez les deux espèces. Les coupes des individus mâles ont montrées des tubules déstructurés. Une lumière inter-tubulaire élargie, du fait de l'énorme perte cellulaire. De plus, un tissu de réserve endommagé aperçu. Ces observations sont plus intensives sur le site de Boukhemira.

Outre, l'histologie des coupes des gonades femelles ont marqués des lésions cellulaires au niveau de l'épithélium bordant les follicules. Ainsi, une perte d'ovogonies et une lumière étalée.

Ces résultats concordent avec ceux de **(McElwain and Bullard., 2014)** sur plusieurs espèces bivalves. D'où l'étude s'intéressée au cycle sexuel. Beaucoup de travaux ont étudiés la reproduction de *M. galloprovincialis* et de *D. trunculus* qui ont montré au moins deux périodes importantes d'émission de gamètes, l'une située au début du printemps et l'autre située en automne **(Renzoni., 1963 .; Boucart and Lubet., 1965 .; Bayed., 1990)**.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdennour, C. And Drif, F. (2009). Trace Metals in the Marine Bivalve *Mytilus galloprovincialis* from Annaba Estuaries, Algeria. Global Conference on Global Warming (GCGW-09). Istanbul. Turkey. 56- 9 p.

Abdennour, C.; Smith, B.D.; Boulakoud, M.S.; Samraoui, B. and Rainbow, P.S. (2000). Trace metals in shrimps and sediments from Algerian water. *j. catalog. mar. env.* 3: 9-12 p.

Abdennour, C.; Drif, F.; Boulakoud, M.S. and Ounissi, M. (2010). Trace metals in the mussel *Donax trunculus* of Annaba estuaries, Algeria. *Oceano.* 1(6):15-20 p.

Aït Aïssa, S. ; Palluel, O. and Porcher, J.M. (2003). Biomarqueurs précoces d'écotoxicité. *INERIS, rapport final DRC.* 00-02: 79 p.

Albaret J.J. (1999). Les peuplements des estuaires et des lagunes. In : Lévêque Christian (ed.), Paugy Didier (ed.). Les poissons des eaux continentales Africaines : diversité, écologie, utilisation par l'homme. Paris : IRD :325-349 p.

Almeida, E.A.; Miyamoto, S.; Bairy, A.C.; Medeiros, M.H.G. and Mascio, P.D. (2004). Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Mar. Pollut. Bull.* 49(5-6): 386-392 p.

Andral, B.; Stanisiere, J.Y.; Sauzade, D.; Damier, E.; Thebault, H.; Galgani, F. and Boissery, P. (2004). Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Pollut. Bull.* 49:704-712 p.

Ansell, A.D. and Lagardcre, F. (1980). Observation on the biology of *Donax trunculus* and *Donax vittatus* at ile d'Oleron (French Atlantic Coast). *Mar. Biol.* 57(4): 287-300 p.

Arrigo, A.P. (1999). Gene expression and the thiol redox state. *Free Rad. Biol. Med.* 27: 936-944 p.

B

Banni, M.; Attig, H.; Sforzini, S.; Oliveri, C.; Mignone, F.; Boussetta, H. and Viarengo, A. (2014). Transcriptomic responses to heat stress and nickel in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol.* 148: 104-112 p.

- Baudin, B. (2006).** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *MT Cardio*. 2(1): 43-52 p.
- Bayed, A. (1998).** Variabilité de la croissance de *Donax trunculus* sur le littoral Marocain. *Dynamic des populations marines*. 11-23 p.
- Bayed, A. (1990).** Reproduction de *Donax trunculus* sur la côte Atlantique Marocaine. *Cah. Biol. Mar.* 31: 159-169 p.
- Barbault, J. (2000).** Ecologie générale: structure et fonctionnement de la biosphère. *Edition: Dounod*. 237 p.
- Beaumont, A. and Truchot, j.P. (2004).** Biologie et physiologie animal. *Dunod. Paris*. 493: 84-86 p.
- Beldi, H. ; Gimbert, F.; Maas, S.; Scheifler, R.; Soltani, N.(2006).** Seasonal variation of Cd,Cu,Pb and Zn in the edible mollusk *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba ,Algeria. *Afric. J. Agri. Res.*1(4): 85-90p.
- Bessi, H. and El Alami, M. (2009).** Les bio-essais dans l'évaluation d'impact des polluants sur les écosystèmes dulçaquicoles. *Les Technologies de Laboratoire*. 15: 16-22 p.
- Bonnefont-Rousselot, D.; Thérond, P.; Beaudoux, J.L.; Peynet, J.; Legrand, A. and Delattre, J. (2003).** Aging and oxidative stress. Which potential markers. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 59(4): 453-9 p.
- Bougis, (1976).** Océanographie biologique appliquée, l'exploitation de la vie marine. *Paris (France) Masson*. 17-23 p.
- Bourcart, C. and Lubet, P. (1965).** Cycle sexuel et évolution des réserves chez *Mytilus galloprovincialis* LmK. 5 Mollusque Bivalve). *Rapport de la commission internationale pour l'exploration scientifique de la mer méditerranée*. 18:155-15 p
- Box, A.; Sureda, A.; Galgani, F.; Pons. and A.; Deudero, S. (2007).** Assessment of environmental pollution at balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 146 (4): 531–539 p.
- Brigelius Flohe, R. (1999).** Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology & Medicine*. 27(9-10): 951-965 p.

C

Cadenas, E. and Davies, K.J.A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging 1. *Free Radical Biology & Medicine*. 29 (3-4): 222-230 p.

Cadet, J.; Bellon, S.; Berger, M.; Bourdat, A.G.; Douki, T.; Duarte, V.; Frelon, S.; Gasparutto, D.; Muller, E.; Ravanat, J.L. and Sauvaigo, S. (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol. Chem.* 383 (6): 933-943 p.

Cai, Y.; Aoshima, K.; Katoh, T.; Teranishi, H. and Kasuya, M. (2001). Renal tubular dysfunction in male inhabitants of a cadmium-polluted area in Toyama. *Japanan. eleven-year follow-up study. J. Epidemiol.* 11: 180-189 p.

Chaudhary, A.K.; Reddy, G.R.; Blair, I.A. and Marnett, L.J. (1996). Characterization of an N6-oxopropenyl-2'-deoxyadenosine adduct in malondialdehyde-modified DNA using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis*. 17 (5): 1167- 1170 p.

Chen, L.; Judy, Y.Hu. and Wang, S.Q. (2012). The role of antioxdants in photoprotection: a critical review. *Journal of American Academy of Dermatology*. 67 (5): 1013-1024 p.

D

Degiovanni, C. and Mouëza, M. (1972). Contribution a l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque, Lamellibranche), dans l'Algéroise. *écologie en Baie de Bou-Ismaïl Tethys*. 4 (3): 729-744 p.

Delattre, J.; Beaudoux, J.L. and Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. *Ed.Tec and Doc*.

De Leve, L.D. and Kaplowitz, N. (1991). Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol &Therap*. 52: 287-305 p.

Deneke, S.M. and Fanburg, B.L. (1989). Regulation of cellular glutathione. *Am J. Physiol*. 257: 163-73 p.

Deudero, S.; Box, A.; March, D.; Valencia, J.M. and Grau, A.M. (2007). Organic compounds temporal trends at some invertebrate species from the Balearics, Western Mediterranean. *Chemosphere*. 68 (9): 1650-1659 p.

Dizdaroglu, M. (1992). Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res.* 275(3-6): 331-342 p.

Donnier, B. (2007). Pollution chimique en Méditerranée. C E R B O M (I N S E R M). Nice.

Drif, F. (2012). Distribution of Trace Metals in Bivalves (Mollusks) in the Gulf of Annaba, North-East Algeria. PhD thesis, *University BadjiMokhtar-Annaba*. 127 p.

Duchemin, M. (2007). Validations des outils immunotoxicologiques pour l'étude des effets biologiques des contaminants du milieu marin. *Université de Bretagne occidentale-Brest; Institut National de la Recherche Scientifique*.

F

El Hamidi, F. (2003). Contribution à l'étude de *Donax trunculus* comme espèce sentinelle pour l'évaluation de l'état de santé des plages sableuses de la baie d'Agadir. Thèse Doctorat, Université Ibn Zohr, Faculté des Sciences, Maroc.

Esterbauer, H.; Gebicki, J.; Puhl, H. and Jurgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.* 13(4): 341-390 p.

F

Fakayode, S.O. (2005). Impact assessment of industrial effluent on water quality of the receiving Alaro River in Ibadan. *Nigeria. AJEAM-RAGEE.* 10: 1-13 p.

Favier, A. (1997). Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann. Biol. Clin.* 55(1): 9-16 p.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique.* 11(12):108-115 p.

Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* 64(6): 390-396 p.

Fearon, L.M.; Phillips, G.; Carr, T.; Taylor, M.; Breheny, D. and Faux, S.P. (2011). The role of oxidative stress in smoking-related diseases, *Mini-Reviews in Organic Chemistry.* 8 (4): 360 -371 p.

Farrington, J.W.; Goldberg, E.D.; Risebrough, R.W.; Martin, J.H. and Bowen, V.T. (1983). U.S. mussel watch 1976-1978: an overview of the trace-metal DDE, PCB, hydrocarbon and artificial radionuclide data. *Environ. Sci. Technol.* 17, 490-496 p.

Fischer, W.; Bauchot, M.L. and Schneider, M. (1987). Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. *Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37.vegetaux et invertébrés.* FAO. Of the United Nations. 1: 760 p.

Freed- man, J.H.; Ciriolo, M.R. and Peisach, J. (1989). The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol.Chem.* 264: 5598-5605 p.

Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 893(1): 13- 18 p.

Funes, V.; Alhama, J.; Navas, J.I.; López-Barea, J. and Peinado, J.; (2005). Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environ. Pollut.*139(2): 214-223 p.

G

Galloway, T.S. (2006). Biomarkers in environmental and human health risk assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 53(10-12): 606-613 p.

Ganther, HE. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: Complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis.* 20(9): 1657-1666 p.

Gauroy, P. (1972). Le monde animal au laboratoire. *Manuel de travaux pratiques de sciences naturelles.* Pierron-editeur.217 p.

Gouillou, J. and le Moal, Y. (1980). Aspects de la dynamique des populations de *Donax vittalus* et *Donax trunculus* en baie de Douarnenez. *Ann. Inst. Océanogr., Paris,* 56(1): 55-64 p.

Griffth,O. W. and Mulcahy, T.R. (1999). The Enzymes of Glutathione Synthesis: γ -Glutamylcysteine Synthetase . *Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology.*

H

Halliwell, B. And Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean. *British journal of pharmacology.* 142: 231-255 p.

Halpern, B.S.; Walbridge, S.; Selkoe, K.A.; Kappel, C.V.; Micheli, F.; D'Agrosa, C.; Bruno, J.F.; Casey, K.S.; Ebert, C.; Fox, H.E.; Fujita, R.; Heinemann, D. and Lenihan, (2008). A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. *Science*. 319(5865): 948-952 p.

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*. 11: 298 p.

Hassan, H.M. and Schellhorn, H.E. (1988). Superoxide dismutase: an antioxidant defense enzyme. *Oxydicals in Molecular Biology and Pathology*. 183- 198 p.

Hemdan, N.Y.A.; Emmrich, F.; Sack, U.; Wichmann, G.; Lehmann, J.; Adham, K. and Lehmann, I. (2006). The in vitro immune modulation by cadmium depends on the way of cell activation. *Toxicol*. 222(1-2): 37- 45 p.

Hernández-Moreno, D.; Soler, F.; Míguez, M.P. and Pérez-López, M. (2010). Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin. *Sci. Total Environ*. 408: 4976-4983 p.

J

Irato, P.; Santovito, G.; Cassini, A.; Piccinni, E. and Albergoni, V. (2003). Metal accumulation and binding protein induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequalvis*, and *Tapes philippinarum* from the lagoon of Venice. *Archives of Environ Con and Toxicol*. 44: 476-484 p.

J

Ji, L.L. (2001). Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 928(1): 236-247 p.

Joiris, C.R.; Halsbeek, L. And Otchere, F.A. (2000). Mercury in the bivalves *Crassostrea tulipa* and *Perna perna* from Ghana. *Mar. Pollut. Bull*. 40(5): 457-460 p.

K

Kaiser, J. (2001). Bioindicators and biomarkers of environmental pollutions and risk assessment. *Plymouth: Science Publishers*.

Kim, S.D.; Moon, C.K.; Eun, S.Y. and Ryu, P.D. (2005). Jo SA Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signalling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328(1): 326-334 p.

Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 20(4): 165-177 p.

Koller, E. (2004). Training des pollutions industrielles. *Dunod, Paris, France* .23 p.

Kremling, K. and Hydes, D. (1988). Summer distribution of dissolved Al, Cd, Co, Cu, Mn and Ni in surface waters around the British Isles. *Continental Shelf Research.* 8(1) : 89-105 p

Kumari, M.V.; Hiramatsu, M. and Ebadi, M. (1998). Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms *I and II*. *Free. Radic. Res.* 29(2): 93-101 p.

Kusano, C. and Ferrari, B. (2008). Total Antioxidant Capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of Cell and Molecular Biology.* 7(1): 1-15 p.



Lacoue-labarthe, T. (2007). Thomas. Incorporation des métaux dans les œufs de la seiche commune *Sepia officinalis* et effets potentiels sur les fonctions digestives et immunitaires. *Université de la Rochelle.*

Lagadic, L.; Caquet, T.; Amiard, J.C. and Ramade, F. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie: aspects fondamentaux. *Masson. Paris.* 393-401 p.

Lehucher-Michel, M.P.; Lesgards, J.F.; Delubac, O.; Stocker, P.; Durand, P. and Prost, M. (2001). Oxidative stress and human disease. Current knowledge and perspectives for prevention. *Presse Medical.* 30(21): 1076-1081 p.

Lenaz, G.; Bovina, C.; D'Aurelio, M.; Fato, R.; Formiggini, G.; Genova, M.L.; Giuliano, G.; Merlo Pich, M.; Paolucci, U.; Parenti Castelli, G. and Ventura, B. (2002). Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 959(1): 199-213 p.

Lesgards, J.F.; Durand, P.; Lassarre, M.; Stocker, P.; Lesgards, G.; Lanteaume, A.; Prost, M. and Lehucher-Michel, M.P. (2002). Assessment of life style effects on the overall antioxidant capacity of healthy subjects, *Environmental Health Perspectives,* 110(5): 479 p.

Lévêque, C. and Mounolou, J.C. (2008). Biodiversité: Dynamique biologique et conservation. 2^e éd. (*Paris: Dunod*).

Li, Y. and Lim, S.C. (2007). Cadmium-induced apoptosis of hepatocytes is not associated with death receptor-related caspase-dependent pathways in the rat. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 24(3): 231- 238 p.

Livingstone, D.R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)*. 6: 427–430 p.

Loez, C.R., Salibian, A. and Topallian, M.L. (1998). Phytoplanktonic associations as indicators of zinc pollution. *Rev. Sci. Eau.* 11(3): 315-332 p.

Lubet, P. (1959). Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés (Moll.Bival). *Rev. Trav. Inst. Pêche Marit.* 23: 297-308 p.

Lucas, A. (1965). Recherche sur la sexualité des Mollusques Bivalves. *Université de Rennes, Facultés des Sciences Rennes (France)*.

M

Mates, J.M.; Perez-Gomes, C.; Nunez, De. and Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin.Biochem.* 32(8): 595-603 p.

Marigomez, I.; Soto, M.; Cajaraville, M.P.; Angulo, E. and Giamberini, L. (2002). Cellular and subcellular distribution of metals in Molluscs. *Microscopy Research and Technique.* 56: 358-392 p.

Markert, B.A.; Breure, A.M. And Zechmeister, H.G. (2003). Bioindicators and Biomonitoring. Principles, concepts and applications. (Vienne:Elsevier)

Mcelwain, A. and Bullard, S .A. (2014). Histological atlas of freshwater mussels (bivalvia, unionidae): *villosa nebulosa* (ambleminae: lampsilini), *fusconaia cerina* (ambleminae: pleurobemini) and *strophitus connasaugaensis* (unioninae: anodontini). *Malacologia.* 57(1): 99–239 p

Melwani, A.R.; Gregorio, D.; Jin, Y.; Stephenson, M.; Ichikawa, G.; Siegel, E.; Crane, D.; Lauenstein, G. and Davis, J.A. (2014). Mussel watch update: long-term trends in selected contaminants from coastal California, *Mar. Pollut. Bull.* 81: 292–302 p.

Mena, S.; Ortega, A. and Estrela, J.M. (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 674(1): 36-44 p.

Michelet, F.; gueguen, R.; Leroy, P.; Wellman, M.; Nicolas, A. and Sies ,G. (1995). Blood and plasma glutathione measured in healthy subjects by HPLC: Relation to sex, again, biological variables and life habits. *Cein. Chem.* 41(10): 1509-1517 p.

Miller, B.S.; Pine, D.J. and Redshaw, C.J. (2000). An assessment of the contamination and toxicity of marine sediments in the Holy Loch, Scotland. *Mar. Pollut. Bull.* 40: 22-34 p.

Miquel, M. (2001). Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. *Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques*. N° 2979 *Assemblée Nationale, N°261 Sénat*.

Ministère de Pêche des Océans (MPO) (2003). Direction des politiques et des services économiques, Région du Golfe, Profile de la moule bleue (*Mytilus edulis*). *Pêche et Océans Canada*. 59 p.

Montagnier, L.; Olivier, R. and Pasquier, C. (1998). Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine*. 24(9): 1538 p.

Moore, M.N. and Allen, J.I. (2002). A computational model of the digestive gland epithelial cell of marine mussels and its simulated responses to oil-derived aromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.* 54: 579-584 p.

Mouëza, M. (1971). Contribution à l'étude de l'écologie et de biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque Lamelibranche). *Editeur inconnu*.

Mouëza, M. and Frenkiel-Renault, L. (1973). Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusques: Lamelibranches) dans l'Algérois: la reproduction. *Cah. Biol. Mar.*

Mouëza, M. And Chessel, D. (1976). Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque Lamelibranche) dans l'Algérois: analyse statistique de la dispersion le long d'une Plage en baie de Bou-Ismaïl. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 21(3): 211-221 p.

N

Naciri, M. (1998). Dynamique d'une population de moules, *Mytilus galloprovincialis* (Lmk), vivant sur la cote atlantique marocaine. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat*. 21: 43-50 p.

Namour, P. (1992). Les mono-oxygénases de poissons, un outil pour la caractérisation des pollutions chroniques. *Etudes du CEMAGRE*. 6:232 p.

Nicholson, S. (2002). Ecophysiological aspects of cardiac activity in the subtropical mussel *perna viridis* (L) (Bivalvia : Mytilidae). *Jornal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 267: 22-207 p.

P

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.* 13(4): 281-317 p.

Poisson, C. (2013). Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. *Discipline: Toxicologie. Thèse de doctorat de l'université de Paris-sud.* 110 p.

R

Rae, T.D.; Torres, A.S.; Pufahl, R.A. and O'Hallora, T.V. (2001). Mechanism of Cu,Zn-superoxide dismutase activation by the human metallochaperone hCC. *Journal of Biological Chemistry.* 276(7): 5166 -5176 p.

Rainbow, S.P. (1995). Biomonitoring of Heavy Metal Availability in the Marine Environment. *Marine Pollution Bulletin.* 31(4-12): 183-192 p.

Rajaguru, P.; Suba, S.; Palanivel, M. and Kalaiselvi, K. (2003). Genotoxicity of a Polluted River System Measured Using the Alkaline Comet Assay on Fish and Earthworm Tissues. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 41: 85-91 p.

Ramesh, B. and Pugalendi, K.V. (2006). Antioxidant role of Umbelliferone in STZ-diabetic rats. *Life Sciences.* Vol. 79: 306-310 p.

Regoli, F.; Nigro, M. and Orlando, E. (1998). Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamusium Colbecki*. *Aquatic toxicology.* 375-392 p.

Renzi, A. (1963). Ricerche ecologiche e idrobiologiche su *Mytilus galloprovincialis* LmK. Nel Golfo di Napoli. *Bolletino di Pesca, Piscicoltura e Idrobiologia,* 18:187-238p.

Roberts S.M.; Munson, J.W.; Lowney, Y.W. and Ruby, M.V. (2006). Relative oral bioavailability of arsenic from contaminated soils measured in the cynomolgus monkey. *Toxicological sciences.* 95(1): 281-288p.

S

Serteyn, D.; Grulke, S.; Franck, T.; Mouithys-Mickalad, A. and Deby-Dupont, G. (2003). La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Annale de Médecine Vétérinaire*. 147: 79-93 p.

Sohal, R.S.; Mockett, R.J. and Orr, W.C. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad. Biol. Med.* 33(5): 575-586 p.

Soltani, N.; Amira, A.; Sifi, K. and Beli, H. (2012). Environmental Monitoring of the Annaba Gulf (Algeria): Measurement of Biomarkers in *Donax trunculus* and Metallic Pollution. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 137(1-4): 51-60 p.

Songy, P. and Avezard, J. (1963). Documents pour l'étude des invertébrés (non Arthropodes). Cours de sciences naturelles. *Classique Hachette*. 84 p.

Spadem, D. and Adagp, A. (1972). Grande encyclopédie (la rousse). *Australie bond, Librairie la rousse. Paris VI. ed. librairie la rousse. Canada.* 3: 1880 p.

Stien, X.; Rsoo, C.; Gnassia-Barelli, M.; Romeo, M. and Lafaurie, M. (1997). Effect of copper chloride in vitro on the hepatic EROD activity in the Fish *Dicentrhus labrax*. *Environ toxicol.Chem.* 16: 214-219 p.

T

Thannickal, V.J. and Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 279: 1005-28p.

U

Usero, J.; Morillo, J. and Garcia, I. (2005). Heavy metal concentrations in mollusks from the Atlantic coast of southern Spain. *Chemosphere*. 59(8): 1175-1181 p.

V

- Valko, M.; Rhodes, C.G.; Moncol, J.; Izakovic, M. and Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160(1): 1-40 p.
- Vaissière, R. and Fredj, G. (1963).** Contribution à l'étude de la faune benthique du plateau continental de l'Algérie. *Bull. Inst. Oceanogr. Monaco*. 60: 83p.
- Vertuani, S.; Angusti, A. and Manfredini, S. (2004).** The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des*. 10: 1677-1694 p.
- Viala, A. (1998).** Eléments de Toxicologie. *Ed, Tec. Doc*. 513-453p.
- Vivancos, P.D.; Wolff, T.; Markovic, J.; Pallardó, F.V. and Foyer, C.H. (2010).** A nuclearglutathione cycle within the cell cycle. *Biochemical Journal*. 431(2):169-178 p.
- Van Gestel, C.A.M. and Van Brummelen, T.C. (1996).** Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for redefinition of terms. *Ecotoxicology*5: 217-225 p

W

- Wade, B.A. (1964).** Studies on the biology of the West Indian beach clam, *Donax denticulatus* Linné.1.Ecology. *Bulletin of Marine Science*. 17(1): 149-174p.
- Weiss, D.; Shotyk, W. and Kempf, O. (1999).** Archives of Atmospheric Lead Pollution. *NaturWissenschaften. Mémoire de magister de l'université de Tlemcen-Algérie*.
- Winterbourn, C.C. and Munday, R. (1990).** Concerted action of reduced glutathione and superoxide dismutase in preventing redox cycling of dihydroxypyrimidines, and their role in antioxidant defense. *Free Radic Res Commun*. 8(4-6): 287-93p.
- Wu, S.; Wu, E.; Qiu, L.; Zhong, W. and Chen, J. (2011).** Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. *Chemosphere* 83: 429-434p.

Y

- Yo, C.L.; Liu, C.L.; Tsai, C.Y.; Sun, K.H.; Liao, T.S.; W.M. Chen, H.L. and Y o, H.S. (1993).** Prostaglandin E 2 suppresses phytohemagglutinin -induced immune responses of

normal human monoculatr cells by decreasing intracellular glutathione generation, but not due to increased DNA strand breaks or apoptosis. *Aegent Action*. 40: 191-199p.

Yoshikawa, T.; Toyokuni, S.; Yamamoto, Y. and Naito, Y. (2000). Free radicals in chemistry. *Biology and Medicine, Ed. Oica International (UK)*. 580 p.

Z

Zafrilla, P.; Ferreres, F. and Tomás-Barberán, F.A. (2002). Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(8): 3651-3655p.

Zelko, IN.; Mariani, TJ. and Folz, RJ. (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 Radical Biology and Medicine*. 33(3): 337-34

Conclusion

CONCLUSION:

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'évaluation de la contamination métallique du golfe d'Annaba chez les deux bivalves mollusques (*D. trunculus* et *M. galloprovincialis*) exposés à de multiples facteurs de stress (pollutants), ont révélé des variations de concentration de MDA et de GSH et des altérations cytologiques à différents endroits, liés au type de pollution.

Les résultats ont également montré un effet sexe pour la plupart des sites. Ainsi que, des dommages histologiques ont généralement suivi les variations des concentrations de MDA et de GSH. Finalement, ces résultats peuvent être renforcé avec d'autres testes t'elle que le dosage des métaux lourds et des anti-oxydants enzymatiques.

Résumé

RESUME

La plupart des côtes maritimes sont exposées à divers types de polluants causés par des activités industrielles, anthropiques ainsi que des produits physiques et chimiques toxiques, tels que les métaux lourds. Afin de déterminer le degré de contamination avec ces polluants, exceptionnellement la contamination métallique chez deux bivalves mollusques *Donax trunculus* et *Mytilus galloprovincialis*, dont l'échantillonnage a été fait le mois de mars 2018. Les sites sélectionnés pour l'échantillonnage sont les deux sites témoins El-Bettah et El-Henaya. Ainsi que, les sites Sidi Salem et Boukhemira pour l'espèce *D. trunculus* et Seybouse et Boukhemira pour l'espèce *M. galloprovincialis* sont considérés comme des sites pollués à partir des résultats obtenus. Les prélèvements choisis c'était des fragments du corps, des gonades et de l'hépatopancréas des individus mâles et femelles. On s'accroît sur l'effectuation de deux paramètres du stress oxydatif, le dosage du malondialdéhyde (MDA) et du glutathion réduit (GSH). Ainsi, confirmé avec l'étude histologique des gonades. Généralement, les résultats indiquent que les concentrations de MDA les plus élevées sont enregistrées au niveau de Sidi Salem et Seybouse chez les femelles de *D. trunculus* et les individus de *M. galloprovincialis* respectivement. Aussi, une diminution de la concentration de GSH est marquée toujours sur le site de Sidi Salem pour *D. trunculus* et Boukhemira pour *M. galloprovincialis*. Outre, l'étude histologique révèle des malformations tissulaires. D'après les résultats obtenus, ces deux bio-indicateurs ont la capacité de résister et de tester cette contamination au niveau du golfe d'Annaba à partir des interprétations. Suggérant que, cette accumulation est traduite par un déséquilibre physiologique et des altérations histologiques.

Les mots clés: Stress oxydatif, Bivalves, *M. galloprovincialis*, *Donax trunculus*, pollution marine, malondialdéhyde (MDA), glutathion réduit (GSH), histologie.

ABSTRACT:

Most seacoasts are exposed to various types of pollutants caused by industrial, anthropogenic and toxic physical and-chemical products such as heavy metals. To determine the degree of contamination with these pollutants, exceptionally metal contamination in two mollusc calms *Donax trunculus* and *Mytilus galloprovincialis*, whose sampling was done in March 2018. The sites selected for sampling are the two control sites El-Bettah and El-Henaya. On the other hand, the site Sidi Salem and Boukhmira for the species *D.trunculus* and Seybouse and Boukhemira for the species *M.galloprovincialis* are considered polluted sites from the results found. Although, the selected samples were fragments of the body, gonads and hepatopancreas of male and female individuals. There was increasing emphasis on the performance of two oxidative stress parameters, the malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) assays. Thus, confirmed with the histological study of gonads. Generally, the results indicate that the highest MDA concentration are recorded at Sidi Salem and Seybouse level in *D.trunculus* females and *M. galloprovincialis* individuals respectively. Also, a decrease in the concentration of GSH is still marked on the Sidi Salem site for *D.trunculus* and Boukhemira for *M.galloprovincialis*. In addition, the histological study reveals tissue malformation. According to the results obtained, these two bio-indicators have the capacity to resist and test this contamination in the Gulf of Annaba from the interpretation. Suggesting that, this accumulation and translated by a physiological imbalance and histological imbalance and histological alterations.

Key words: Stress oxydatif, Bivalves, *M. galloprovincialis*, *Donax trunculus*, marine pollution, malonaldehyde MDA, reduced glutathione GSH, Histology.

الملخص

تتعرض معظم السواحل البحرية لأنواع مختلفة من الملوثات التي تسببها المنتجات الفيزيائية والكيميائية الصناعية و كذا البشرية مثل المعادن الثقيلة.

و لتحديد درجة التلوث بهذه الملوثات و خاصة التأثير السمي للمعادن الثقيلة عند اثنين من الرخويات ثنائية الصدفة *Mytilus galloprovincialis* و *donax trunculus*. قمنا بأخذ عينات خلال شهر مارس 2018. على مستوى الموقعين الشاهدين البطاح و الحناية ' و الموقعين سيدي سالم و بوخميرة بالنسبة ل *D.trunculus* و الموقعين سييوس و بوخميرة بالنسبة ل *Mytilus galloprovincialis* التي تعتبر مواقع ملوثة نظرا للنتائج التي تم التحصل عليها. بحيث أن العينات المختارة تمثلت في أجزاء من الجسم و أجزاء من العضوين الغدة التناسلية و البنكرياس الكبدي لدى أفراد الذكور و الإناث.

قمنا باختبار معيارين من الإجهاد التاكسدي : المالونديالدهيد (MDA) و الجلوتاثيون المختزل (GSH) ' و للتأكد من النتائج المتحصل عليها قمنا بدراسة نسيجية للغدد التناسلية .

أوضحت النتائج المسجلة ارتفاعا في تركيز MDA على مستوى موقع سيدي سالم و سييوس لدى إناث *Donax trunculus* وكذا لأفراد *Mytilus galloprovincialis* . و أيضا انخفاض في تركيز GSH على مستوى سيدي سالم لدى *D.trunculus* و على مستوى بوخميرة لدى *M. galloprovincialis* . بالإضافة إلى ذلك كشفت الدراسة النسيجية وجود تشوهات في الأنسجة .

النتائج المتحصل عليها تبين بشكل كبير قدرة هذين المؤشرين الحيويين على مقاومة و اختبار هذا التلوث في خليج عنابة من خلال التفسيرات التي تشير أن هذه التراكمات ترجمت بعدم التوازن الفسيولوجي و التشوهات النسيجية .

الكلمات المفتاحية : الأصدفة - ثنائية الصدفة - *M.galloprovincialis* - *D.trunculus* - التلوث البحري - المالونديالدهيد (MDA) - الجلوتاثيون (GSH) - دراسة الأنسجة .

Annece

1. Préparation des solutions

1.1 Dosage des protéines par la méthode de Bradford:

- Solution BSA (1mg /ml) : Dissoudre 5 mg BSA dans 5 ml d'eau distillée.
- Réactif de Bradford : Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G250) dans 50ml d'éthanol (95%). Agiter par l'agitateur pendant 2 heures, puis ajouter 100 ml d'acide ortho phosphorique (85%) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1L de solution). Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de 4°C et à l'abri de la lumière .

1.2 Dosage du glutathion (GSH):

- Solution Tris (0.4 M), EDTA (0.02 M) et pH 9,6: Dissoudre 12,114g Tris et 1,871 g EDTA Dans 250ml d'eau distillée et ajuster le pH à 9,6 en ajoutant HCl ou NaOH.
- Solution EDTA (0,02M) : Dissoudre 5,613g EDTA dans 750ml d'eau distillée.
- Solution DNTP (0,01M) : Dissoudre 200 mg DNTB Dans 50ml de méthanol absolu.
- Solution d'acide salicylique (0,25%) : Dissoudre 250 mg d'acide salicylique dans 100 ml d'eau distillée.

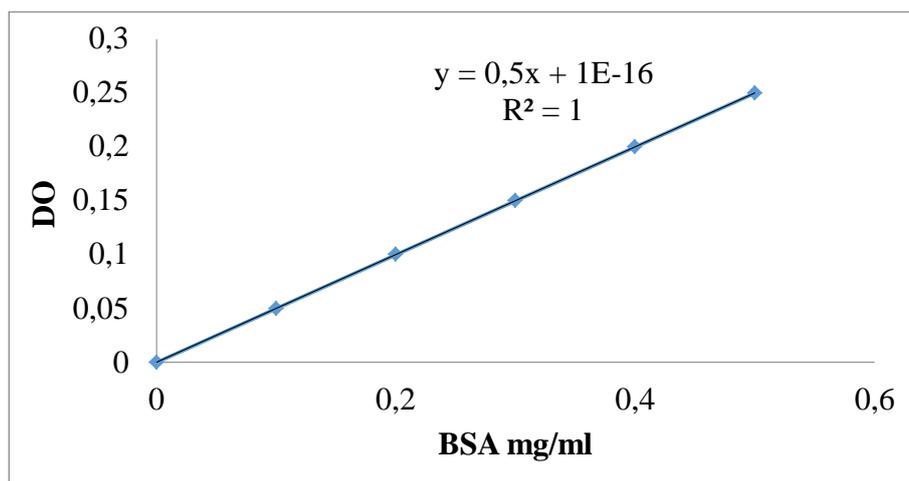
1.3 Dosage du malondialdéhyde (MDA):

- Solution Kcl : Dissoudre 1,30 g Kcl dans 200 ml d'eau distillée.
- Solution SDS (Sodium Dodecyle Sulfate) : Dissoudre 0,8 g SDS dans 10 ml d'eau distillée.
- Glacial acetic acide (CH_3COOH) : 10 ml CH_3COOH Dans 40 ml d'eau distillée et ajuster le pH à 3,5 (en ajuster le pH avec NaOH).
- Thiobarbiturique acid (TBA) : Dissoudre 0,4 g TBA dans 50 ml d'eau distillée.
- N-butanol pyridine : 95 ml butanol pure + 5 ml pyridine recouvrir le flacon avec du papier aluminium.

2. Réalisation de la gamme d'étalonnage

2.1 Gamme d'étalonnage pour la mesure des protéines:

BSA (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
DO à 595						
nm	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25



3. Résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification

Tableau 1: Résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification (site, sexe) de la concentration du malondialdéhyde en (nmol/g tissu) au niveau du corps de *D. trunculus* prélevé de trois sites du golfe d'Annaba: El-Bettah, Sidi Salem et Boukhemira.

Source	DDL	M	Fobe	P
Sexe	1	22380	16,26	0,001**
Site	2	77304	559,59	0,000***
Erreur	20	1377	-	-
Interaction	-	-	-	0,086
Totale	23	-	--	-

* (P < 0,05) : Différence significative

** (P < 0,01) : Différence hautement significative

*** (P < 0,001) : Différence très hautement significative

Tableau 2: Résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification (site, sexe) de la concentration du malondialdéhyde en (nmol/g tissu) au niveau des gonades de *D. trunculus* prélevé dans trois sites du golfe d'Annaba: El-Bettah, Sidi Salem et Boukhemira.

Source	DDL	M	Fobe	P
Sexe	1	34,21	0,35	0,562
Site	2	4356,3	4,42	0,026 *
Erreur	20	986,3	-	-
Lack of fit	-	-	-	0,569
Totale	23	-	--	-

Tableau 3: Résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification (site, sexe) de la concentration du malondialdéhyde en (nmol/g tissu) au niveau de l'hépatopancréas de *D. trunculus* prélevé de trois sites du golfe d'Annaba: El-Bettah, Sidi Salem et Boukhemira.

Source	DDL	M	Fobe	P
Sexe	1	77	0,03	0,854
Site	2	2227,95	100,05	0,000 ***
Erreur	20	2227	-	-
Interaction	-	-	-	0,219
Totale	23	-	--	-

Tableau 4: Résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification (site, sexe) de la concentration du malondialdéhyde en (nmol/g tissu) au niveau du corps de *M. galloprovincialis* prélevé de trois sites du golfe d'Annaba: El-Henaya, Seybouse et Boukhemira.

Source	DDL	M	Fobe	P
Sexe	1	0,30	0,000	0,991
Site	2	7868,38	3,37	0,055
Erreur	20	2333,73	-	-
Interaction	-	-	-	0,461
Totale	23	-	--	-

Tableau 5: Résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification (site, sexe) de la concentration du malondialdéhyde en (nmol/g tissu) au niveau des gonades de *M. galloprovincialis* prélevé de trois sites du golfe d'Annaba: El-Henaya, Seybouse et Boukhemira.

Source	DDL	M	Fobe	P
Sexe	1	410,6	0,52	0,479
Site	2	9586,8	12,15	0,055
Erreur	20	789,3	-	-
Interaction	-	-	-	0,404
Totale	23	-	--	-

Tableau 6: Résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification (site, sexe) de la concentration du malondialdéhyde en (nmol/g tissu) au niveau de l'hépatopancréas de *M. galloprovincialis* prélevé de trois sites du golfe d'Annaba: El-Henaya, Seybouse et Boukhemira.

Source	DDL	M	Fobe	P
Sexe	1	1387,2	0,82	0,376
Site	2	45423,9	26,80	0,000 ***
Erreur	20	1694,7	-	-
Interaction	-	-	-	0,001 **
Totale	23	-	--	-

Tableau 7 : Résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification (site, sexe) de la concentration du glutathion en (nmol/g tissu) au niveau du corps de *D. trunculus* prélevé de trois sites du golfe d'Annaba: El-Bettah, Sidi Salem et Boukhemira.

Source	DDL	M	Fobe	P
Sexe	1	7924	3,04	0,097
Site	2	424673	82,33	0,000 ***
Erreur	20	2607	-	-
Interaction	-	-	-	0,183
Totale	23	-	--	-

Tableau 8 : Résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification (site, sexe) de la concentration du glutathion en (nmol/g tissu) au niveau des gonades de *D. trunculus* prélevé de trois sites du golfe d'Annaba: El-Bettah, Sidi Salem et Boukhemira.

Source	DDL	M	Fobe	P
Sexe	1	67,51	0,11	0,748
Site	2	7286,33	11,44	0,000 ***
Erreur	20	637,06	-	-
Interaction	-	-	-	0,852
Totale	23	-	--	-

Tableau 9 : Résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification (site, sexe) de la concentration du glutathion en (nmol/g tissu) au niveau de l'hépatopancréas de *D. trunculus* prélevé de trois sites du golfe d'Annaba: El-Bettah, Sidi Salem et Boukhemira.

Source	DDL	M	Fobe	P
Sexe	1	26,42	0,03	0,875
Site	2	7046,40	6,77	0,006 **
Erreur	20	1041,37	-	-
Interaction	-	-	-	0,937
Totale	23	-	--	-

Tableau 10 : Résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification (site, sexe) de la concentration du glutathion en (nmol/g tissu) au niveau du corps de *M. galloprovincialis* prélevé de trois sites du golfe d'Annaba: El-Henaya, Seybouse et Boukhemira.

Source	DDL	M	Fobe	P
Sexe	1	2400	5,11	0,035 *
Site	2	150106	318,81	0,000 ***
Erreur	20	471	-	-
Interaction	-	-	-	0,149
Totale	23	-	--	-

Tableau 11 : Résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification (site, sexe) de la concentration du glutathion en (nmol/g tissu) au niveau des gonades de *M. galloprovincialis* prélevé de trois sites du golfe d'Annaba: El-Henaya, Seybouse et Boukhemira.

Source	DDL	M	Fobe	P
Sexe	1	140,11	0,89	0,357
Site	2	1880,66	11,92	0,000 ***
Erreur	20	157,81	-	-
Interaction	-	-	-	0,855
Totale	23	-	--	-

Tableau 12 : Résultats de l'analyse de la variance à deux critères de classification (site, sexe) de la concentration du glutathion en (nmol/g tissu) au niveau de l'hépatopancréas de *M. galloprovincialis* prélevé sites du golfe d'Annaba: El-Henaya, Seybouse et Boukhemira.

Source	DDL	M	Fobe	P
Sexe	1	237,2	1,02	0,325
Site	2	1451,6	6,22	0,008**
Erreur	20	233,2	-	-
Interaction	-	-	-	0,640
Totale	23	-	--	-