

Mesure de deux biomarqueurs catalase et malondialdéhyde chez *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Bivalvia) suite à une contamination aiguë par *Staphylococcus aureus*

Measurements of two biomarkers catalase and malondialdehyde in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Bivalvia) following acute contamination by *Staphylococcus aureus*

Djamel BENDJOURI^{1*}, Fayza ZOUAOUT¹, Mohamed BRAHIM ERRAHMANI²,
Kamel BENDJEDDOU³ & Nadia CHEKIR⁴

1. Laboratoire de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Blida 1, 09000 Blida, Algérie
*(univers.bd@hotmail.fr).

2. Faculté des Sciences, Département de Chimie, Université Blida 1, 09000 Blida, Algérie *(m.brahim.errahmani@univ-blida.dz).

3. Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Béjaïa, 06000, Algérie.

4. Unité de Développement des Equipements Solaires de Bou-Ismaïl, UDES Tipaza, Algérie.

Résumé. Des essais écotoxicologiques utilisant des biomarqueurs ont été effectués chez deux espèces tests de Mytilidae *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis*. Pour l'évaluation des effets de la pollution bactériologique des eaux marines, les réponses biologiques malondialdéhyde (MDA), catalase (CAT) et les teneurs en protéines ont été déterminées avec une série de contaminations et de décontaminations aiguës pendant 3 jours par trois concentrations de *Staphylococcus aureus* (5.10^2 , 5.10^3 et 5.10^4 bactéries.l⁻¹) au vu de son implication dans la contamination des fruits de mer et afin d'évaluer l'effet des contaminants bactériologiques sur nos biomarqueurs. Une nette diminution du MDA est enregistrée au cours du cycle de contamination chez *P. perna*, alors que le passage en décontamination a permis d'obtenir des teneurs comparables entre les témoins et les individus tests. Une perturbation significative de l'activité catalase est enregistrée chez les deux espèces dès 24h d'exposition à 5.10^3 et 5.10^4 bactéries.l⁻¹ et après 72 h de contamination à 5.10^2 bactéries.l⁻¹. Nos résultats suggèrent que l'activité catalase peut être un outil potentiel pour la surveillance de la contamination bactérienne due à *S. aureus*. Ainsi, ces deux mollusques semblent refléter l'état de leur environnement et peuvent être utilisés dans la biosurveillance des eaux marines vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Mots-clés : Biomarqueurs, *Mytilus galloprovincialis*, *Perna perna*, *Staphylococcus aureus*.

Abstract. Ecotoxicological tests using biomarkers were made with two species of Mytilidae *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis*. To estimate the effects of the bacteriological pollution of marine waters, the biological answers malondialdehyde (MDA), catalase (CAT) and protein contents were determined with a series of acute contaminations and decontaminations during 3 days using three concentrations of *Staphylococcus aureus* (5.10^2 , 5.10^3 and 5.10^4 bacteria.l⁻¹) because of its implication in seafood contamination and outbreaks. A net decrease of the MDA is recorded during the cycle of contamination with *P. perna*, whereas the passage in the decontamination allowed us to obtain comparable contents between experimental and control groups. For both species, a significant disturbance of the catalase activity is registered from 24 hours of exposure in 5.10^3 and 5.10^4 bacteria.l⁻¹ and after 72 hours of contamination in 5.10^2 bacteria.l⁻¹. Our results suggest that the catalase activity can be a potential tool for the monitoring of the bacterial contamination due to *S. aureus*. So, these two mollusks seem to reflect the state of their environment and can be used in the biomonitoring of marine waters towards *S. aureus*.

Keywords : Biomarkers, *Mytilus galloprovincialis*, *Perna perna*, *Staphylococcus aureus*.

Abridged English version

This study is an approach of monitoring bacterial pollution through the use of molecular biomarkers. The objectives are the analysis of the reliability and effectiveness of catalase and MDA in bivalve molluscs in the prevention of risks related to bacterial contamination of the marine environment and their possible use in monitoring programs. The experiments were conducted at Ain-Tagourait (36°36' N, 2°37' E), at the Aquaculture Farm Laboratory in Bou Ismaïl bay (40 kms west of Algiers). The two species were *Perna perna* mussels (n=90) and *Mytilus galloprovincialis* (n=77). The mussels were placed

in polystyrene trays for an acclimatization phase (11 mussels/tray for 15 days), with a daily change of the water. The contamination test is then accomplished using *Staphylococcus aureus* for three days in G1 group (5.10^2 bacteria l⁻¹), G2 group (5.10^3 bacteria.l⁻¹) and G3 group (5.10^4 bacteria.l⁻¹) in presence of a control group. The *S. aureus* solutions were prepared with reference to the technical standardization of the inoculum (Joffin & Leyral, 2006). The contamination was renewed with each seawater change then the contaminated individuals (3 to 4) were taken for protein assay, MDA and catalase activity. The mussels were then transferred in a clean water for a 3 days decontamination phase. The changes in proteins levels,

MDA and catalase were measured after 24h and 72h of contamination, then after 72 h of decontamination. Any lethal effect was observed on the test organisms. The ANOVA tests showed that the average concentrations of proteins in the three groups exposed to *S. aureus* were found comparable. Significant differences in MDA levels appeared for *M. galloprovincialis* for G2 group [F(2,6)=5.65, p=0.042] and G3 group [F(2,6)=7.18, p=0.026]. Furthermore, in *P. perna*, the MDA concentrations were comparable in the 3 groups. The catalase activity of *P. perna* were significantly lower after 24 h of contamination for G2 and G3 groups compared to control group (Mann-Whitney test, p=0.021 and 0.001 respectively) and those of G3 group fell sharply after 72 h (p<0.001), yet there was an upturn in the G3 group. During the decontamination phase, the catalase activity was significantly lower for G1 and G2 groups (p=0.04 and p<0.001 respectively) but was still comparable to that of the control group for the G3 group, which was the most highly contaminated (p=0.54). Unlike *P. perna*, the *M. galloprovincialis* enzyme activity showed a significant induction after 24 h for the G2 and G3 groups (p<0.05), and after 72 h for the G1 group with strengthening of the other two groups (p<0.01). A decrease in catalase activity was meanwhile observed after the transfer of organisms in a clean water (after 72 h of decontamination). The induction of MDA observed in these mussels after 24 h was the witness of stress at the cellular level, probably resulting from changes in the environment by bacterial contamination of seawater. The decrease in this biomarker recorded after 72 h could be a sign of greater injury in pro-oxidant conditions. As MDA seems to be exceeded, the antioxidant defense of the mollusc was probably achieved by other enzymes such as glutathione S-transferase (Belabed & Soltani 2013) and catalase which had a very important role in the protection of aquatic invertebrates (Valavanadis *et al.* 2006). A significant induction of MDA in different tissues of clam exposed to cadmium solutions has been reported by Khebbab *et al.* (2010). Soltani *et al.* (2012) also noted an induction of MDA in the clam *Donax*

trunculus taken from contaminated site (Annaba gulf, Algeria). The catalase response in *P. perna* was found sensitive to inhibition in water contaminated by *S. aureus* (p<0.05). Inhibitions of catalase activity in bioindicators, following a disturbance in the marine environment by the presence of chemical contaminants (copper, cadmium, uranium) have been reported (Varanka *et al.* 2001; Company *et al.* 2004, Barillet 2007, Bouraoui-Gharbi *et al.* 2008). The significant induction of the catalase enzyme noted in *M. galloprovincialis* showed the importance of the time exposure in the expression of the responses of organism's tests against contaminants. Regarding the retained concentrations of *S. aureus*, a 24 h period seemed to be insufficient to cause an induction or an inhibition in catalase activity. Moreover, the prolongation of the exposure time (72 h) had led to different responses, characterized by induction in *M. galloprovincialis* and inhibition in *P. perna*. The induction of catalase activity may be attributed to elevated levels of exogenous hydrogen peroxide which is the main precursor of hydroxyl radicals and which is a highly toxic and reactive form of reactive oxygen species ROS (Amira *et al.* 2011). In this work, the two antagonistic responses of the two species showed the difficulty of interpreting the responses for a single biomarker, and the need of multimarker approach (Lagadic *et al.* 1997, Nesto *et al.* 2004, Pelletier *et al.* 2004). The return of catalase activities to their initial level after decontamination test illustrated the adaptability of molluscs responses, which allows us to qualify them as good bioindicators. The catalase seems to adapt to environment changes, which make us think that this biomarker may be used to monitor microbial pollution. The use of biomarkers as an additional contribution of routine bacteriological analysis seems necessary in the monitoring of the good quality of seawater, the safety of fruits, which are derived as well as the health of consumers. Beyond their commercial importance, *M. galloprovincialis* and *P. perna* are of particular ecological interest and could be used in monitoring programs of the Mediterranean coasts.

INTRODUCTION

Les problèmes en matière d'environnement sont associés à des érosions côtières et aux rejets de contaminants qui pourraient menacer des écosystèmes entiers (Galloway 2006, Fleming *et al.* 2006). Le milieu aquatique est menacé par les diverses activités humaines (Ali & Sreekrishnan 2001, Varanka *et al.* 2001) qui mettent en danger la santé des organismes vivants (Galloway *et al.* 2001, Paul-Pont *et al.* 2010) par les fortes concentrations de produits chimiques mesurées souvent en zone littorale et anthropisée (Galloway *et al.* 2006, Verlecar *et al.* 2006). De plus, la présence de micro-organismes pathogènes peut constituer un risque sanitaire lors de la baignade ou de la consommation de coquillages (Brisou 1968, Fleming *et al.* 2006, Amagliani *et al.* 2012). Les agents biologiques impliqués dans la contamination des fruits de mer, comme les bactéries, les virus et les parasites tels que les *Vibrio*, *Salmonella*, *Clostridium botulinum* type E, les helminthes, Enterovirus, Adenovirus, *Cryptosporidium*, et *Giardia*

peuvent causer des maladies allant d'une gastro-entérite bénigne à des maladies mortelles (Wallace *et al.* 1999, Gourmelon *et al.* 2010, Amagliani *et al.* 2012, Oliveira *et al.* 2011).

Traditionnellement, les mesures des concentrations des contaminants chimiques et bactériologiques font appel à des techniques analytiques sophistiquées et coûteuses. (Chapman & Long 1983, Lagadic *et al.* 1998, Fleming *et al.* 2006, Galloway *et al.* 2006). Ainsi, la nécessité de détecter et de surveiller les effets des contaminants, particulièrement ceux présents à de faibles teneurs, a abouti au développement des biomarqueurs (Flammarion *et al.* 2000, Richardson *et al.* 2008, Lam 2009). Ces marqueurs moléculaires sont mesurés chez des organismes sentinelles comme compléments d'analyses chimiques (Lagadic *et al.* 1998, Orbea *et al.* 2002, Galloway 2006, De La Torre *et al.* 2007, Bessi & El Alami 2009) et sont couramment utilisés dans les programmes de biosurveillance (Amiard & Amiard-Triquet 2008, Hernández-Moreno *et al.* 2010,

Buffet *et al.* 2011). Les biomarqueurs fournissent des signaux d'alarmes précoces sur les effets biologiques des contaminants, d'où leur utilisation à titre indicatif et préventif d'une exposition et/ou d'effets des xénobiotiques (Valavanidis *et al.* 2006, Bocchetti *et al.* 2008, Lam 2009, Vidal-Liñán *et al.* 2010, Schvezov *et al.* 2011).

Les organismes aquatiques ont développé des mécanismes de défense antioxydants enzymatiques comme la super oxyde dismutase (SOD) ou la catalase, et non enzymatiques tels que le glutathion, l'acide urique et la bilirubine (Almeida *et al.* 2004, Vlahogianni *et al.* 2007, Amiard & Amiard-Triquet 2008). La fonction de l'activité catalase est l'élimination du peroxyde d'hydrogène produit chez les organismes aérobies (Dellali *et al.* 2001). En parallèle, le malondialdéhyde (MDA) considéré comme produit de peroxydation lipidique, a été largement utilisé pour évaluer les effets de divers polluants sur les écosystèmes aquatiques (Almeida *et al.* 2004, Narbonne *et al.* 2005, Company *et al.* 2008, Hernández-Moreno *et al.* 2010, Wu *et al.* 2011). Parmi les organismes présents dans ces milieux, en général, les Mytilidae sont de bons bioindicateurs (Almeida *et al.* 2004, Andral *et al.* 2004, Vlahogianni *et al.* 2007, Vidal-Liñán *et al.* 2010) en raison de leurs caractères sédentaires et euryhalins ; ils sont faciles à collecter et se nourrissent par filtration ce qui leur permet de concentrer de grandes teneurs de polluants (Nicholson 2003, Casas 2005, Khessiba *et al.* 2005, Mamaca *et al.* 2005, Rajalakshmi *et al.* 2005, Borkovic *et al.* 2005, Nesto *et al.* 2007).

Les travaux relatifs à la surveillance de la contamination des eaux marines sont très bien documentés (Orbea *et al.* 2002, Verlecar *et al.* 2008, Attig *et al.* 2010, Belabed & Soltani 2013), mais la majorité des études traitent surtout de la contamination chimique (Roméo *et al.* 1997, Regoli *et al.* 2002, Nicholson 2003, Franco *et al.* 2006, Petes *et al.* 2007, Boyd 2010). C'est dans ce sens que nous nous sommes intéressés à l'emploi de l'activité de la catalase et du MDA chez les mollusques bivalves à savoir *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) et *Perna perna* (Linné 1758). Cette étude est une approche à la surveillance de la pollution bactériologique par le recours aux biomarqueurs moléculaires. Les objectifs visent l'analyse de la fiabilité et de l'efficacité de la catalase et du MDA dans la prévention des risques liés à la contamination bactériologique du milieu marin et de leur éventuelle utilisation dans les programmes de surveillance.

MATERIEL ET METHODES

Présentation de la région d'étude et échantillonnage

Cette étude est réalisée à Ain-Tagourait (36°36' N; 2°37' E), à la ferme aquacole «EAM» en baie de Bou-Ismaïl, qui se situe à 40 km à l'Ouest du littoral algérois. Cette zone est connue pour son climat doux et tempéré durant l'été et l'hiver, elle est considérée comme un site de référence au vu de la bonne qualité bactériologique de son eau de mer et des moules qu'elle abrite (Fabbri 2006). La température moyenne y est de $24,8 \pm 2,5$ °C (18-26,5 °C) pour une salinité moyenne de 36,3‰.

Les deux espèces de moules sont *Perna perna*, ramenées

du commerce et *Mytilus galloprovincialis* provenant de la ferme aquacole, avec respectivement 90 et 77 individus de même classe de tailles ($51,76 \pm 3,51$ et $51,94 \pm 3,19$ mm) pour éviter d'éventuelles variabilités individuelles.

Test de contamination

L'expérimentation s'est étalée sur 3 mois allant de mai à juillet 2011. Une phase de purification de l'espèce *P. perna*, qui présentait un taux de mortalité après son achat du commerce, a été réalisée. Cette mortalité peut être expliquée par l'origine des mollusques qui sont collectés dans des zones non salubres ainsi que par les mauvaises conditions de conservation lors du transport de ces mollusques pour leur commercialisation. La purification consiste à placer les individus tests dans une eau de mer de bonne qualité physicochimique et bactériologique et à la renouveler au quotidien jusqu'à n'avoir aucune mortalité (3 semaines).

Une phase d'acclimatation pendant 15 jours consiste à placer les moules dans des bacs d'élevage en polystyrène (36 cm x 24 cm x 17 cm) achetés du commerce contenant 10 l d'eau de mer, à raison de 11 individus par bac, avec un changement au quotidien de cette eau. Un test de contamination des deux mollusques est ensuite accompli par *Staphylococcus aureus* pendant trois jours dans trois groupes aux concentrations respectives de 5.10^2 , 5.10^3 et 5.10^4 bactéries.l⁻¹ en présence d'un groupe témoin. Les solutions de *S. aureus* sont préparées en se référant à la technique de standardisation de l'inoculum (Joffin & Leyral 2006). La contamination est renouvelée avec chaque changement d'eau de mer. Les individus contaminés (3 à 4) sont prélevés et transférés au laboratoire de l'Unité de Développement des Équipements Solaires de Bou-Ismaïl (UDES) pour un dosage des protéines, du MDA et de l'activité catalase. Il s'ensuit une décontamination de 3 jours par un transfert de ces moules dans une eau non contaminée. Les deux biomarqueurs étudiés sont à nouveau mesurés afin de comparer les deux tests de toxicité.

Procédure biochimique

Après dissection des moules, les branchies sont prélevées et homogénéisées en pool dans une solution tampon Tris (20 mM, pH=7,8), puis centrifugées à 10000 g pendant 10 min. Le surnageant S9 obtenu est utilisé pour les dosages ultérieurs des protéines, de la catalase et du MDA. Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) et la peroxydation des lipides selon celle de Draper & Hadley (1990).

L'activité catalase est la mesure de la quantité d'enzyme active dans une préparation d'un mélange de 100 µl de fraction S9 et de 2,6 ml du substrat (200 µl de solution de H₂O₂ à 30 %; 2,4 ml de tampon phosphate 75 mM à pH=7).

La cinétique de décomposition du peroxyde d'hydrogène est suivie à une longueur d'onde de 280 nm pendant 2 min. L'activité de la catalase est exprimée en unité internationale/mg de protéines. Chaque mesure est basée sur 3 essais successifs.

Analyse statistique

Les mollusques ont été exposés à trois concentrations de *Staphylococcus aureus* (5.10^2 , 5.10^3 et 5.10^4 bactéries.l⁻¹).

Les variations des protéines, du MDA et de la catalase ont ensuite été mesurées après 24h et 72h de contamination, puis après 72 h de décontamination. Des tests de Shapiro Wilk ont permis de tester la normalité des échantillons, l'homogénéité des variances a été vérifiée par des tests de Levène.

Les moyennes ont été comparées soit par ANOVA simple à 1 facteur, soit par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis lors d'écartés sévères à la normalité ou à l'homogénéité des variances.

Les groupes ayant présenté des différences significatives ont été mis en évidence par des tests post hoc de Tukey, ou des tests de comparaison des moyennes de Mann-Whitney. Les résultats sont exprimés sous forme $\bar{x} \pm ES$ (ES= erreur standard sur la moyenne). L'analyse statistique a été établie sur Statistica 7.0 de Statsoft Inc, Tulsa, USA et «SPSS 15.0 for Windows» SPSS Inc., Chicago, Illinois.

RESULTATS

Aucune des concentrations testées n'a eu un effet léthal sur les organismes tests, ces concentrations semblent être très faibles pour produire une létalité observable.

Protéines

Aucun effet n'a pu être observé pour les concentrations moyennes des protéines dans les trois groupes à 5.10^2 , 5.10^3 et 5.10^4 bactéries.l⁻¹ exposés à *S. aureus*. Ces teneurs moyennes sont comparables pour *Perna perna* (Tab. 1) à 24h [test de Kruskal-Wallis H (3,n=8)=6,00 ; p=0,112], à 72h [H(3,n=8)=4,67 ; p=0,198] et à 72h de décontamination [H(3,n=8)=6,17 ; p=0,104]. Nous avons les mêmes constatations pour *Mytilus galloprovincialis* à 24h [H(3,n=8)=2,83 ; p=0,418], à 72h [H(3,n=8)=2,17 ; p=0,539] et à 72h de décontamination [H(3,n=8)=0,63 ; p=0,889].

Tableau 1. Teneurs branchiales en protéines ($\bar{x} \pm ES$ en mg.ml⁻¹) chez *P. perna* et *M. galloprovincialis* exposées à diverses concentrations (en bactéries.l⁻¹) de *S. aureus*.

Table 1. Branchial proteins contents ($\bar{x} \pm ES$ of mg.ml⁻¹) in *P. perna* and *M. galloprovincialis* exposed to diverse concentrations (bacterial.l⁻¹) of *S. aureus*.

| | | Témoin | 5.10 ² bac.l ⁻¹ | 5.10 ³ bac.l ⁻¹ | 5.10 ⁴ bac.l ⁻¹ | p |
|----------------------------------|--------------------|-----------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------|
| <i>Perna perna</i> | 24 h | 1,28±0,07 | 5,69±0,87 | 4,16±0,03 | 5,50±0,57 | 0,112 |
| | 72 h | 1,28±0,07 | 4,91±0,68 | 5,26±0,95 | 4,40±0,28 | 0,198 |
| | En décontamination | 1,28±0,07 | 4,48±0,39 | 3,45±0,29 | 4,01±0,34 | 0,104 |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | 24 h | 4,97±1,33 | 5,04±0,61 | 3,04±1,01 | 4,85±0,32 | 0,418 |
| | 72 h | 4,97±1,33 | 3,68±1,00 | 3,34±0,29 | 3,85±0,43 | 0,539 |
| | En décontamination | 4,97±1,33 | 3,95±0,38 | 4,18±0,08 | 4,52±0,42 | 0,889 |

Malondialdéhyde (MDA)

Aucune variation significative des moyennes du MDA pour *M. galloprovincialis* n'a pu être observée entre les différents groupes (témoin, 5.10^2 , 5.10^3 et 5.10^4 bactéries.l⁻¹) à 24 h [tests ANOVA, F(3,8)=2,03 ; p=0,188], à 72 h [F(3,8)=2,01 ; p=0,191] et à 72 h de décontamination [F(3,8)=1,13 ; p=0,395]. Ces concentrations moyennes pour le groupe à 500 bactéries.l⁻¹ de *S. aureus* (Tab. 2) restent comparables durant toute la durée de l'expérimentation [F(2,6)=2,68 ; p=0,148]. Des différences significatives apparaissent cependant pour les groupes à 5.10^3 bactéries.l⁻¹ [F(2,6)=5,65 ; p=0,042] et 5.10^4 bactéries.l⁻¹ [F(2,6)=7,18 ; p=0,026]. Les tests post-hoc mettent en évidence les diminutions significatives de ces teneurs en période de décontamination par rapport à celles constatées à 24h de contamination. Dans le groupe à 5.10^3 bactéries.l⁻¹, la teneur chute de 279,4 à 49,1 nmol.mg⁻¹ de protéines et une baisse similaire est observée pour le groupe à 5.10^4 bactéries.l⁻¹ avec une chute de 189,1 à 58,1 nmol.mg⁻¹ de protéines.

Par ailleurs, chez *P. perna*, les concentrations moyennes de MDA sont comparables pour les 3 groupes à 24h de contamination [F(2,6)=0,75 ; p=0,51], à 72h de contamination [F(2,6)=0,73 ; p=0,52] et en décontamination [F(2,6)=0,17 ; p=0,85]. Cependant, une différence significative est notée (Tab. 3) entre le groupe témoin et ces trois groupes à 24h [F(3,8)=17,76 ; p<0,001] et à 72h

[F(3,8)=10,30 ; p=0,004]. Cette différence s'estompe après 72h de décontamination [F(3,8)=0,39 ; p=0,76] où la teneur du MDA s'effondre dans le groupe témoin.

Tableau 2. Teneurs branchiales en MDA ($\bar{x} \pm ES$ en nmol.mg⁻¹ de protéines) chez *M. galloprovincialis* suite à sa contamination par *S. aureus* à diverses concentrations (en bactéries.l⁻¹). En ligne, des lettres différentes en exposant mettent en évidence des groupes significativement différents (p<0,05).

Table 2. Branchial MDA contents ($\bar{x} \pm ES$ nmol.mg⁻¹ of proteins) in *M. galloprovincialis* following its contamination by *S. aureus* at diverse concentrations (bacterial.l⁻¹). In rows, different letters in superscript indicate groups with significant differences (p<0.05).

| | 24 h | 72 h | En décontamination | p |
|---------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|-------|
| Témoin | 85,2±15,6 | 85,2±15,6 | 85,2±15,6 | |
| 500 bac.l ⁻¹ | 193,3±57,7 | 126,5±11,4 | 81,7±8,7 | 0,148 |
| 5000 bac.l ⁻¹ | 279,4±86,0 ^a | 77,2±20,8 ^{a,b} | 49,1±23,6 ^b | 0,042 |
| 50000 bac.l ⁻¹ | 189,1±38,1 ^a | 104,4±12,4 ^{a,b} | 58,1±15,3 ^b | 0,026 |

Tableau 3. Teneurs branchiales en MDA ($\bar{x} \pm ES$ en nmol.mg^{-1} de protéines) chez *Perna perna* suite à sa contamination par *S. aureus* à diverses concentrations (en bactéries.l⁻¹). En ligne, des lettres différentes en exposant mettent en évidence des groupes significativement différents ($p < 0,05$).

Table 3. Branchial MDA contents ($\bar{x} \pm ES$ nmol.mg^{-1} of proteins) in *Perna perna* following its contamination by *S. aureus* at diverse concentrations (bacterial.l⁻¹). In rows, different letters in superscript indicate groups with significant differences ($p < 0,05$).

| | Témoin | 500 bac.l ⁻¹ | 5000 bac.l ⁻¹ | 50000 bac.l ⁻¹ | P |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------|
| 24 h | 449,2±74,2 ^a | 121,2±18,6 ^b | 110,6±21,7 ^b | 88,3±17,9 ^b | <0,001 |
| 72 h | 449,2±74,2 ^a | 122,1±16,3 ^b | 168,9±37,2 ^b | 171,2±38,7 ^b | 0,004 |
| En décontamination | 144,2±37,1 | 198,8±77,4 | 266,9±115,7 | 207,0±71,1 | 0,76 |

Activité catalase

Les activités enzymatiques de *P. perna* (Fig. 1) sont significativement plus basses après 24 h pour les groupes à 5.10^3 et 5.10^4 bactéries.l⁻¹ par rapport au témoin (tests de Mann-Whitney ; $p=0,021$ et $0,001$ respectivement). Celle du groupe à 5.10^4 bactéries.l⁻¹ chute après 72 h ($p < 0,001$) mais on observe cependant une reprise d'activité du groupe à 5.10^4 bactéries.l⁻¹. En période de décontamination, l'activité catalase reste significativement plus basse pour les groupes à 5.10^2 et 5.10^3 bactéries.l⁻¹ ($p=0,04$ et $p < 0,001$ respectivement) mais est toujours comparable à celle du témoin pour le groupe à 5.10^4 bactéries.l⁻¹ qui reste le plus fortement contaminé ($p=0,54$).

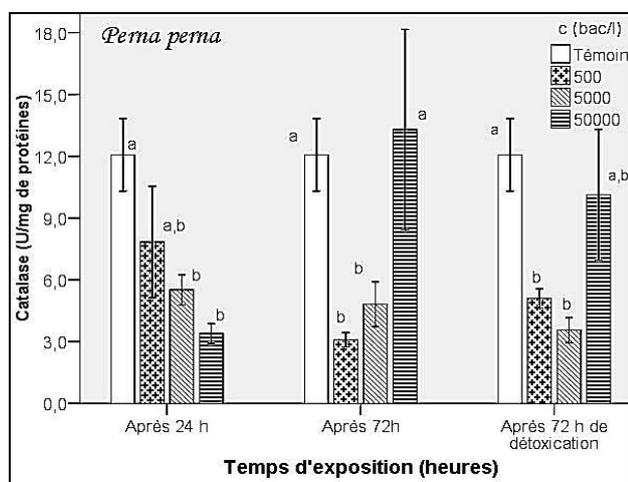


Figure 1. Variation de la réponse catalase en fonction de la concentration de *S. aureus* chez *Perna perna* pour les 3 périodes de l'expérimentation (U : $\Delta A/\text{min}/\text{mg}$ de protéines)

Figure 1. Variation of the catalase response according to the concentration of *S. aureus* in *Perna perna* for the three periods of the experiment (U : $\Delta A/\text{min}/\text{mg}$ of proteins)

Contrairement à *Perna perna*, l'activité enzymatique de *Mytilus galloprovincialis* (Fig. 2) connaît une induction significative après 24 h pour les groupes à 5.10^3 et 5.10^4 bactéries.l⁻¹ ($p < 0,05$) puis après 72 h pour le groupe à 5.10^2 bactéries.l⁻¹ avec renforcement des deux autres groupes ($p < 0,01$). Une diminution des activités catalase est cependant enregistrée après transfert des organismes dans une eau sans contaminant (après 72h de décontamination); ces activités restant toutefois significativement plus élevées que celles du témoin.

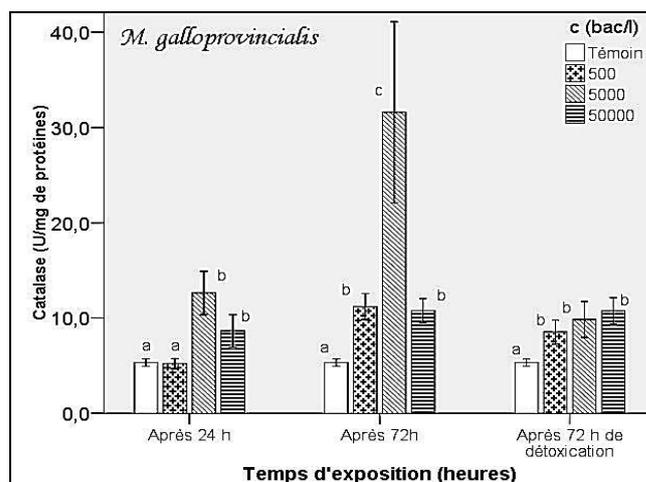


Figure 2. Variation de la réponse catalase en fonction de la concentration de *S. aureus* chez *Mytilus galloprovincialis* pour les 3 périodes de l'expérimentation (U : $\Delta A/\text{min}/\text{mg}$ de protéines)

Figure 2. Variation of the catalase response according to the concentration of *S. aureus* in *Mytilus galloprovincialis* for the three periods of the experiment (U : $\Delta A/\text{min}/\text{mg}$ of proteins)

DISCUSSION ET CONCLUSION

Protéines

Pendant les cycles de contamination et de décontamination, nous avons été confrontés à de fortes fluctuations des teneurs en protéines mais sans qu'aucune différence significative n'ait pu être mise en évidence chez les deux espèces de *Mytilidae* exposées aux trois concentrations de *S. aureus*. Il semble que les réserves protéiques de ces organismes ne sont pas perturbées par ces contaminants bactériens de l'eau de mer mais cela pourrait être aussi dû à la durée d'exposition qui est très courte (3 jours) pour pouvoir engendrer une perturbation mesurable.

Dans une localité de la mer Adriatique, les mêmes constatations ont été rapportées par Borkovic *et al.* (2005) chez *Mytilus galloprovincialis* prélevée dans cette région connue par sa forte pollution anthropologique. En revanche, Khebbab *et al.* (2010) ont observé une augmentation significative des réserves protéiques en fonction des concentrations du cadmium testées chez le bivalve *Ruditapes decussatus* contaminé pendant une durée de 21 jours. Plusieurs travaux portent sur les teneurs en

protéines non comme biomarqueur, mais pour l'expression des teneurs des activités enzymatiques comme la CAT, la SOD, la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion S-transférase (GST) (Almeida *et al.* 2004, Attig *et al.* 2010, Buffet *et al.* 2011, Soltani *et al.* 2012).

Malondialdéhyde (MDA)

Les organismes aquatiques, en particulier les bivalves marins présentent une variabilité des défenses antioxydantes après exposition aux polluants à potentiel oxydatif (Lam 2009).

L'induction du MDA notée chez la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* après 24h témoigne d'un stress au niveau cellulaire résultant probablement des changements apportés dans le milieu par une contamination bactérienne de l'eau de mer. La diminution de ce biomarqueur enregistrée par la suite (après 72 h) peut être un signe de dommage plus important dans les conditions pro-oxydantes. Comme le MDA semble être dépassé, la défense antioxydante du mollusque est probablement assurée par d'autres enzymes telles que la glutathion S-transférase (Belabed & Soltani 2013) et la catalase qui présentent un rôle très important dans la protection des invertébrés aquatiques (Valavanadis *et al.* 2006).

La différence des teneurs MDA notée entre les cycles de contamination et de décontamination s'estompe sans disparaître totalement dès le transfert des spécimens tests dans une eau non contaminée.

Les études relatives aux réponses du biomarqueur MDA en présence de contaminants bactériologiques n'ont pas été abordées. Cependant de nombreux auteurs notent que la peroxydation lipidique semble être modulée par les contaminants chimiques et organiques testés en condition de laboratoire ou *in situ* (Narbonne *et al.* 2005). Aussi, une induction significative du MDA dans différents tissus de palourde exposée à des solutions de cadmium a été rapportée par Khebbeb *et al.* (2010). Soltani *et al.* (2012) ont noté aussi une induction du MDA chez la palourde *Donax trunculus* prélevée d'un site connu par sa contamination de nature domestique et industrielle dans le golf d'Annaba dans l'est algérien.

Par ailleurs, une multiplication bactérienne favorisée par l'augmentation des températures peut être à l'origine d'un stress environnemental et des variations des teneurs en MDA. Les études portant sur l'effet d'une contamination bactériologique sur les réponses biomarqueurs des espèces sentinelles ne figurent pas dans la littérature d'où l'intérêt que nous avons porté aux contaminants bactériologiques. La surveillance de qualité des eaux marines passe aussi par la surveillance de sa contamination microbiologique.

Activité catalase

La réponse catalase chez *Perna perna* s'est avérée sensible à l'inhibition en présence de *S. aureus* dans l'eau ($p < 0,05$). Des inhibitions de l'activité catalase chez les bioindicateurs, suite à une perturbation du milieu marin par la présence de contaminants chimiques (cuivre, cadmium, uranium), ont été rapportées par plusieurs auteurs (Varanka *et al.* 2001, Company *et al.* 2004, Barillet 2007, Gharbi-Bourouai *et al.* 2008). La non spécificité d'un biomarqueur

comme la catalase empêche d'identifier la véritable cause des réponses enzymatiques, cependant cette inhibition peut être due à un stress microbien d'après Gharbi-Bourouai *et al.* (2008). En effet, dans leur travaux, une inhibition de l'activité catalase chez le mollusque *Murex trunculus* correspondait à un niveau de stress oxydatif élevé dû à une croissance bactérienne importante faisant suite à l'élévation de température (30°C) de juin à juillet.

Les inductions significatives de l'enzyme catalase notées chez *M. galloprovincialis* montrent l'importance de la durée d'exposition dans l'expression des réponses des organismes tests vis-à-vis des contaminants. En effet, des concentrations à effet non mesurable peuvent devenir néfastes et produisent des lésions moléculaires et des perturbations métaboliques chez les espèces bioindicatrices. Ainsi, des variations temporelles de l'activité catalase chez *Donax trunculus* (Amira *et al.* 2011) et des biomarqueurs acétylcholinestérase et du Glutathion S-Transférase chez la même espèce (Belabed & Soltani 2013) ont été rapportées. Aussi, l'activité catalase peut varier selon le niveau et la durée d'exposition aux contaminants (Amira *et al.* 2011).

En ce qui concerne les concentrations de *S. aureus* choisies, une durée de 24 h se révèle insuffisante pour provoquer une induction ou une inhibition de l'activité catalase. Par ailleurs, le prolongement de la durée d'exposition (72 h) aboutit à des réponses différentes entre les deux espèces tests, caractérisées par une induction chez *M. galloprovincialis* et une inhibition chez *P. perna*.

L'induction de l'activité catalase peut être attribuée à l'élévation des teneurs en peroxyde d'hydrogène exogène qui représente le précurseur principal des radicaux hydroxyles, et qui est une forme très toxique et réactive des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Amira *et al.* 2011). Des cas similaires d'induction précoce de l'activité catalase ont été notées chez *Perna viridis* exposée aux contaminants organiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP) et organochlorés (OC) (Richardson *et al.* 2008) et chez *Bathylomodiolus azoricus* face aux contaminations métalliques (Hg, Cu) (Company *et al.* 2004, 2008). Très peu d'études traitent de l'interaction entre l'activité catalase et la contamination bactérienne chez les mollusques. Dans leurs travaux, Dellali *et al.* (2001, 2004) ont attribué l'augmentation des activités catalase à l'élévation de la flore fécale et à la présence des *Vibrionacea* ayant probablement induit un stress, ce qui a conduit à des réponses de la catalase. Ces germes se retrouvent dans le milieu environnant suite aux perturbations anthropiques, engendrées elles-mêmes par les rejets domestiques de la ville avoisinante, et l'augmentation des températures.

Dans le présent travail, les deux espèces de mollusques soumises aux mêmes conditions expérimentales ont eu deux réponses antagonistes. Ceci montre la difficulté d'interprétation des réponses d'un seul biomarqueur, et la nécessité de l'approche multimarqueurs (Lagadic *et al.* 1997, Nesto *et al.* 2004, Pelletier *et al.* 2004).

Les fluctuations de notre biomarqueur semblent refléter une perturbation du milieu marin. Ce biomarqueur employé dans les programmes de surveillance métallique semble être un outil potentiel pour la surveillance de la pollution bactériologique chez les organismes sentinelles.

Les réponses obtenues pour la catalase ont été relevées sous l'effet de *Staphylococcus aureus*. Néanmoins, il est connu que les différentes activités biologiques mesurées chez les bivalves sont étroitement influencées par les facteurs abiotiques du milieu environnant (Borkovic *et al.* 2005, Vlahogianni *et al.* 2007, Bocchetti *et al.* 2008, Gorbi *et al.* 2008, Verlecar *et al.* 2008, Pisanelli *et al.* 2009, Amira *et al.* 2011, Soltani *et al.* 2012).

Le retour des activités catalase à leur état initial après test de décontamination illustre la capacité d'adaptation des réponses des mollusques tenant compte de leur environnement, ce qui permet de les qualifier de bons bioindicateurs. Aussi, la catalase semble s'adapter aux variations apportées au milieu, ce qui nous laisse penser que ce biomarqueur peut être utilisé pour suivre la pollution microbienne.

Des études ultérieures traitant la réponse catalase à l'égard des autres contaminants bactériologiques doivent être menées pour une adoption de ce biomarqueur dans les outils de diagnostic de l'état de santé du milieu marin et pour la prédiction des risques écotoxicologiques.

L'utilisation des biomarqueurs catalase et MDA chez les deux moules choisies dans la présente étude est très intéressante dans la détection et la prédiction de la contamination bactériologique de l'eau de mer par *Staphylococcus aureus*.

Afin d'amoinrir les risques sanitaires liés à la consommation des fruits de mer ainsi que les pertes en production dues à la proximité entre fermes aquacoles et zones urbaines, le recours aux biomarqueurs comme une contribution additionnelle des analyses bactériologiques de routine est nécessaire pour maintenir une bonne qualité de l'eau de mer, la sécurité des fruits qui y sont issus ainsi que la santé des consommateurs.

Au-delà de leur importance commerciale, *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna* présentent un intérêt écologique particulier et pourraient être utilisées dans le cadre des programmes de surveillance des côtes méditerranéennes.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Mr. Nourreddine Soltani, professeur à l'Université d'Annaba pour l'évaluation critique du manuscrit ; Mr Lyes Tabet, chercheur Post Doctoral à l'Université de Montréal (Canada) ainsi que le professeur P.G.C. Campbell de l'INRS-Eau Terre et Environnement du Québec pour leur aide et leur appui en articles scientifiques.

Nous remercions également Mr. Nourredine Benyahia, enseignant chercheur à l'Université Blida 1 pour son aide et son apport dans l'identification de l'espèce *Perna perna*, Mr. Ahmed Benchabane, Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA) d'El Harrach et Mr. Abdelwahab Nouani, enseignant chercheur à l'Université de Boumerdès pour l'aide logistique en réactifs nécessaires aux expérimentations. Nos remerciements vont également à l'ensemble du personnel du Laboratoire du Froid, Epuration et Valorisation des Eaux de Rejets de l'UDES (Bou-Ismaïl) pour nous avoir permis de réaliser ces travaux dans les meilleures conditions possibles.

REFERENCES

- Ali M. & Sreekrishnan T.R. 2001. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Adv. Environ. Res.* 5, 175-196.
- Almeida E.A., Miyamoto S., Bainy A.C., Medeiros M.H.G. & 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, 386-392.
- Amagliani G., Brandi G. & Schiavano G.F. 2012. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. *Food Res. Int.* 45, 780-788
- Amiard J.C. & Amiard-Triquet C. 2008. *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Edition Tec et Doc, Lavoisier, 372 p.
- Amira A., Sifi K. & Soltani N. 2011. Measure of environmental stress biomarkers in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria). *Eur. J. Exp. Biol.* 1, 7-16.
- Andral B., Stanisiere J. Y., Sauzade D., Damier E., Thebault H., Galgani F. & Boissery P. 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 704-712.
- Attig H., Dagnino A., Negri A., Jebali J., Boussetta H., Viarengo A., Dondero F. & Banni M. 2010. Uptake and biochemical responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to sublethal nickel concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1712-1719.
- Barillet S. 2007. *Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (danio rerio)*. Th. Doct., Univ. Paul Verlaine Metz, 475 p.
- Belabed S. & Soltani N. 2013. Acute toxicity of cadmium on *Donax trunculus*: acetylcholinesterase, glutathione S-transferase activities and pattern of recovery. *Eur. J. Exp. Biol.*, 3, 54-61.
- Bessi H. & 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.
- Bocchetti R., Lamberti C.V., Pisanelli B., Razzetti E.M., Maggi C., Catalano B., Sesta G., Martuccio G., Gabellini M. & Regoli F. 2008. Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res.* 66, 24-26.
- Borković S.S., Šaponjić J.S., Pavlović S.Z., Blagojević D.P., Milošević S.M., Kovačević T.B., Radojičić R.M., Spasić M.B., Žikić R.V. & Saičić Z.S. 2005. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 14, 366-374.
- Boyd R.S. 2010. Heavy metal pollutants and chemical ecology: Exploring new frontiers. *J. Chem. Ecol.* 36, 46-58.
- Brisou J. 1968. La pollution microbienne, virale et parasitaire des eaux littorales et ses conséquences pour la santé publique. *Bull. Org. Mond. Santé* 38, 79-118.
- Buffet P-E., Tankoua O.F., Pan J-F., Berhanu D., Herrenknecht C., Poirier L., Amiard-Triquet C., Amiard J-C., Bérard J-B., Risso C., Guibolini M., Roméo M., Reip P., Valsami-Jones E. & Mouneyrac C. 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere* 84, 166-174.

- Casas S. 2005. *Modélisation de la bioaccumulation des métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule Mytilus galloprovincialis en milieu méditerranéen*. Thèse Doc. Univ. Sud, Toulon VAR, 314 p.
- Chapman P.M. & Long E.R., 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar. Poll. Bull.* 14, 81-84.
- Company R., Serafim A., Bebianno M.J., Cosson R., Shillito B. & Fiala-Médioni A. 2004. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Mar. Environ. Res.* 58, 377-381.
- Company R., Serafim A., Cosson R.P., Fiala-Médioni A., Camus L., Colaço A., Serrão-Santos R. & Bebianno M.J. 2008. Antioxidant biochemical responses to long-term copper exposure in *Bathymodiolus azoricus* from Menez-Gwen hydrothermal vent. *Sci. Totat Environ.* 389, 407 - 417.
- De la Torre F.R., Salibian A. & Ferrari L. 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere* 68, 1582- 1590
- Dellali M., Roméo M. & Aïssa P. 2001. Suivi de l'activité catalase des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. *Oceanol. Acta* 24, 263-271.
- Dellali M., Roméo M. Gnassia-Barelli M. & Aïssa P. 2004. A multivariate data analysis of the clam *Ruditapes decussatus* as sentinel organism of the bizerta lagoon (tunisia). *Water, Air, and Soil Pollution*, 156, 131-144.
- Draper H.H. & Hadley M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.* 186, 421-431.
- Flammarion P., Devaux A. & Garric J. 2000. Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Exemples d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire. *Bull. Fr. Pêche Pisc.* 357/358, 209-226.
- Fleming L.E., Broad K., Clement A., Dewailly E., Elmir S., Knapp A., Pomponi S.A., Smith S., Solo Gabriele H. & Walsh P. 2006. Oceans and human health: Emerging public health risks in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 545-560.
- Franco J. L., Trivella D.B.B., Trevisan R., Dinslaken D.F., Marques M.R.F., Bairy A.C.D. & Dafre A.L. 2006. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. *Chem. Biol. Interact* 160, 232-240.
- Galloway T. S. & Depledge M.H. 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevances. *Ecotoxicol.* 10, 5-23.
- Galloway T.S. 2006. Biomarkers in environmental and human health risk assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 606-613.
- Galloway T.S., Brown R.J., Browne M.A., Dissanayake A., Lowe D., Depledge M.H. & Jones M.B. 2006. The ECOMAN project: A novel approach to defining sustainable ecosystem function. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 186-194.
- Gharbi-Bouraoui S., Gnassia-Barelli M., Roméo M., Dellali M. & Aïssa P. 2008. Field study of metal concentrations and biomarker responses in the neogastropod *Murex trunculus*, from Bizerta Lagoon (Tunisia). *Aquat. Living Resour.* 21, 213-220.
- Gorbi S., Lamberti C.V., Notti A., Benedetti M., Fattorini D., Moltedo G. & Regoli F. 2008. An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res.* 65, 34-49.
- Gourmelon M., Lazure P., Hervio-Heath D., Le Saux J.C., Caprais M-P., Le Guyader F.S., Catherine M. & Pommepuy M. 2010. Microbial modelling in coastal environments and early warning systems: useful tools to limit shellfish microbial contamination. *In Safe Management of Shellfish and Harvest Waters*. G. Rees, K. Pond, D. Kay, J. Bartram and J. Santo Domingo (eds). London, UK, 297-318.
- Hernández-Moreno D., Soler F., Míguez M.P. & 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.
- Joffin J.N. & Leyral G. 2006. *Microbiologie technique - Tome 1, Dictionnaire des techniques*. Ed. CRDP d'Aquitaine, France, 368 p.
- Khebbeb M.E.H., Nadji S. & Amrani A. 2010. The effect of cadmium exposure on malondialdehyde and reduced glutathione concentrations in several tissues of a bivalve mollusc (*Ruditapes decussatus*) fished from Mellah lagoon (North East of Algeria). *Ann. Biol. Res.* 1, 166-173.
- Khessiba A., Roméo M. & Aïssa P. 2005. Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environ. Pollut.* 133, 257-281.
- Lagadic L., Caquet T. & Amiard J.C. 1997. Intérêt d'une approche multiparamétrique pour le suivi de la qualité de l'environnement. *In : Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. & Ramade F. (eds). Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*. Masson, Paris, 393-401.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J-C. & Ramade F. 1998. *Utilisation des Biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. Ed Tec & Doc Lavoisier, Paris, 320 p.
- Lam P.K.S. 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean and Coastal Management* 52, 348-354.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 266-275.
- Mamaca E., Bechmann R.K., Torgrimsen S., Aas E., Bjørnsta A., Baussant T. & Le Floch S. 2005. The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene. *Aquat. Toxicol.* 75, 191-201.
- Narbonne J.F., Aarab N., Clérandeau C., Daubéze M., Narbonne J., Champeau O. & Garrigues P. 2005. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends. *Biomarkers* 10, 58-71.
- Nesto N., Bertoldo M., Nasci C. & Da Ros L. 2004. Spatial and temporal variation of biomarkers in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Lagoon of Venice, Italy. *Mar. Environ. Res.* 58, 287-291.
- Nesto N., Romano S., Moschino V., Mauri M. & Da Ros L. 2007. Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy. *Mar. Pollut. Bull.* 55, 469-484.
- Nicholson S. 2003. Lysosomal membrane stability, phagocytosis and tolerance to emersion in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia : Mytilidae) following exposure to acute, sublethal, copper. *Chemosphere* 52, 1147-1151.
- Oliveira J., Cunha A., Castilho F., Romalde J.L. & Pereira M.J. 2011. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives. *Food Control* 22, 805-816.

- Orbea A., Ortiz-Zarragoitia M., Solé M., Porte C. & Cajaraville M.P. 2002. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalves molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat. Toxicol.* 58, 75-98.
- Paul-Pont I., de Montaudouin X., Gonzalez P., Jude F., Raymond N., Paillard C. & Baudrimon M. 2010. Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the introduced marine bivalve *Ruditapes philippinarum* in European populations. *Environ. Pollut.* 158, 3401-3410.
- Pelletier E., Cambell P.G.C. & Danizeau F. 2004. Ecotoxicologie moléculaire. Principes fondamentaux et perspectives de développement. *Presse univ. Québec*. ISBN 2-7605-1258-4, 500 pages.
- Petes L.E., Menge B.A., Murphy G. D. 2007. Environmental stress decreases survival, growth, and reproduction in New Zealand mussels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 351, 83 – 91.
- Pisanelli B., Benedetti M., Fattorini D. & Regoli F. 2009. Seasonal and inter-annual variability of DNA integrity in mussels *Mytilus galloprovincialis*: A possible role for natural fluctuations of trace metal concentrations and oxidative biomarkers. *Chemosphere* 77, 1551-1557.
- Rajalakshmi S. & Mohands A. 2005. Copper-induced changes in tissue enzyme activity in a freshwater mussel. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62, 140-143.
- Regoli F., Pellegrini D., Winston G.W., Gorbi S., Giuliani S. & Virno-Lamberti C. 2002. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Mar. Pollut. Bull.* 44, 912-922.
- Richardson B.J., Mak E., De Luca-Abbott S.B., McClellan K. & Lam P.K.S. 2008. Antioxidant Response to polycyclic Aromatic Hydrocarbons and organochlorine pesticides in green lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses? *Mar. Pollut. Bull.* 57, 503-514.
- Roméo M. & Gnassia-Barell M. 1997. Effect of Heavy Metals on Lipid Peroxidation in the Mediterranean Clam *Ruditapes decussates*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 118C, 1, 33-37.
- Schvezov N. & Amin O. 2011. Biochemical response of amphipods (*Gammarid: Paramorea*) in a sediment laboratory exposure from Ushuaia Bay, Beagle Channel. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 394-402.
- Soltani N., Amira A., Sifi K. & Beldi H. 2012. Environmental monitoring of the Annaba gulf (Algeria): Measurement of biomarkers in *Donax trunculus* and metallic pollution. *Bull. Soc. Zool. France* 137, 47-56.
- Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M. & Scoullous M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178-189.
- Varanka Z., Rojik I., Varanka I., Nemcsók J. & Ábrahám M. 2001. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 128, 467-478.
- Verlecar X.N., Jena K.B. & Chainy G.B.N. 2008. Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Sci.* 76, 745-752.
- Verlecar X.N., Pereira N., Desai S.R., Jena K.B. & Snigdha 2006. Marine pollution detection through biomarkers in marine bivalves. *Current Sci.* 91, 1153-1157.
- Vidal-Liñán L., Bellas J., Campillo J.A. & Beiras R. 2010. Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). *Chemosphere* 78, 265-272.
- Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullous M.J. & Valavanidis A. 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1361-1371.
- Wallace B.J., Guzewich J.J., Cambridge M., Altekuse S. & Morse D.L. 1999. Seafood-Associated Disease Outbreaks in New York, 1980-1994. *Am. J. of Preventive Med.* 17, 48-54.
- Wu S., Wu E., Qiu L., Zhong W. & Chen J. 2011. Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. *Chemosphere* 83, 429-434.

Manuscrit reçu le 09.02.2013

Version révisée acceptée le 16.07.2013

Version finale reçue le 08.09.2014

Mise en ligne le 12.09.2014