

Écotoxicologie

APPROCHE MULTIMARQUEUR POUR ÉVALUER LA VARIATION SAISONNIÈRE DES EFFETS DES POLLUANTS CHEZ LA MOULE *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* AU NIVEAU DU GRAND CASABLANCA (CÔTE ATLANTIQUE MAROCAINE)

par

Bouchra EL HAIMEUR^{1,2}, Mariama ZBIRY², Mina BOUHALLAOUI¹,
Najat ELKHIATI² et Ali BENHRA¹

La variation des niveaux de deux biomarqueurs – stabilité de la membrane lysosomale (SML), et activité Acétylcholinestérase (AChE) – a été évaluée, durant un cycle annuel, au niveau de deux sites, le site de Mohammedia, considéré comme un site contaminé, et le site de Dar Bouazza, considéré *a priori* comme un site témoin. Les deux sites sont situés au niveau de la région du grand Casablanca (côte Atlantique Marocaine). En complément aux biomarqueurs étudiés chez les moules desdits sites, trois autres biomarqueurs, induction des métallothionéines (MTs), activité Glutathion S-transférase (GST) et variation de l'indice de condition (IC), ont été étudiés uniquement sur les moules de Mohammedia.

Les résultats ont montré que les membranes lysosomales des hémocytes des moules de Dar Bouazza sont significativement plus stables que celles des moules de Mohammedia durant la saison du printemps. Aussi, l'activité Acétylcholinestérase est davantage inhibée chez les moules de Mohammedia en automne et en hiver. Par ailleurs,

1. Institut national de recherche halieutique, Laboratoires centraux, boulevard Sidi Abderrahmane, Casablanca, Maroc.

2. Faculté des Sciences Ain Chock, Département de Biologie, Km 8, Route d'El Jadida, BP 5366, Casablanca, Maroc.

Auteur de correspondance : elhaimeur16@gmail.com

Bulletin de la Société zoologique de France 142 (4)

une variation saisonnière des deux biomarqueurs (SML et AChE) a été observée au niveau des deux sites étudiés.

Les résultats du dosage des MTs ont montré une différence significative entre Dar Bouazza et Mohammedia durant le printemps. Toutefois, aucune variation saisonnière significative des MTs n'a été observée chez les moules de Mohammedia. De même, la variation de l'activité des GSTs des moules de Mohammedia n'a montré aucune différence entre les saisons. L'évolution de l'indice de condition a montré que le cycle de la moule au niveau de Mohammedia est marqué par deux chutes pouvant être assimilées à des périodes de ponte, et par une période de mise en réserve d'énergie caractérisée par une augmentation de l'IC (de mai à septembre).

L'application de l'indice de réponse biologique (IBR : Integrated Biological Response) pour une interprétation intégrée des biomarqueurs a permis de classer le site de Mohammedia comme site plus impacté par l'activité anthropique que le site de Dar Bouazza. La variation saisonnière de l'indice IBR au niveau de Mohammedia durant un cycle annuel a montré que le stress environnemental semble être plus fort en automne et plus faible en été.

Mots-clés : approche mutimarqueur, variation saisonnière, Integrated Biomarker Response, *Mytilus galloprovincialis*, côte Atlantique Marocaine.

Multimarker approach to assess seasonal variation of pollutant effects in *Mytilus galloprovincialis* in the Casablanca region (Moroccan Atlantic coast)

The change in the levels of two biomarkers – lysosomal membrane stability (SML) and Acetylcholinesterase (AChE) activity – was evaluated during an annual cycle at two sites, Mohammedia, considered a contaminated site, and Dar Bouazza, considered as a control site, both located in the Casablanca region (Moroccan Atlantic coast). In addition to the biomarkers studied in mussels from these sites, three other biomarkers – induction of metallothioneins (MTs), Glutathione S-transferase activity (GST), and condition index (IC) variation – were only studied in mussels from Mohammedia.

The results showed that the lysosomal membranes of the haemocytes of Dar Bouazza mussels were significantly more stable than those of the Mohammedia mussels during spring. Acetylcholinesterase activity was further inhibited in Mohammedia mussels in autumn and winter. Moreover, a seasonal variation of the two biomarkers (SML and AChE) was observed at the two studied sites.

The results of the metallothionein assay showed a significant difference in MTs between Dar Bouazza and Mohammedia during the spring season. No significant seasonal variation of MTs was observed in Mohammedia mussels. Similarly, the variation in Glutathione S-transferase activity in Mohammedia mussels showed no difference between seasons. Changes in the condition index showed that the cycle of the mussel at Mohammedia was marked by two decreases that might be considered as spawning periods and a period of energy reserve storage, characterized by an increase in IC.

The application of the Integrated Biological Response (IBR) for a combined interpretation of the biomarkers made it possible to classify the Mohammedia site as a site more impacted by anthropogenic activity. The seasonal variation of the IBR index at Mohammedia during an annual cycle showed that environmental stress appeared to be higher in autumn and lower in summer.

Keywords: multi-marker approach, seasonal variation, Integrated Biomarker Response, *Mytilus galloprovincialis*, Moroccan Atlantic coast.

Variation saisonnière des effets des polluants chez la moule

Introduction

Les polluants chimiques ont des origines très diverses résultant d'activités anthropiques présentes ou passées qui ne sont pas sans conséquence sur l'environnement marin et sur l'équilibre des milieux naturels. Au cours des dernières décennies, plusieurs biomarqueurs ont été utilisés comme indicateurs de l'état de santé environnemental (MOORE *et al.*, 2006 ; DAILIANIS *et al.*, 2003 ; VIARENGO *et al.*, 1997).

L'utilisation d'une batterie de biomarqueurs est plus pertinente que l'utilisation d'un seul biomarqueur et constitue un système d'alarme précoce dans la biosurveillance de l'environnement aquatique (DAILIANIS *et al.*, 2003) ; ils permettent l'évaluation des effets biologiques des contaminants chimiques, à différents niveaux de l'organisation des organismes marins (BOLOGNESI *et al.*, 2004 ; AMIARD *et al.*, 2006 ; MOORE *et al.*, 2006 ; RANK *et al.*, 2007 ; VIARENGO *et al.*, 2007). Les biomarqueurs constituent des réponses précoces et permettent la détection des prépathologies avant la mortalité ou l'apparition de certaines perturbations telles que le changement de l'état d'une population donnée (ADAMS, 1990 ; BRESLER *et al.*, 1999 ; FISHELSON *et al.*, 1999).

Le suivi de la contamination côtière, à travers les biomarqueurs mesurés chez des bivalves du genre *Mytilus*, est très largement utilisé dans de nombreux programmes de surveillance à l'échelle mondiale tels que le Mussel Watch (FARRINGTON, 1991), le RNO en France (BAYNE, 1989 ; CLAISSE, 1990) ou BIOMAR, pour la Mer Baltique. L'utilisation des moules comme espèce sentinelle dans de tels programmes est basée sur des caractéristiques spécifiques, à savoir la possibilité de les transplanter le long des côtes et de les mettre en culture (VIARENGO *et al.*, 2007), leur mode de vie sessile et euryhalin, et leur pouvoir accumulateur des polluants présents dans l'environnement comme les métaux lourds et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (VIARENGO *et al.*, 1987 ; BESADA *et al.*, 2002 ; MOURGAUD *et al.*, 2002 ; BOUTIBA *et al.*, 2003 ; ROMÉO *et al.*, 2005 ; TALEB *et al.*, 2009).

Dans la présente étude, nous avons étudié, durant un cycle annuel, la variation des niveaux de deux biomarqueurs, la stabilité de la membrane lysosomale (SML) et l'activité Acétylcholinestérase (AChE). En complément, trois autres biomarqueurs – l'induction des Méthallothionéines (MTs), l'activité Glutathion S-transférase (GST) et la variation de l'indice de condition (IC) – ont été étudiés uniquement sur les moules de Mohammedia. L'étude a été réalisée au niveau de deux sites, Mohammedia et Dar Bouazza, situés dans la région du grand Casablanca (côte atlantique marocaine) (Figure 1). Le site de Mohammedia est un site qui reçoit les eaux du rejet d'une société d'électrochimie et de pétrochimie utilisant des métaux lors des procédés de production. Ces eaux sont connues par leur toxicité vis-à-vis des organismes marins qui vivent dans le milieu récepteur, tandis que le site de Dar Bouazza est un site éloigné des activités industrielles implantées le long du littoral casablançais et connu pour sa bonne qualité (BOUHALLAOUI *et al.*, 2003, 2011 ; EL HAIMEUR *et al.*, 2012).

Bulletin de la Société zoologique de France 142 (4)

La SML est un biomarqueur cellulaire de stress recommandé par des organisations internationales telles que WHO-FAO (GESAMP, 1980) et UNEP/RAMOGGE (1999) comme outil de biosurveillance de l'environnement marin côtier. En effet, ce biomarqueur est précoce et très sensible pour la détection des perturbations environnementales (VIARENGO, 1985 ; MOORE, 1988). L'AChE est une enzyme impliquée dans la transmission synaptique de l'influx nerveux chez plusieurs organismes tels que les moules et les poissons et elle est inhibée par des composés neurotoxiques comme les pesticides organophosphatés et les carbamates (BOCQUENE & GALGANI, 1998). Le niveau des métallothionéines (MTs), protéines de faible poids moléculaire induites dans les cellules de la moule par les métaux lourds tels que le Cu, Zn, Hg, et Cd, constitue un biomarqueur connu pour l'évaluation de la contamination du milieu par ces composés chimiques inorganiques (VIARENGO & NOTT,

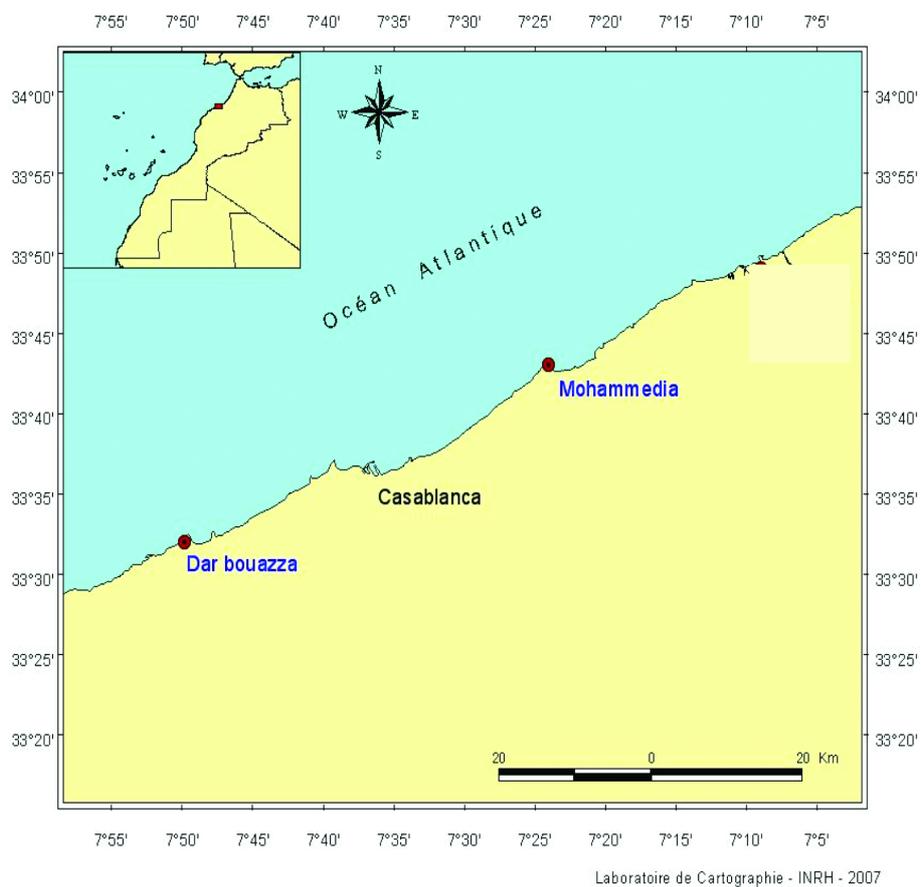


Figure 1

Carte de localisation des sites de prélèvement au niveau du grand Casablanca
(côte Atlantique Marocaine).

Map of sampling sites at great Casablanca (Moroccan Atlantic coast).

Variation saisonnière des effets des polluants chez la moule

1993). Les Glutathion S- transférases (GSTs) font partie des mécanismes de défense des cellules contre différents contaminants chimiques produisant un stress ; les GSTs correspondent à une famille d'enzymes qui oxydent les xénobiotiques les rendant parfois plus actifs biologiquement (e.g. HAPs). Une grande variété de composés chimiques induit les GSTs, parmi lesquels les HAPs et les PCBs (KAMEL, 2014). L'efficacité des GSTs est due au fait qu'un grand nombre de composés exogènes et endogènes ont les caractéristiques requises pour constituer un substrat approprié. Ces enzymes sont généralement solubles (cytosoliques) et présentes sous plusieurs isoformes, dont certaines sont inductibles par les contaminants qu'elles rendent moins toxiques. Cette particularité en a fait une activité intéressante en tant que marqueur biochimique. Les indices de condition (IC) sont également utilisés pour évaluer le cycle reproducteur des bivalves marins, généralement l'IC augmente au fur et à mesure que la gamétogénèse se déroule, et on assiste à une baisse brutale de l'IC au moment de la ponte puis cet indice reste faible pendant le repos sexuel. Les IC sont aussi utilisés pour évaluer la qualité des tissus, mais aussi pour suivre les effets des contaminants sur les organismes (CROSBY & GALE, 1990).

Les réponses des différents biomarqueurs chez les moules des deux sites étudiés ont été combinées en un seul indice qui est l'IBR (Réponse Intégrée des Biomarqueurs) (BELIAEFF & BURGEOT, 2002). L'IBR a été calculé pour évaluer le syndrome de stress induit par les polluants chez les organismes de ces deux sites.

Matériel et méthodes

Sites de prélèvement

La moule *Mytilus galloprovincialis* a été échantillonnée durant l'année 2014 à une fréquence trimestrielle (avril, août, novembre et janvier 2015) pour le suivi des biomarqueurs, et mensuelle pour la variation de l'IC, au niveau de deux sites du littoral atlantique marocain, Mohammedia (N°3343.00W07°24.00) situé à proximité d'un rejet d'une société de pétrochimie et d'électrochimie utilisant des métaux (principalement le mercure) lors des procédés de production et Dar Bouazza (N33°31.788W07°49.947) qui est un site loin des sources de pollution et éloigné des implantations industrielles situées sur la frange littorale (Figure 1).

Prélèvement des animaux

Durant l'année 2014, des moules (70 individus au niveau de Mohammedia et 30 individus au niveau de Dar Bouazza), d'une taille de 4 à 5 cm, sont prélevées manuellement au niveau de chaque site et la température de l'eau de mer est mesurée. Après ramassage, les moules sont placées dans une glacière et transportées au laboratoire dans un délai de deux heures au maximum. Pour les analyses biochimiques, l'hémolymphe est prélevée pour servir à l'analyse de la stabilité de la membrane lysosomale, et les glandes digestives des autres individus sont prélevées et conservées à -80°C jusqu'au moment de l'analyse des autres biomarqueurs (MTs, AChE et GSTs).

Analyses biochimiques***Évaluation de la stabilité de la membrane lysosomale***

La procédure d'évaluation de la SML suit le protocole de LOWE & PIPE (1994). De l'hémolymphe (0,5 ml) est soutirée à l'aide d'une seringue remplie de 0,2 ml d'eau de mer filtrée (EMF) du site d'échantillonnage, au niveau du muscle adducteur postérieur de la moule. Il est nécessaire d'écarter partiellement les valves de la moule à l'aide d'un scalpel pour pouvoir insérer la seringue de prélèvement. Les hémocytes d'un seul individu sont distribués (40 μ l/réplicat) sur les lames à raison de trois réplicats. Les lames sont déposées dans une chambre humide et laissées pendant 30 minutes pour assurer la fixation des cellules. L'excès de la suspension est éliminé et 40 μ l d'une solution du rouge neutre [20 mg de RN dans 1 ml de DMSO (diméthylsulfoxyde), dilué à 5 pour mille avec l'EMF du site] est distribuée. Au bout de 15 minutes, l'excès de colorant est éliminé et 40 μ l d'EMF sont déposés sur les cellules. Le degré de stabilité de la membrane des lysosomes est évalué après une heure, les lames étant examinées sous un microscope photonique muni d'une caméra. L'évaluation de ce paramètre est basée sur un dosage cytochimique et la valeur est quantifiée par analyse d'images, à l'aide d'un logiciel (Scion Image) en termes de densité optique (DO). La valeur de la DO est calculée par rapport au témoin (témoin Dar Bouazza pour la comparaison des sites et le printemps pour la comparaison des saisons). Une diminution de pourcentage de DO signifie que les moules sont stressées, ce qui témoigne d'une contamination du milieu.

Dosage des Méthallothionéines

Le protocole est décrit par VIARENGO *et al.* (1997). Les glandes digestives d'un pool de 10 individus sont homogénéisées dans un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 (1 g de tissu dans 3 volumes de tampon contenant du β -mercaptoéthanol, du PMSF et de la leupeptine) avec un homogénéisateur Ultra-Turrax. L'homogénéat est centrifugé à 30 000 xg pendant 20 min à 0-4°C. À 1 ml de surnageant sont ajoutés 1,05 ml d'éthanol absolu froid (-20°C) et 80 μ l de chloroforme. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 6 000 xg pendant 10 minutes à 0-4°C. Le surnageant est mesuré à l'aide d'une pipette, trois volumes d'éthanol froid et 40 μ l de HCl 37 % sont ajoutés, le mélange est maintenu à -20°C pendant une heure puis centrifugé à 6 000 xg pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est rincé avec une solution (87 : 1 : 12, v/v/v) d'éthanol/chloroforme/tampon d'homogénéisation (refroidie à -20°C) sans addition de β -mercaptoéthanol, PMSF et leupeptine, la solution est centrifugée pendant 10 minutes à 6 000 xg (rotor libre). Les culots sont séchés sous un flux d'azote pendant environ 10 minutes. Les culots sont ensuite remis en suspension dans 150 μ l de solution de NaCl 0,25 M et 150 μ l d'une solution de HCl 1N contenant 4 mM d'EDTA (la solution est agitée à l'aide d'un agitateur en verre et un vortex). Juste avant l'analyse, 4,2 ml d'une solution de DTNB (0,43 mM de DTNB dissous dans un tampon phosphate 0,2 M pH 8 contenant du NaCl 2 M) sont ajoutés au blanc, aux standards (au moins trois concentrations de 20 à 200 nmole/ml) et aux échantillons. Ensuite, les échantillons sont centrifugés à 3 000 xg pendant 5 minutes

Variation saisonnière des effets des polluants chez la moule

à température ambiante et l'absorbance est mesurée à 412 nm. Les concentrations des MTs sont calculées en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme standard de référence et sont exprimées en μg de MTs/g de poids frais, comme suit :

$$[\text{MTs}] = [(\text{ABS}_{412}^{\text{MT}}/\epsilon_{\text{GSH}}/21)*8600]*4,5*4$$

où :

$\text{ABS}_{412}^{\text{MT}}$: valeur de DO lue pour l'échantillon de MTs

ϵ_{GSH} : constante représentant le coefficient d'extinction de GSH

21 : le nombre de résidus cystéine de la molécule de la MT de moule

8600 : poids moléculaire de la MT de moule

4,5 ml : volume final de la réaction avec le DTNB

4 ml : facteur de dilution de l'homogénat.

Activité acétylcholinestérase

L'activité AChE a été mesurée en utilisant la fraction S9 de la glande digestive d'un pool de 6 individus de moule (en trois réplicats), selon la méthode d'ELLMAN *et al.* (1961), en utilisant l'acétylthiocholine (ATCh) 0,075 M comme substrat, le thionitrobenzoate (TNB), au cours de la réaction enzymatique est lue pendant 60 secondes à 412 nm à 25°C. La méthode est basée sur l'apparition de la couleur jaune due à la réaction de la thiocholine avec le TNB 0.01 M durant l'hydrolyse de l'ATCh par l'AChE. L'activité est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

Activité glutathion S transférase

Le dosage des GSTs a été réalisé en utilisant la méthode de HABIG *et al.* (1974) en utilisant le dichloronitrobenzène (DCNB) comme substrat. L'activité est mesurée sur la fraction post-mitochondriale (S9) de la glande digestive d'un pool de 6 individus de moules (en trois réplicats). La variation de la densité optique est lue à 340 nm pendant 30 secondes, la réaction a eu lieu à 25°C. L'activité est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

Pour les deux techniques (AChE et GST), le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de BRADFORD (1976) en utilisant la SAB (Sérum Albumine Bovine) comme protéine standard. La méthode est basée sur le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les acides aminés présents dans les protéines, se manifestant par le changement d'absorbance qui est mesuré à 595 nm.

Indice de condition

L'indice de condition (IC) est relevé sur 15 individus ayant une taille comprise entre 4 et 5 cm. Après la mesure du poids total de la moule, la chaire est séparée de la coquille, cette dernière est égouttée sur du papier absorbant puis pesée. Le calcul de l'indice est basé sur la formule exprimée par l'équation ci-dessous [AFNOR (NF V 45056, Septembre 1985)] :

$$\text{IC} = (\text{PTSEP}/\text{Poids total}) * 100$$

PTSEP : poids des tissus sans l'eau palléale.

Bulletin de la Société zoologique de France 142 (4)

Traitement des données

Calculs de l'indice IBR

Pour combiner tous les biomarqueurs en une seule réponse générale nous avons calculé l'indice IBR (réponse intégrée des biomarqueurs) utilisé par BELIAEFF & BURGEOT (2002). La méthode de calcul est décrite ci-dessous :

- calcul, pour chaque biomarqueur, de la moyenne et de l'écart type de chaque site ;
- normalisation des données pour chaque station, $X_i' = (X_i - X) / S$:

X_i' est la valeur normalisée du biomarqueur, X_i est la valeur moyenne d'un biomarqueur de chaque station, X est la moyenne du biomarqueur calculée pour toutes les stations, et S est l'écart type calculé pour les valeurs spécifiques à la station de chaque biomarqueur ;

- calcul de B pour chaque biomarqueur, $B = Z + | \min X_i' |$ où Z correspond à la valeur $+X_i'$ dans le cas d'une activation et $-X_i'$ dans le cas d'une inhibition, \min est une valeur minimale pour toutes les stations pour chaque biomarqueur ;

- $IBR = \{ [(B_1 \times B_2) / 2] + [B_2 \times B_3] / 2 + \dots + [(B_{n-1} \times B_n) / 2] + [B_n \times B_1] / 2 \}$.

Traitement statistique

Tout d'abord, la normalité de la distribution des données est testée et les données de tous les biomarqueurs, à l'exception de celles relatives à l'IC, suivent une loi

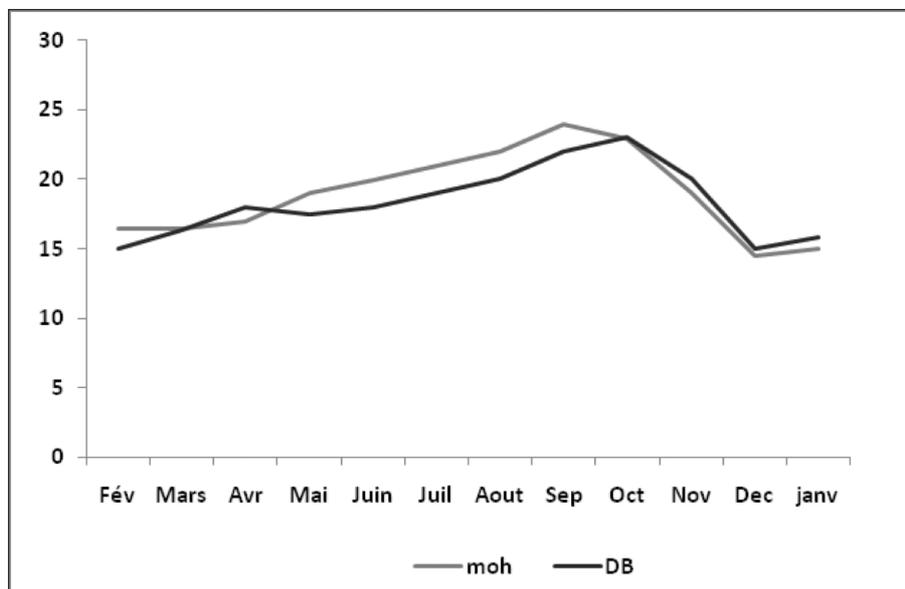


Figure 2

Variation de la température de l'eau de mer des deux sites (Mohammedia et Dar Bouazza) durant un cycle annuel.

Variation in sea water temperature at the two sites (Mohammedia, moh, and Dar Bouazza, DB) during an annual cycle.

Variation saisonnière des effets des polluants chez la moule

normale. La comparaison des moyennes des biomarqueurs est effectuée par le test ANOVA et la comparaison multiple par paire, en cas de significativité, est réalisée à l'aide du test Tukey HSD. La comparaison des moyennes ($p < 0,05$) est effectuée pour les valeurs enregistrées durant les quatre saisons, pour les biomarqueurs (SML, AChE, GSTs et MTs) étudiés chez les moules de Mohammedia, et pour les biomarqueurs (SML et AChE) étudiés chez les moules de Dar Bouazza. Aussi la comparaison des moyennes a été faite pour les données enregistrées au niveau des deux sites, pour les biomarqueurs (SML, AChE et MTs) analysés durant la saison du printemps. La non normalité des données des IC a exigé l'utilisation d'un test non paramétrique (Kruskal-Wallis) pour la comparaison des moyennes, et la comparaison multiple par paire a été réalisée selon la procédure Conover-Iman.

Le test de normalité de distribution des données, le test d'ANOVA et les comparaisons multiples par paire ont été effectués à l'aide du logiciel XLSTAT Version 2014.4.06.

Résultats

Les données de variation de la température durant l'année de suivi (année 2014) montrent que les valeurs suivent un cycle saisonnier. Les valeurs minimales ont été enregistrées en décembre 2014 (15°C). Les valeurs maximales ont été atteintes en septembre pour le site de Mohammedia (24°C) et en octobre (23°C) pour le site de Dar Bouazza (Figure 2).

Stabilité de la membrane lysosomale

La variation de la stabilité de la membrane lysosomale des hémocytes chez les moules prélevées au niveau des sites de Dar Bouazza et de Mohammedia est illustrée dans la figure 3. Tout au long de la période d'étude, une nette variabilité caractérise ce marqueur. En effet, au niveau de Mohammedia, le pourcentage de DO augmente du printemps à l'hiver avec une différence significative entre ces deux saisons (p -value=0,011).

Au niveau de Dar Bouazza, le degré de stabilité de la membrane lysosomale est statistiquement différent entre le printemps et l'été (p -value=0,043), il atteint son maximum au printemps. En comparant les deux sites il apparaît que les membranes lysosomales des moules de Dar Bouazza sont plus stables que celles de Mohammedia, durant le printemps, avec une différence significative (p -value=0,019).

Activité acétylcholinestérase

Les résultats de suivi saisonnier de l'activité AChE, dans la glande digestive de la moule prélevée au niveau des deux sites, montrent qu'à l'exception du printemps, l'activité est davantage inhibée chez les moules de Mohammedia par rapport à celles de Dar Bouazza. Les valeurs au niveau des deux sites décrivent des tendan-

Bulletin de la Société zoologique de France 142 (4)

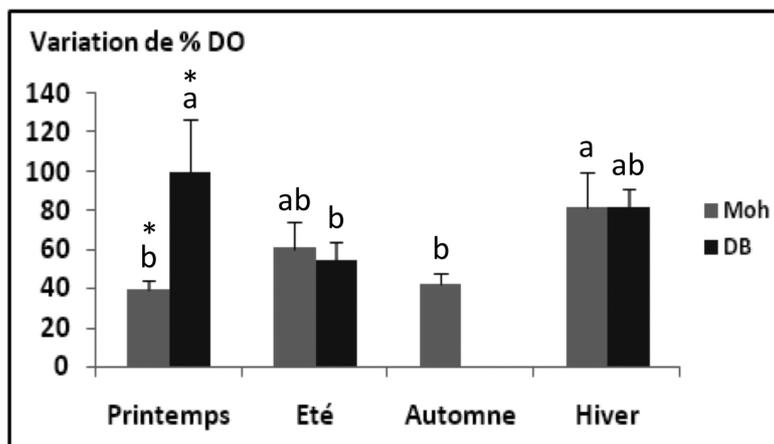


Figure 3

Pourcentage de la variation de la densité optique dans l'hémolymphe de la moule *Mytilus galloprovincialis* prélevée au niveau des sites de Mohammedia et Dar Bouazza, localisés au niveau de la côte du grand Casablanca (les barres avec des lettres différentes sont significativement différentes $p < 0.05$, et l'astérisque (*) signifie une différence significative entre les deux sites).

*Percentage of optical density variation in the haemolymph of *Mytilus galloprovincialis* sampled at the Mohammedia and Dar Bouazza sites on the coast of Casablanca (bars with different letters are significantly different $p < 0.05$, asterix * indicates significant difference between sites).*

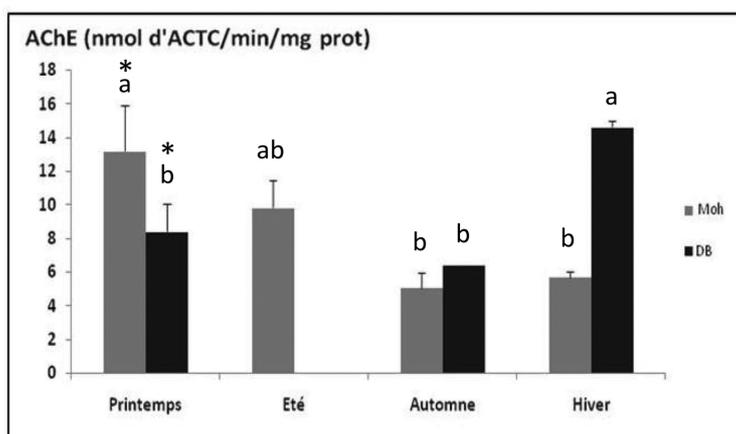


Figure 4

Concentrations moyennes de l'activité Acétylcholinestérase dans la glande digestive de la moule *Mytilus galloprovincialis* prélevée au niveau des sites de Mohammedia et Dar Bouazza localisés au niveau de la côte du grand Casablanca (les barres avec des lettres différentes sont significativement différentes $p < 0.05$, et l'astérisque (*) signifie une différence significative entre les deux sites).

*Mean concentrations of Acetylcholinesterase activity in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis* sampled at the Mohammedia and Dar Bouazza sites on the Casablanca coast (the bars with different letters are significantly different $p < 0.05$, asterix (*) indicates significant difference between sites).*

Variation saisonnière des effets des polluants chez la moule

ces différentes (Figure 4). En effet, chez les moules du site de Mohammedia, l'activité AChE par mg de protéine diminue en allant du printemps vers l'hiver avec une différence significative entre printemps et hiver (p -value=0,003) et aussi entre printemps et automne (p -value=0,002).

Au niveau de Dar Bouazza, l'activité est plus élevée en hiver qu'au printemps et automne avec une différence significative entre hiver et automne (p -value=0,011) et entre hiver et printemps (p -value=0,006). La comparaison des moyennes d'activité enregistrées au niveau des deux sites a montré que les deux sites sont statistiquement différents durant le printemps (p -value=0,0043) et l'hiver (p -value<0,0001).

Dosage des Méthallothionéines

L'évolution de la concentration des MTs dans la glande digestive des moules de Mohammedia montre que le contenu des moules en MTs ne varie que très peu avec la variation de la saison, le taux moyen enregistré est de $94 \mu\text{g/g pf}$; le traitement statistique des données a confirmé l'absence d'une différence significative entre les valeurs des quatre saisons.

Au niveau de Dar Bouazza, le dosage des MTs chez les moules prélevées durant le printemps révèle un taux de $77,11 \mu\text{g/g pf}$ (Figure 5). La comparaison des concentrations en MTs enregistrées chez les moules prélevées durant le printemps au niveau des deux sites montre une différence significative inter-sites avec une p -value de 0,004.

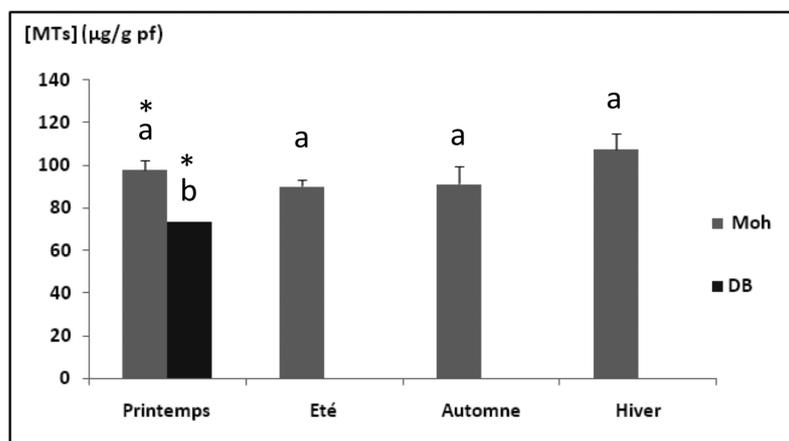


Figure 5

Concentration moyenne du contenu en MTs de la glande digestive de la moule *Mytilus galloprovincialis* prélevée au niveau des sites de Mohammedia et Dar Bouazza, localisés au niveau de la côte du grand Casablanca (les barres avec des lettres différentes sont significativement différentes $p < 0.05$), et l'astérisque (*) signifie une différence significative entre les deux sites.

Medium concentration of MT content in digestive gland of Mytilus galloprovincialis sampled at the Mohammedia and Dar Bouazza sites on the coast of Casablanca (the bars with different letters are significantly different $p < 0.05$), asterix () indicates significant difference between sites).*

Bulletin de la Société zoologique de France 142 (4)

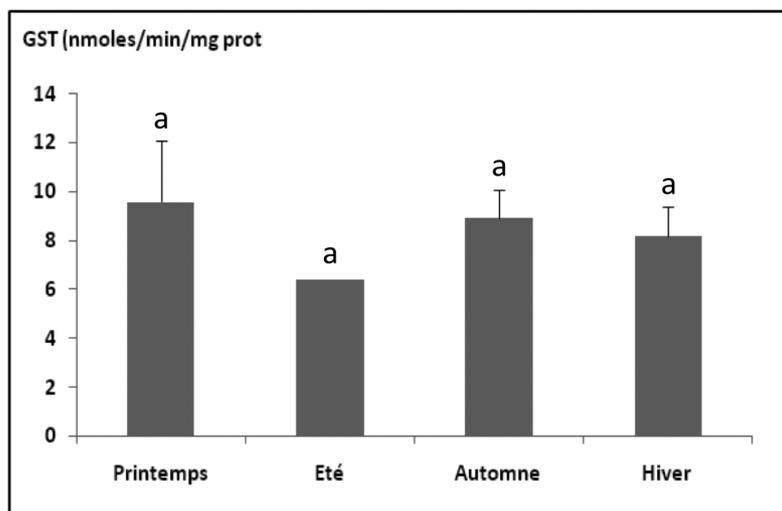


Figure 6

Pourcentage moyen de l'activité GST chez la moule *Mytilus galloprovincialis* prélevée au niveau du site de Mohammedia (la lettre a correspond à la non significativité statistique à $p < 0.05$).

Mean percentage of GST activity in Mytilus galloprovincialis sampled at the Mohammedia site (the letter 'a' corresponds to non-statistical significance at $p < 0.05$).

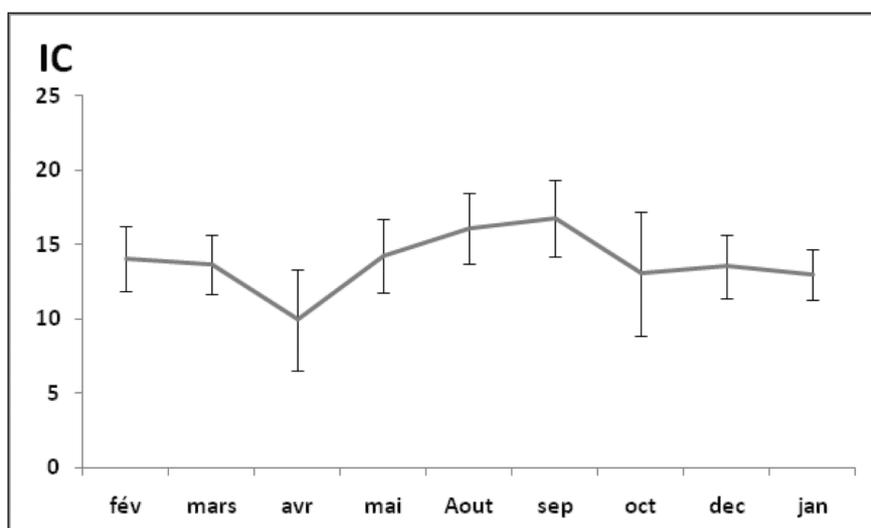


Figure 7

Évolution de l'indice de condition des moules ($n=30$ individus) prélevées au niveau de Mohammedia entre février 2014 et janvier 2015.

Changes in the condition index of mussels ($n = 30$ individuals) sampled at Mohammedia between February 2014 and January 2015.

Variation saisonnière des effets des polluants chez la moule

Activité glutathion S-transférase

La variation de l'activité glutathion S-transférase, mesurée dans la glande digestive de la moule *Mytilus galloprovincialis* en provenance du site de Mohammedia, est présentée dans la figure 6. L'évolution de l'activité de ce biomarqueur a montré une diminution durant la saison d'été par rapport aux autres saisons. L'analyse statistique des données n'a toutefois montré aucune différence significative entre les saisons.

Indice de condition

La variation de l'indice de condition, tout au long du cycle annuel (entre février 2014 et janvier 2015), est illustrée dans la figure 7. L'évolution de l'indice est marquée par deux chutes, une au mois d'avril (IC=9.93) suivie d'une élévation entre le mois de mai et le mois de septembre, et une deuxième chute moins intense (IC=13) est enregistrée au mois d'octobre. L'analyse statistique des données a montré des différences significatives entre les mois (Tableau 1).

Analyse de l'IBR

L'application de l'IBR dans la présente étude nous a permis d'évaluer, d'une manière globale, la variation saisonnière de l'ensemble des biomarqueurs mesurés chez *M. galloprovincialis* au niveau de Mohammedia, et de classer les deux sites étudiés en se basant sur les résultats du printemps. En effet, le calcul de l'IBR pour les quatre saisons au niveau du site de Mohammedia montre que la valeur la plus élevée est notée en automne et la plus faible est enregistrée en été (Figure 8). En comparant les deux sites durant la saison du printemps, la valeur d'IBR enregistrée au niveau de Mohammedia est plus élevée que celle de Dar Bouazza (Figure 9).

Tableau 1

p-values obtenues suite aux tests de Conover-Iman effectués pour comparer les valeurs d'indice de condition enregistrées aux différents mois de l'étude.

p-value of the comparisons between the values of condition index recorded in the various months of the study.

	fév	mars	avr	mai	aout	sep	oct	dec	janv
fév	1	0,458	< 0,0001	0,762	0,002	0,000	0,494	0,374	0,060
mars	0,458	1	0,000	0,350	0,000	< 0,0001	0,967	0,890	0,268
avr	< 0,0001	0,000	1	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,000	0,000	0,004
mai	0,762	0,350	< 0,0001	1	0,019	0,003	0,377	0,289	0,057
aout	0,002	0,000	< 0,0001	0,019	1	0,493	0,000	0,000	< 0,0001
sep	0,000	< 0,0001	< 0,0001	0,003	0,493	1	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
oct	0,494	0,967	0,000	0,377	0,000	< 0,0001	1	0,860	0,260
dec	0,374	0,890	0,000	0,289	0,000	< 0,0001	0,860	1	0,328
janv	0,060	0,268	0,004	0,057	< 0,0001	< 0,0001	0,260	0,328	1

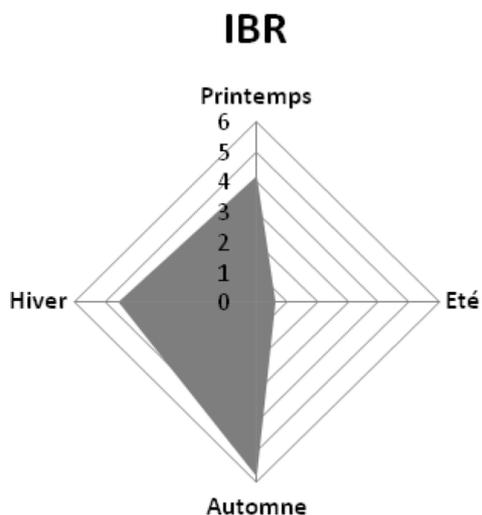


Figure 8

Variation saisonnière de l'indice IBR (calculé pour les biomarqueurs SML, MTs, GSTs, AChE et IC) chez la moule *Mytilus galloprovincialis* prélevée au niveau du site de Mohammedia (côte Atlantique Marocaine).

*Seasonal variation of IBR index (calculated with SML, MTs, GSTs, AChE and IC biomarkers) in the mussel *Mytilus galloprovincialis* sampled at the Mohammedia site (Moroccan Atlantic coast).*

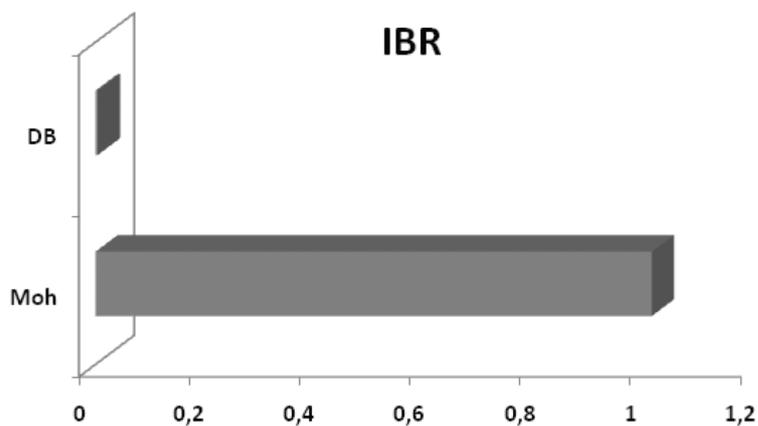


Figure 9

Réponse intégrée des biomarqueurs (IBR) (calculée pour les biomarqueurs SML, AChE et MTs) chez *Mytilus galloprovincialis* prélevée, durant la saison du printemps, au niveau des deux sites, Mohammedia et Dar Bouazza (côte Atlantique Marocaine).

*Integrated biomarkers response (IBR) (calculated with LMS, AChE and MTs biomarkers) for *Mytilus galloprovincialis* collected during spring at the Mohammedia and Dar Bouazza sites (Moroccan Atlantic coast).*

Variation saisonnière des effets des polluants chez la moule

Discussion et conclusion

Le biomarqueur SML est un marqueur spécifique de la physiologie générale de la cellule et de sa capacité de défense immunitaire. Il est très utilisé dans la bio-surveillance côtière marine et il est généralement considéré comme système d'alarme précoce (VIARENGO *et al.*, 1995, VIARENGO *et al.*, 2007). Différentes études ont montré que ce paramètre est affecté par les contaminants organiques et inorganiques.

L'activité AChE est inhibée par les composés organophosphorés et les carbamates (DEVI *et al.*, 1995 ; GALGANI *et al.*, 1988 ; HOLLAND *et al.*, 1967), ainsi que par les métaux lourds (NAJIMI *et al.*, 1997), et plusieurs études ont démontré l'importance de la mesure de l'activité AChE chez les invertébrés comme biomarqueur d'exposition dans les eaux côtières et celles des rivières (MOULTON *et al.*, 1996 ; STIEN *et al.*, 1998).

Les résultats de notre étude ont montré que les membranes lysosomales des hémocytes des moules de Dar Bouazza sont généralement plus stables que celles des moules de Mohammedia. Aussi, l'activité Acétylcholinestérase est davantage inhibée chez les moules de Mohammedia, indiquant ainsi de forts effets neurotoxiques chez les moules de ce site. Ceux-ci pourraient être liés à l'éloignement de Dar Bouazza des activités industrielles implantées le long du littoral casablançais, et la proximité du site de Mohammedia d'un rejet d'une société d'électrochimie. Ce résultat est confirmé par des études précédentes portant sur l'évaluation de la qualité du milieu de ces deux sites à travers l'étude du développement embryon-larvaire chez la moule (BOUHALLAOUI *et al.*, 2011) et chez l'oursin (EL HAIMEUR *et al.*, 2013). Ces études ont montré que le site de Dar Bouazza est classé de bonne qualité, tandis que le site de Mohammedia est de mauvaise qualité du fait que ce dernier reçoit les eaux du rejet d'électrochimie très toxiques. L'utilisation des métaux (principalement le mercure) lors des procédés de production de la société qui rejette ces déchets dans le site de Mohammedia, ainsi que le caractère très basique (pH = 11) de ce rejet expliquent sa grande toxicité (BOUHALLAOUI *et al.*, 2003). La comparaison entre les deux sites, durant la saison du printemps, a montré que l'activité AChE était plus élevée chez les moules de Mohammedia. En effet, cette élévation pourrait être expliquée par l'effet des métaux lourds détectés au niveau de ce site. Selon EICHHORN *et al.* (1969), les métaux, en plus de leur effet inhibiteur de l'activité AChE, peuvent dans certains cas stimuler la fonction catalytique de l'enzyme.

L'évaluation des niveaux de deux biomarqueurs SML et AChE durant les quatre saisons a montré une variation saisonnière de ces deux indicateurs au niveau de Mohammedia et Dar Bouazza. Selon DAILIANIS *et al.* (2003) et DELLALI *et al.* (2001), la température de l'eau peut influencer l'activité AChE. La variation saisonnière de ce paramètre au niveau des deux sites étudiés pourrait expliquer la variation de la SML et l'activité AChE. HAUTON *et al.* (1998) ont montré que le degré de la stabilité lysosomale est élevé durant la saison où la température est intermédiaire ; ce résultat est en accord avec le résultat enregistré chez les moules de Dar Bouazza.

Bulletin de la Société zoologique de France 142 (4)

En effet, la baisse de la température en hiver au niveau de Dar Bouazza ($T=15^{\circ}\text{C}$) pourrait être responsable de l'induction de l'activité AChE au maximum durant cette saison. Cependant, d'autres facteurs, notamment le stade de reproduction et l'état physiologique de la moule, peuvent influencer la variation saisonnière des deux biomarqueurs étudiés.

L'évaluation de la concentration des MTs dans les tissus des mollusques est très utilisée pour détecter la réponse biologique à la contamination des eaux côtières par les métaux traces (VIARENGO *et al.*, 1997, 1999 ; PETROVIC *et al.*, 2001). Les résultats de la présente étude ont montré une différence significative entre des concentrations en MTs, des moules prélevées durant le printemps, au niveau des sites de Dar Bouazza et Mohammedia. Ceci est expliqué par la proximité du site de Mohammedia du rejet d'une société de pétrochimie utilisant des métaux (principalement le mercure) lors des procédés de production. La charge métallique (Cd, Pb, Hg et Cu) des moules prélevées aux abords de ce rejet révèle en effet une contamination importante en mercure dépassant parfois les normes admises (allant jusqu'à $7,7 \mu\text{g/g}$ ps) avec 20 % de méthylmercure qui est la forme la plus toxique (CHAFIK *et al.*, 2001 ; INRH, 2002), une autre étude a montré que ce site présente une forte accumulation en Hg avec une concentration de $0,79 \text{ mg/kg}$ ps (BENBRAHIM *et al.*, 2006).

Le suivi de la variation des MTs au niveau du site de Mohammedia suggère que la variation des facteurs environnementaux, tels que la température suivie durant le présent travail, ne modifieraient pas les concentrations des MTs dans les moules. En effet, l'analyse statistique a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les saisons.

Les GSTs font partie des mécanismes de défense des cellules contre différents contaminants chimiques produisant un stress. L'efficacité des GSTs est due au fait qu'un grand nombre de composés exogènes et endogènes ont les caractéristiques requises pour constituer un substrat approprié. La mesure de l'activité GST chez les moules de Mohammedia a montré la réponse de ces dernières au stress généré par les contaminants présents dans le milieu. L'étude de la variation saisonnière des GSTs a montré l'absence d'une différence significative entre les quatre saisons. Le même résultat est rapporté par KOPECKA *et al.* (2006), chez les moules bleues de la mer du Nord allemande, et par BENALI (2015) chez *Mytilus galloprovincialis* prélevé au niveau d'un site de référence du littoral algérien. Cependant, une forte variabilité saisonnière a été démontrée chez les moules de la mer Adriatique (BORKOVIC *et al.*, 2005) avec un minimum au printemps et un maximum en hiver. Selon TIM TIM *et al.* (2009), l'activité GST chez trois espèces de mollusques (*Mytilus galloprovincialis*, *Nucella lapillus* et *Monodonta lineata*) prélevées au niveau des côtes portugaises est influencée par le facteur environnemental salinité et par des facteurs biotiques liés à l'état physiologique et aux réserves énergétiques des mollusques.

L'évolution de l'indice de condition a montré deux chutes, une au mois d'avril (printemps) et une autre moins intense au mois d'octobre (automne), la diminution de la valeur de l'indice marque une diminution du poids de la chair de la moule. Ces chutes pourraient être attribuées à un amaigrissement des moules en lien avec des

Variation saisonnière des effets des polluants chez la moule

changements de disponibilité de la nourriture ou au cycle de gamétogenèse et en particulier à la ponte (HUMMEL *et al.*, 1996 ; PAMPANIN *et al.*, 2005). Nos résultats concordent avec ceux de BHABY (2013) qui stipule que le cycle de la moule *Mytilus galloprovincialis* prélevée sur le littoral atlantique marocain, comprend deux pontes, une au printemps et l'autre en automne. Selon SEED (1975), la période du cycle de reproduction de *M. galloprovincialis* varie de la fin du printemps jusqu'à la fin d'automne et elle est liée à plusieurs facteurs dont la température qui est la plus influente. Les chutes de l'IC pourraient aussi être associées à des épisodes de stress chimiques, durant lesquelles les organismes utilisent les réserves énergétiques pour leur détoxification (BAYNE, 1985 ; MODASSIR & ANSARI, 2000). Par ailleurs, la valeur de l'indice atteint son maximum au mois de septembre (été), ce qui pourrait coïncider avec la période de maturité sexuelle. Ainsi, deux périodes marquent le cycle de la moule au niveau de Mohammedia, une période d'utilisation maximale de l'énergie pour la ponte (IC faible) et une période de mise en réserve d'énergie durant la période de maturité sexuelle (IC élevé).

La variation de l'IBR chez les moules de Mohammedia et Dar Bouazza durant la saison du printemps a montré que le stress environnemental semble être plus fort au niveau de Mohammedia ; ceci pourrait être lié, comme précédemment expliqué, à la qualité du milieu des deux sites. La variation saisonnière de l'indice IBR au niveau de Mohammedia durant un cycle annuel a montré que le stress environnemental semble être plus fort en automne, et il est faible en été ; ce constat pourrait être expliqué par la contamination du milieu, principalement par les métaux (Hg). Une étude sur la variation saisonnière de l'accumulation des métaux (Hg et Pb) au niveau de ce site a montré que les teneurs minimales apparaissent pendant la saison estivale et les teneurs maximales sont enregistrées pendant la saison printanière ou parfois en hiver. Aussi, de nombreux travaux ont mis en évidence l'influence des saisons sur l'accumulation des métaux par la moule qui induisent un maximum de bioconcentration en hiver et au début du printemps et un minimum en été (AMIARD *et al.*, 1980 ; BRYAN *et al.*, 1980 ; COSSA, 1985 ; LANGSTON, 1995, *in* BENBRAHIM *et al.*, (2006).

Conclusion générale

L'utilisation de l'approche multi marqueur dans la présente étude nous a permis d'évaluer les effets biologiques des contaminants chimiques et les variations saisonnières des biomarqueurs chez la moule *Mytilus galloprovincialis* du site de Mohammedia. L'intégration des résultats des différentes réponses à travers le calcul de l'IBR, à différentes saisons, a montré que le stress environnemental est plus prononcé en automne et qu'il est faible en été. La comparaison des effets enregistrés chez les moules du site de Mohammedia (connu par sa mauvaise qualité) avec ceux enregistrés chez les moules de Dar Bouazza (site éloigné des sources de pollution) a indiqué un niveau élevé de stress au niveau de Mohammedia et qui pourrait être lié au niveau de contamination de ce site.

Bulletin de la Société zoologique de France 142 (4)

Remerciements

Nous remercions le programme MedPol de nous avoir aidés à mettre en place le biomarqueur stabilité de la membrane lysosomale ainsi que Monsieur H. Oubbamoh, agent technique au laboratoire, et Mesdames M. Fouad et S. Talba (doctorantes au laboratoire) pour leur aide dans le prélèvement et le prétraitement des échantillons.

RÉFÉRENCES

- ADAMS, S.M. (1990).- Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. *Am. Fish. Soc. Symp.*, **8**, 1-8.
- AMIARD, J.C., AMIARD-TRIQUET, C., BARKA, S., PELLERIN, J. & RAINBOW, P.S. (2006).- Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.*, **76**, 160-202.
- BAYNE, B.L. (1989).- Measuring the biological effects of pollution: the mussel watch approach. *Wat. Sci. Tech.*, **21**, 1089-1100.
- BAYNE, B.L., BROWN, D.A., BURNS, K., DIXON, D.R., IVANOVICI, A., LIVINGSTONE, D.R., LOWE, D.M., MOORE, M.N., STEBBING, A.R.D. & WIDDOWS, J. (1985).- *The effects of stress and pollution on marine animals*. New York, Praeger.
- BELIAEFF, B. & BURGEOT, T. (2002).- Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, **21** (6), 1316-22.
- BENALI, I. (2015).- *Utilisation de la moule Mytilus galloprovincialis (Lmk, 1819) collectée sur le littoral ouest algérien pour l'évaluation de l'impact d'une pollution anthropogénique (métaux lourds, PCBs, HAPs)*. Thèse de doctorat, Université d'Oran, 213 p.
- BENBRAHIM, S., CHAFIK, A., CHFIRI, R., BOUTHIR, F.Z., SIEFEDDINE, M. & MAKAOUI, A. (2006).- Étude des facteurs influençant la répartition géographique et temporelle de la contamination des côtes atlantiques marocaines par les métaux lourds : cas du mercure, du plomb et du cadmium. *Mar. Life*, **16**, 37-47.
- BESADA, V., FUMEGA, J. & VAAMONDE, A. (2002).- Temporal trends of Cd, Cu, Hg, Pb and Zn in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Spanish North-Atlantic coast 1991-1999. *Sci. Total. Environ.*, **288**, 239-253.
- BHABY, S. (2013).- *Mytilus galloprovincialis : cycle de reproduction et histopathologie le long des côtes marocaines*. Thèse de doctorat, Faculté des sciences Ain Chock, Casablanca, 177 p.
- BOCQUENÉ, G. & GALGANI, F. (1998).- Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate compounds. *Techniques in Marine Environmental Science*, **22**, 1-12.
- BOLOGNESI, C., FRENZILLI, G., LASAGNA, C., PERRONE, E. & ROGGIERI, P. (2004).- Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. *Mutation Res.*, **552**, 153-162.
- BORKOVICA, S.S., SAPONJICA, J.S., PAVLOVICA, S.Z., BLAGOJEVICA, D.P., MILOSEVICA, S., KOVACEVICA, T.B., RADOJICIC, R.M., SPASICA, M.B., ZIKICC, R.V. & SAICICA, Z.S. (2005).- The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comp. Biochem. Physiol. C, Toxicol. Pharmacol.*, **141**, 366-374.
- BOUHALLAOUI, M., BENHRA, A., CHAFIK, A. & BLAGHEN, M. (2003).- L'huître creuse *C. gigas*, un outil de biodétection de la pollution marine. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **128** (1-2), 35-48.
- BOUHALLAOUI, M., BENHRA, A., NILI, H., EL HAIMEUR, B., ELAMRANI, S. & CHAFIK, A. (2011).- Utilisation des stades de développement embryo-larvaire chez *Mytilus galloprovincialis* pour l'évaluation de la qualité des eaux marines et de la toxicité des rejets. *Bull. Soc. zool. Fr.*, **136** (1-4), 205-218.

Variation saisonnière des effets des polluants chez la moule

- BOUTIBA, Z., TALEB, M.Z. & ABIAYAD, S.M. EL A. (2003).- *État de la pollution marine de la côte oranaise*, Dar El Gharb, Oran, 69 p.
- BRADFORD, M.M. (1976).- A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- BRESLER, V., BISSINGER, V., ABELSON, A., DIZER, H., STURM, A., KRATKE, R., FISHELSON, L. & HANSEN, P.D. (1999).- Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. *Helgoland Marine Res.*, **53**, 219-243.
- CHAFIK, A., CHEGGOUR, M., COSSA, D., BENBRAHIM, S. & SIFFEDINE, M. (2001).-Quality of Moroccan atlantic coastal waters: water monitoring and mussel watching. *Aquat. Living Resour.*, **14**, 239-249.
- CLAISSE, D. (1989).- Chemical contamination of the french coasts. The results of a ten-year mussel watch. *Marine Pollut. Bull.*, **20**, 523-528.
- CROSBY, M.P. & GALE, L.D. (1990).- A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *J. Shellfish Res.*, **91**, 233-237.
- DAILIANIS, S., DOMOUHTSIDOU, G.P., RAFTOPOULOU, E., KALOYIANNI, M. & DIMITRIADIS, V.K. (2003).- Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.*, **56**, 443-470.
- DELLALI, M., ROMEO, M. & AISSA, P. (2001).- Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. *Oceanologica*, **24**, 263-271.
- DEVI, M. & FINGERMAN, M. (1995).- Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red Swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, by mercury, cadmium and lead. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **55**, 746-750.
- EICHHORN, G.L., CLARCK, P. & TARIEN, E. (1969).- The interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. *J. Biol. Chem.*, **244**, 937-942.
- EL HAIMEUR, B., BOUHALLAOUI, M., FARAH, S., EL MORTAJI, H. & BENHRA, A. (2013).- Utilisation des stades de développement embryo-larvaire chez l'oursin de mer *Paracentrotus lividus* pour l'évaluation de la qualité des eaux marines et de la toxicité des rejets. *Bull. Soc. zool. Fr.*, **138** (1-4), 165-176.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V.JR. & FEATHERSTONE, R.M. (1961).- A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88-95.
- FARRINGTON, J.W. (1991).- Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms. *Environ. Health Persp.*, **90**, 75-84.
- FISHELSON, L., BRESLER, V., MANELIS, R., ZUK-RIMON, Z., DOTAN, A., HORNUNG, H. & YAWETZ, A. (1999).- Toxicological aspects associated with the ecology of *Donax trunculus* (Bivalvia, Mollusca) in a polluted environment. *Sci. Total Environ.*, **226**, 121-131.
- GALGANI, F. & BOCQUENE, G. (1988).- A method for routine detection of organophosphates and carbamates in sea water. *Environ. Technol/ Lett.*, **10**, 311-322.
- GESAMP (1980).- Monitoring biological variables related to marine pollution. *Rep. Stud. GESAMP*, (12), 22 p.
- HABIG, W., PABST, M. & JAKOBY, W. (1974).- Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139.
- HAUTON, C., HAWKINS, L. E. & HUTCHINSON, S. (1998).- The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **119**, 619-623.

Bulletin de la Société zoologique de France 142 (4)

- HOLLANDH, T., COPPAGE, D.L. & BUTLER, P.A. (1967).- Use of fish brain acetylcholinesterase to monitor pollution by organophosphoruspesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2**, 156-162.
- HUMMEL, H., AMIARD-TRIQUE, C., BACHELET, G., DESPREZ, M., MARCHAND, J., SYLVAND, B., AMIARD, J.C., RYBARCZYK, H., BOGAARDS, R.H., SINKE, J., DE WIT Y. & DE WOLF, L. (1996).- Sensitivity to stress of the estuarine bivalve *Macoma balthica* from areas between the Netherlands and its southern limits (Gironde). *J. Sea Res.*, **35** (suppl 4), 315-321.
- INRH (2002).- *Évaluation de la qualité et de la salubrité du milieu marin*. Rapport annuel de l'état de l'environnement marin, 1997-2001, 100 p.
- KAMEL, N. (2014).- *Effets combinés des facteurs environnementaux et des polluants chimiques chez la moule Mytilus galloprovincialis. Harmonisation des biomarqueurs d'exposition suivant les recommandations OSPAR et MEDPOL*. Thèse de doctorat, Université de Nantes, Faculté des Sciences et des Techniques, 216 p.
- KOPECKA, J., LEHTONEN, K.K., BARSJENE, J., BROEG, K., VUORINEN, J., GERCKEN, J. & PEMPKOWIAK, J. (2006).- Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdansk (southern Baltic). *Mar. Pollut. Bull.*, **53** (8-9), 406-421.
- LOWE, D.M. & PIPE, R.K. (1994).- Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat. Toxicol.*, **30**, 357-365.
- MODASSIR, Y. & ANSARI, A. (2000).- Effect of petroleum hydrocarbon on physiological and biochemical parameters in an estuarine clam (*Paphia malabarica*). *Fishery Technology*, **37**, 40-45.
- MOORE, M.N. (1988).- Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **46**, 81-89.
- MOORE, MN., ICARUS, A.J. & MCVEIGH, A. (2006a).- Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar. Environ. Res.*, **61**, 278-304.
- MOUGRAUD, Y., MARTINEZ, E., GEFFARD, A., ANDRAL, B., STANISIERE, JY. & AMIARD, J.C. (2002).- Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. *Biomarkers*, **7**, 479-490.
- MOULTON, C.A., FLEMING, W.J. & PURNELL, C.E. (1996).- Effects of two cholinesterase-inhibiting pesticides on freshwater mussels. *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, 131-137.
- NAJIMI, S., BOUHAIMI, S., DAUBEZE, M., ZEKHNINI, A., PELLERIN, J., NARBONNE, J.F. & MOUKRIM, A. (1997).- Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution of Agadir marine bay (South Morocco). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **58**, 901-912.
- PAMPANIN, D.M., VOLPATO, E., MARANGON, I. & NASCI, C. (2005).- Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice. Survival in air and condition index. *Comp. Biochem. Physiol.*, **140**, 41-52.
- PETROVIC, S., OZRETIC, B., KRAJNOVIC-OZRETIC, M. & BORBINAC, D. (2001).- Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) as biomarkers in a field study. *Mar. Pollut. Bull.*, **42** (12), 1373-1378.
- RANK, J., LEHTONEN, K.K., STRAND, J. & LAURSEN, M. (2007).- DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquat. Toxicol.*, **84** (1), 50-61.
- ROMEO, M., FRASILA, C., GNASSIA-BARELLI, M., DAMIENS, G., MIEU, D. & MUSTATA, G. (2005).- Biomonitoring of trace metals in the Black Sea (Romania) using mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Water Res.*, **39** (4), 596-604.

Variation saisonnière des effets des polluants chez la moule

- SEED, R. (1975).- Reproduction in *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Bivalvia) in European waters. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, **39**, 317-334.
- STIEN, X., PERCIC, P., GNASSIA-BARELLI, M., ROMEO, M. & LAFURIE, M. (1998).-Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean sea. *Environ. Pollut.*, **99**, 339-345.
- TALEB, Z.M., BENALI, I., GUERRAS, H., YKHLEF-ALLAL, A., BACHIR-BOUIDJRA, B., AMIARD, J.C. & BOUTIBA, Z. (2009).- Biomonitoring of environmental pollution on the algerian west coast using caged mussels. *Oceanologia*, **51** (1), 63-84.
- TIM-TIM, A.L.S., MORGADO, F., MOREIRA, S., RANGEL, R., NOGUEIRA, A.J.A. & SOARES, A.M. (2009).- Cholinesterase and glutathione S-transferase activities of three mollusc species from the NW Portuguese coast in relation to the Prestige oil spill. *Chemosphere*, **77**, 1465-1472.
- UNEP/RAMOGÉ (1999).- *Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme*. UNEP, Athens, Greece.
- VIARENGO, A. & NOTT, J.A. (1993).- Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, **104**, 355-372.
- VIARENGO, A. (1985).- Biochemical effects of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.*, **16**, 153-158.
- VIARENGO, A., BURLANDO, B., DONDERO, F., MARRO, A. & FABBRI, R. (1999).-Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers*, **6**, 455-466.
- VIARENGO, A., CANESI, L., PERTICA, M., MARCINELLI, G., ACCOMANDO, R., SMAAL, A.C. & ORUNESU, M. (1995).- Stress on stress response: a simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Mar. Environ. Res.*, **39**, 245-248.
- VIARENGO, A., LOWE, D., BOLOGNESI, C., FABBRI, E. & KOEHLER, A. (2007).- The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C, Toxicol. Pharmacol.*, **146**, 281-300.
- VIARENGO, A., MOORE, M.N., MANCINELLI, G., MAZZUCOTELLI, A., PIPE, R.K. & FARRAR, S.V. (1987).- Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Marine Biology*, **94**, 251-257.
- VIARENGO, A., PONZANO, E., DONDERO, F. & FABBRI, R. (1997).- A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.*, **44**, 69-84.

(reçu le 28/02/2017 ; accepté le 09/09/2017)

mis en ligne le 07/02/2018