République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et dela Recherche Scientifique
Université Yahia Farès de Médéa



DÉPARTEMENT DE GÉNIE DES PROCÉDÉS ET ENVIRONNEMENT

THÈSE DE DOCTORAT

En Génie des Procédés

Option : Génie des Procédés

Thème

ÉTUDE D'UNE APPROCHE ECOTOXICOLOGIQUE DE BIOMARQUEURS CHEZ LA MOULE : SURVEILLANCE, BIOACCUMULATION ET BIOADSORPTION DE POLLUANTS

Présenté par:

BOUDJEMA Kamel

Soutenu devant le jury composé de :

Mr M. KREA	Professeur	Univ-Médéa	Président
Mme O.S. BENTURKI	Professeur	USTHB	Examinatrice
Mr O. BOURAS	Professeur	Univ-Blida1	Examinateur
Mr A. BADIS	Professeur	Univ-Blida1	Directeur de thése
Mr N. MOULAI-MOSTEFA	Professeur	Univ-Médéa	Co-Directeur de thése

Médéa, Octobre 2022

Résumé

La présence des contaminants comme les éléments en traces métalliques (ETM) dans le milieu aquatique soulève la question de leur accumulation et toxicité pour les organismes. Le présent travail a pour objectif d'utiliser le plant d'expérience pour évaluer les indices de la bioaccumulation(IPM : indice de pollution métallique et IBMI: indice de bioaccumulation moyen individuel (multi-métal)) de trois métaux traces (cadmium, zinc et cuivre) et leurs aspects toxicologiques basés sur deux indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2) calculés *via* la catalase (CAT), Glutathione-S-Transferase (GST) et MalonDiAldehyde (MDA) comme des biomarqueurs résultant du stress et dommage oxydatif, mesurés dans l'espèce sentinelle de la moule *Mytilus galloprovincialis*. Les résultats ont montré que la CL_{50}-72heure est de 2,60 (2,05-3,61) $mg.L^{-1}$ pour le Cd, 1,86 (1,15-3,88) $mg.L^{-1}$ pour le Zn et 0,10 (0,07-0,15) $mg.L^{-1}$ pour le Cu. Ainsi, les résultats ont révélé que les indices de la bioaccumulation (IPMet IBMI) et les indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2) dépendent de type, concentration et combinaison des métaux. De ce fait, les interactions toxicologiques métal-métal se sont révélées non linéaires, ce qui signifie une interaction supra-additive (synergique), infra-additive (antagoniste) ou sans effet. L'optimisation des données expérimentales a été utilisée pour déterminer les conditions optimales pour la bioaccumulation des ETM et pour les réponses des marqueurs biochimiques. La combinaison entre le plan CCF et les conceptes tels que les bioindicateurs ou les biomarqueurs pourrait être employée comme des outils fiables dans l'évaluation écotoxicologique de la contamination métallique et la prédiction de la bioaccumulation des ETM ou les réponses biochimiques dans les organismes marins.

Mots-clés : Métaux traces, CL_{50},*Mytilus galloprovincialis,* Bioaccumulation, Biomarqueurs, Modélisation, Optimisation, Plan d'expériences (MSR).

Abstract

The presence of contaminants such as trace metals (TM) in the aquatic environment raises the question of their accumulation and toxicity to organisms. The objective of the present work is to use the experimental designto evaluate the bioaccumulation indexes (MPI : metal pollution index and IMBI : individual mean (multi-metal) bioaccumulation index) of three trace metals (cadmium, zinc and copper) and their toxicological aspects based on two indexes of integrated biomarker response (IBR_1 and IBR_2) calculated by catalase (CAT), Glutathione-S-Transferase (GST) and MalonDiAldehyde (MDA) as biomarkers resulting from oxidative stress and damage, measured in the sentinel species of mussel *Mytilus galloprovincialis*. The results showed that LC_{50}-72hour is 2.60 (2.05-3.61) mg. L^{-1} for Cd, 1.86 (1.15-3.88) mg. L^{-1} for Zn and 0.10 (0.07-0.15) mg. L^{-1} for Cu. Thus, the results revealed that the bioaccumulation indexes (MPI and IMBI) and the integrated biomarker response indexes (IBR_1 and IBR_2) are dependent on metal type, concentration and combination of metals. As a result, the metal-metal toxicological interactions were found to be non-linear, meaning supra-additive (synergistic), infra-additive (antagonistic) or no effect. Optimization of experimental data were used to determine optimal conditions for TM bioaccumulation and biochemical marker responses. The combination between the CCF design and concepts such as bioindicators or biomarkers could be used as reliable tools in the ecotoxicological assessment of metal contamination and the prediction of TM bioaccumulation or biochemical responsesin marine organisms.

Keywords: Trace metals, LC_{50}, *Mytilus galloprovincialis*, Bioaccumulation, Biomarkers, Modeling, Optimization, Design of Experiments (RSM).

الملخص

إن تواجد الفلزات النزرة في البيئة المائية يثير التساؤل حول تراكمها وسميتها في الكائنات الحية. يهدف العمل الحالي إلى استخدام تصميم التجارب لتقييم مؤشرات التراكم الأحيائي (مؤشر التلوث الفلزي (IPM)ومؤشر التراكم الأحيائي متوسط الفردي (متعدد الفلزات) (IBMI)) لثلاثة فلزات نزرة (الكادميوم، الزنك والنحاس) وسميتها بناءً على مؤشرين للاستجابة المدمجة للمؤشرات الحيوية (IBR_1وIBR_2)المحسوبة بواسطة الكاتلاز (CAT) ،الجلوتاثيون -أس- ترانسفيراز (GST) والمالون ثنائي الألديهايد (MDA) كمؤشرات حيوية ناتجة عن الإجهادوالضرر التأكسدي، وهذا بقياسها في النوع الحارسالمتمثل في بلح البحر *Mytilusgalloprovincialis*.أظهرت النتائج أن التركيز المميت 50%-72 ساعة، هو 2.60 (3.61-2.05) مغ.ل$^{-1}$ للكادميوم، و1.86 (3.88-1.15) مغ.ل$^{-1}$ للزنك، و 0.10 (0.07 - 0.15) مغ.ل$^{-1}$ للنحاس. وأيضا، كشفت النتائج أن مؤشرات التراكم الأحيائي (IPMوIBMI)ومؤشرين للاستجابة المدمجة للمؤشرات الحيوية(IBR_1 وIBR_2) تتعلق بنوع وتركيز الفلزات النزرة وأيضًا على مزيجها . بينت النتائج أنالتدخلات السمية فلز- فلز على الاستجابات المدروسة غير خطية حيث يمكن أن يكون تداخلمعاون، مثبط، أو تداخل عديم التأثير. تم استخدام تحسين البيانات التجريبية لتحديد الشروط المثلى للتراكم الأحيائي للفلزات النزرةوالمؤشرات البيوكيميائية. إن الجمع بين تصميم CCFوالتراكم الإحيائي أو المؤشرات البيوكيميائية يمكن استخدامها كأدوات معتمدة في تقييم السمية البيئية للتلوث المعدني والتنبؤ بالتراكم الحيوي للفلزات النزرة أو الاستجابات البيوكميائيةفي الكائنات البحرية.

الكلمات المفتاحية: الفلزات النزرة، التركيز المميت 50%، *Mytilus galloprovincialis*، التراكم الأحيائي، المؤشرات البيوكيميائية،النمذجة والتحسين، تصميم التجارب (منهجية سطح الاستجابة).

Remerciements

En premier lieu, je remercie ALLAH, le tout puissant qui m'a donné la volonté, la santé et la patience durant toutes ces années d'étude afin que je puisse arriver à ce stade. الحمد لله

Un grand merci à mon directeur de thèse, Monsieur Abdelmalek Badis, Professeur à l'université de Blida 1, de m'avoir accueilli au sein de son équipe et accordé sa confiance depuis toutes ces années. Je lui exprime ici toute ma gratitude "toujours disponible, d'une gentillesse non mesurable, d'un dévouement inégalable et d'une patience remarquable".

Je voudrais ensuite témoigner ma reconnaissance à mon co-directeur de thèse, Monsieur Nadji Moulai-Mostefa, Professeur à l'université Yahia Farés de Médéa, de m'avoir aidé durant la réalisation de cette thèse. J'ai beaucoup apprécié ses qualités humaines et scientifiques, ses précieux conseils, ses encouragements et sa disponibilité.

J'adresse tous mes remerciements à MonsieurMohamed Krea, Professeur à l'université Yahia Farèsde Médéa, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être président du jury de cette thèse. Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude aux membres du jury : Madame Oum Saad Benturki, Professeur à l'USTHB etMonsieur Omar Bouras, Professeur à l'université de Blida 1, qui m'ont honoré en acceptant de juger ce présent travail.

Je remercie l'ensemble du personnel de la ferme de Culture Marine de Kouali 3 (Tipaza) et en particulier Monsieur Nabil Hadjadji pour m'avoir accueilli au sein de la ferme aquacole pour lancer mes expériences et de m'avoir permis de réaliser mes travaux dans les meilleures conditions possibles. Je remercie également le personnel de la Ferme Marine - CNRDPA-Bousmail-Tipaza, et en particulier Madame Djamila Ferhane et Monsieur Amar Dilmi.

J'adresse mes vifs remerciements le Professeur Fouzia Houma Bachari et les membres du laboratoire Régional Centre (ENSSMAL), en particulier Monsieur Benyahia Boudjellal et Madame Fariza Ounadi, pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire et aussi pour leur contribution dans la réalisation des minéralisations des échantillons. Je remercie également le Professeur Farouk Hannane de l'université de Blida 1 et le Docteur Omar Rouane Hacene de l'université d'Oran-Algerie pour leurs aides précieuses, qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

J’exprime mes plus sincères remerciements au Dr Affaf Kord (CNRDPA) qui a accepté de relire ce présent manuscrit et de me faire part de ses commentaires éclairés.

Mes vifs remerciements vont à tous les membres de CNRDPA, en particulier le directeur Mustapha Djelleli, Messieurs Redhouane Benfares, Rachid Boukedjouta, Fateh Chebel, Samir Bachouche, Belkacem Guenachi, Khaled Abderrahmani, Abdellah Meknachi et Sidali Kourdali.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à mes parents et ma famille pour leur soutien et leur patience, en particulier mon frère jumeau Abdelkader pour son soutien sans faille.

Enfin, un grand merci à tous ceux qui m’ont soutenu moralement et matériellement de près ou de loin à l’élaboration de ce travail.

Table des matières

RESUME

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

SYMBOLES ET ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE..…….. 01

CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Introduction …….. 04
I.2. Définition de la pollution marine ……. 04
I.2.1. Définition, origine et importance des ETM ……... 04
I.2.2 Comportement, distribution et devenir des ETM dans l'environnement aquatique 07
I.3. Bioaccumulation et toxicité des ETM chez les moules dans les sites pollués …… 08
I.4. Stress, défense et dommage oxydatif chez les mollusques bivalves …… 11
1.4.1. Stress oxydatif des ETM chez les mollusques bivalves …… 11
I.4.2. Défense et dommageoxydatif chez les mollusques bivalves …… 13
I.5. Facteurs influençant la réponse biologique globale…….. 14
I.6. Ecotoxicologie et moyens d'évaluation de la pollution marine 15
I.6.1. Essais écotoxicologiques en milieux aquatiques ……... 17
I.6.1.1. Bioessais de létalité (CL_{50} et DL_{50}) et bioessais effectifs (CE_{50}) ……... 17
I.6.1.1.1. Fonction de Probit …… 17
I.6.1.2. Biomarqueurs et analyse de la toxicité : Concept générale …… 19
I.6.1.2.1. Bioessais basés sur les biomarqueurs chez les mollusques bivalves …… 21
I.6.1.2.2. Biomarqueurs étudiés ……... 23
- La catalase (CAT) ……... 23
- La glutathion S Transferase (GST) ……. 24
- Malondialdéhyde (MDA) ……... 25

I.6.2. Modélisation en écotoxicologie ……. 26
I.6.2.1. Modélisation par les approches « équilibre et cinétique » ……. 26
I.6.2.2. Modélisation et optimisation par les plans d'expérience ……... 27
I.6.3. Modèle biologique ……. 28
I.6.3.1. Biologie et écologie de la moule *Mytilus* ……. 30
I.7. Classification par partition : Méthode de k-moyennes (K-Means) …… 32

CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. Introduction ……. 34
II.2. Échantillonnage et acclimatation des moules ……. 34
II.3. Test d'écotoxicité aiguë …….. 34
II.3.1. Détermination de la concentration létale médiane (CL_{50}) ……... 35
II.4. Bioessai par le plan d'expérience …… 36
II.5. Analyse des métaux traces par spectrophotométrie d'absorption atomique ……... 38
II.5.1. Décoquillage, lyophilisation et broyage ……... 38
II.5.2. Préparation des minéralisâts et analyse par SAA ……. 39
II.5.3. Les indices de la bioaccumulation métallique ……. 42
II.6. Analyses biochimiques des biomarqueurs …….. 42
II.6.1. Préparation de la fraction post-mitochondriale (S_9) ……. 42
II.6.2. Dosage des protéines …… 43
II.6.3. Dosage des biomarqueurs …… 43
II.6.4. Les indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR) …… 43
II.6.4.1. Développement de l'indice de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1) … 44
II.6.4.2. Indice de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_2) …….. 45
II.6.5. Analyse des clusters par la méthode des k-moyennes (K-Means) ……. 46

CHAPITRE III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. Toxicité létale du cadmium, du zinc et du cuivre chez *Mytilus galloprovincialis.* 47
III.1.1. Introduction ……. 47
III.1.2. CL_{50} des métaux (Cd, Zn et Cu) calculée par la mortalité ……. 48
Conclusion …….. 51

III.2. Modélisation de la bioaccumulation des métaux traces par l'utilisation de plan d'expérience …… 52
III.2.1. Introduction ……. 52
III.2.2. Modélisation/Optimisation de la bioaccumulation et les interactions toxicologiques ……. 53
III.2.2.1.Modèles de bioaccumulation des ETM, IBMI et IPM ……. 53
III.2.2.2.Évaluation de la qualité des modèles mathématiques …… 55
III.2.2.2.1.Les coefficients de détermination (R^2 et $R^2_{ajusté}$) …… 55
III.2.2.2.2. Analyses des résidus ……..... 58
III.2.2.2.3.Analyse de la variance (ANOVA)...……...……... 60
III.2.2.3. Effets des facteurs opérationnels sur la bioaccumulation …….. 66
III.2.2.4. Optimisation de la bioaccumulation et l'identification des interactions métal-métal …… 68
Conclusion …….. 80

III.3.L'étude de l'effet du cadmium, du zinc et du cuivre sur la moule méditerranéenne «*Mytilusgalloprovincialis*» par l'utilisation des plans d'expérience ……... 82
III.3.1. Introduction ……. 82
III.3.2.Modélisation/Optimisation des réponses biochimiques ……. 83

III.3.2.1.Modèles de la CAT, GST, MDA et les indices de la réponse intégrée (IBR_1 et IBR_2) ……..... 83
III.3.2.2. Évaluation de la qualité des modèles mathématiques ……..... 85
III.3.2.2.1.Les coefficients de détermination (R^2 et $R^2_{ajusté}$) …… 85
III.3.2.2.2.Analyses des résidus ……..... 87
III.3.2.2.3.Analyse de la variance (ANOVA) ……..... 89
III.3.2.3.Effets des facteurs étudiés sur les réponses biochimiques et IBR 92
……..III.3.2.4.Optimisation du processus biologique et identification des interactions métal-métal 95
…… 108
Conclusion ……..

CONCLUSION GENERALE …….. 109

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

APPENDICES

A. VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE
B. MÉTHODES D'ANALYSES
C. TABLE DE LA LOI DE FISHER-SNEDECOR

Liste des tableaux

Tableau I.1.	Classification des ETM en fonction de leur toxicité et de leur disponibilité ……..	05
Tableau I.2.	Concentrations d'éléments en traces métalliques d'origine anthropique dans les sédiments de quelques ports Algérienset Normes d'agence du bassin du Rhône (ABR)……	06
Tableau I.3.	Distribution de quelques espèces chimiques du Cd, Zn et Cu dans l'eau de mer à pH=8,1, 1 atm, Chlorinité =19‰ et 25 °C……..	07
Tableau I.4.	Les différents types de biomarqueurs et quelques exemples …..	19
Tableau I.5.	Modification de l'activité des enzymes antioxydantes chez *Pernaviridis* exposée au cadmium, cuivre et au zinc ……...	21
Tableau I.6.	Quelques travaux locaux de bioessai et biosurvaillance ……..	22
Tableau I.7.	Les différents stades du cycle de reproduction chez la moule *M. galloprovincialis* ……...	31
Tableau II.1.	Matrice d'expériences ……..	37
Tableau II.2.	Valeur certifiée et valeur mesurée des métaux traces dans un échantillon de référence certifiés « chaire de moule *Mytilus galloproincialis* »(SRM 2976-AIEA) ……..	41
Tableau II.3.	Coefficients de détermination d'IBR_1en fonction de nombre de cluster…….....	44
Tableau II.4.	Classification des valeurs des biomarqueurs établie grâce àl'analyse des cluster par la méthode des k-moyennes ……..	45
Tableau III.1.1	Concentration létale CL_{50}-72h de cadmium, zinc et cuivre pour *M. galloprovincialis*……..	48
Tableau III.1.2.	Les CL_{50}mentionnées pour quelques espèces de mollusques marins ……...	50
Tableau III.1.3.	Valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents liquides industriels……..	51
Tableau III.2.1.	Réponses de la bioaccumulation des métaux traces (Cd, Zn et Cu) et les indices de la bioaccumulation (IBMI et	54

IPM)……..
Tableau III.2.2. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse de l'accumulation de Cd……. 63
Tableau III.2.3. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse de l'accumulation de Zn……. 64
Tableau III.2.4. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse de l'accumulation de Cu……. 64
Tableau III.2.5. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse IBMI...…….. 65
Tableau III.2.6. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse IPM …..……. 65
Tableau III.2.7. Valeurs optimales des paramètres du processus de bioaccumulation,avec les limites supérieures admissibles…… 75
Tableau III.2.8. Valeurs optimales des indices de bioaccumulation maximale (IBMI et IPM) ……... 76
Tableau III.2.9. Intervalles de variation d'IBMI et l'IPM ……... 80
Tableau III.3.1. Réponses des biomarqueurs (CAT, GST et MDA) et les indices de la réponseintégrée des biomarqueurs (IBR_1,IBR_2) …….. 84
Tableau III.3.2. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse CAT…….. 96
Tableau III.3.3 Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse GST…….. 96
Tableau III.3.4. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse MDA. …….. 97
Tableau III.3.5. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse IBR_1……. 97
Tableau III.3.6. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse IBR_2…….. 98
Tableau III.3.7. Valeurs optimales des biomarqueurs (CAT, GST et MDA)……... 102
Tableau III.3.8. Valeurs optimales des indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2) …… 103
Tableau III.3.9. Intervalles de variations pour les indices IBR_1 et IBR_2 ……... 106

Liste des figures

Figure I.1.	Prise en charge de métaux par des organismes aquatiques-mécanismes généraux ……	08
Figure I.2.	Modèle classique de cytotoxicité (ou de débordement) cellulaire ……	11
Figure I.3.	Toxicité des métaux traces et le stress oxydatif chez l'organisme ……	12
Figure I.4.	Enzymes impliquées dans la défense oxydative ……...	13
Figure I.5.	Schéma de modèle de ligand biotique et les facteurs influençant la réponse biologique (Bioaccumulation-Toxicité) ……	15
Figure I.6.	Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques ……..	16
Figure 1.7.	Mécanisme de détoxication des glutathion S-transférases (GST) …….	24
Figure 1.8.	Formation de MDA par peroxydation lipidique ……	26
Figure 1.9.	Représentation en boîte noire du processus biologique ……	28
Figure I.10.	Anatomie de la moule *Mytilus galloprovincialis*……...	29

Figure I.11.	Exemple simple du processus de partionnement (clustering) basé sur k-means ……...	33
Figure II.1.	Dispositif expérimental utilisé pour le test d'écotoxicité aiguë	35
Figure II.2.	Dispositif expérimental utilisé pour le test CCF ……...	36
Figure II.3.	Échantillon de la moule lyophilisé et broyé ……..	39
Figure II.4	Minéralisation des échantillons …….	40
Figure II.5.	La fraction post mitochondriale (S_9) préparée ..……....	43
Figure III.2.1.a.	Valeurs des réponses observées en fonction des réponses prédites (cas de Cd, Zn et Cu). ……	57
Figure III.2.1.b.	Valeurs des réponses observées en fonction des réponses prédites (cas de IBMI et IPM)…….	58
Figure III.2.2.a.	Diagramme des résidus pour les réponses bioaccumulation (cas de Cd, Zn et Cu)……..…….....	59
Figure III.2.2.b.	Diagramme des résidus pour les indices (cas de IBMI et IPM)...	60
Figure III.2.3.	Effet du Cd, Zn et Cu sur la bioaccumulation du Cd (µg.g^{-1}poids humide) ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (a) Cd-Zn, (b) Cd-Cu,(c) Zn-Cu ……..	76
Figure III.2.4.	Effet du Cd, Zn et Cu sur la bioaccumulation du Zn (µg.g^{-1}poids humide) ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et à des diagrammes d'interaction : (d) Cd-Zn, (e) Cd-Cu (f) Zn-Cu ……..	77
Figure III.2.5.	Effet de Cd, Zn et Cu sur la bioaccumulation du Cu (µg.g^{-1} poids humide) ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (g) Cd-Zn, (h) Cd-Cu (k) Zn-Cu ……	78
Figure III.2.6.	Effet de Cd, Zn et Cu sur l'IBMI ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (l) Cd-Zn, (m) Cd-Cu (n) Zn-Cu …….	79
Figure III.2.7.	Effet de Cd, Zn et Cu sur l'IPM ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et à des diagrammes d'interaction : (o) Cd-Zn, (p) Cd-Cu (q) Zn-Cu …….	80
Figure III.3.1.a.	Valeurs des réponses observées en fonction des réponses prédites (cas de CAT, GST et MDA) ……	86
Figure III.3.1.b.	Valeurs des réponses observées en fonction des réponses prédites (cas de IBR_1 et IBR_2) ……	86

Figure III.3.2.a. Diagramme des résidus pour les réponses biomarqueurs (CAT, GST et MDA) 88 ……

Figure III.3.2.b. Diagramme des résidus pour les indices (IBR_1 et IBR_2)……. 88

Figure III.3.3. Effet de Cd, Zn et Cu sur l'activité CAT($U.mg^{-1}$ de protéine) ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (a) Cd-Zn, (b) Cd-Cu (c) Zn-Cu 97 ……..

Figure III.3.4. Effet de Cd, Zn et Cu sur l'activité GST($nmole.min^{-1}.mg^{-1}$ de protéine) ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (d) Cd- Zn, (e) Cd-Cu (f) Zn-Cu …… 98

Figure III.3.5. Effet de Cd, Zn et Cu sur MDA($nmole.mg^{-1}$ de protéine) ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (g) Cd- Zn, (h) Cd-Cu (k) Zn-Cu 99 ……..

Figure III.3.6. Effet de Cd, Zn et Cu sur l'IBR_1; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (l) Cd-Zn, (m) Cd-Cu (n) Zn-Cu 100 …….

Figure III.3.7. Effet de Cd, Zn et Cu sur l'IBR_2; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (o) Cd-Zn, (p) Cd-Cu (q) Zn-Cu 101 ……..

Figure III.3.8. Réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1) …….. 106

Figure III.3.9. Réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_2) 107 ……...

SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ALZINC	Entreprise de production de Zinc et d'acide sulfurique
ASMIDAL	Entreprise nationale des Engrais et Produits Phytosanitaires

A	Site de liaison membranaire
Atm	Atmosphère
Abs	Absorbance
AIEA	Agence Internationale de l'Energie Atomique
ANOVA	Analyse de la variance
BM	Biomarqueur
BR	Branchies
CNRDPA	Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture
CAT	Catalase
CL_{50}	Concentration Létale à 50%
CCF	Plan Composite Centré à Faces Centrées
CE	Commission des Enzymes
ddl	Degré de liberté
D	Dimension
ENSSMAL	École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral
ETM	Éléments en Traces Métalliques
ENCC	Entreprise Nationale de Charpente et Chaudronnerie
ENPEC	Entreprise Nationale des Produits de l'Électrochimie
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
EROD	EthoxyRésorufine-O-Dééthylase
Eq	Équation
F	Coefficient de Fisher
Fig	Figure
GST	Glutathione-S-Transférase
GESAMP	Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine environmental Protection
GP_X	Glutathion Peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSG GR_d	Glutathion oxydé Glutathion Réductase
GD	Glande digestive
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCT	HydroCarbures Totaux
h	Heur
IPM	Indice de Pollution Métallique
IBMI	Indice de Bioaccumulation Moyen Individuel (multi-métal)
IBR	Indices de la Réponse Intégrée des Biomarqueurs
IFREMER	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
Da	Dalton
L	Ligandassocié au métal en solution

M	*Mytilus*
MDA	MalonDiAldehyde
MT	MétalloThionéine
MSR	Méthodologie de Surface de Réponse
ME	Manteau
M	Métal
M^{Z+}	Ion métallique libre
ML_n^0	Complexe métallique neutre
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NADPH	DihydroNicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
Psu	Practical salinity unit
PCB	PolyChloroBiphényles
Prot	Protéines
P	Probabilité
ph	Poids humide
pH	Potentiel de l'Hydrogène
PE	Plan d'Expériences
ROS	ReactiveOxygenSpecies
SH	SulfHydrile ou groupement thiol
SOD	SuperOxyde Dismutase
SAA	Spectrométrie d'Absorption Atomique
SRM	Matériaux de Référence Certifiée
tr	Tour
UV-Vis	Ultra-Violet- Visible
U	Unité
X	Site de liaison intégrédans la membrane épithéliale
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
$O_2^{\bullet-}$	Anion superoxyde
$OH^{\bullet}$	Radical hydroxyle
R^2	Coefficient de corrélation
$R^2_{ajusté}$	Coefficient de corrélation ajusté
g	Gramme
L	Litre
m	Mètre
min	Minute
C	Centi
°C	Degré Celsius
m	Milli
µ	Micro
n	Nano
Pico	Pico
k	Kilo

Introduction Générale

La pollution marine est un phénomène qui existe depuis longtemps, causé par les pratiques nuisibles et agressives de l'homme. Ces dernières sont de plus en plus répandues et proportionnelles au développement et la croissance des différentes activités industrielles, et leurs effets affectent non seulement l'environnement marin, mais aussi la santé humaine, avec des conséquences économiques considérables [1-4].

En effet, la zone côtière, un lieu géographique d'interactions entre le milieu marin et terrestre, se caractérise par la richesse de son écosystème et par ses ressources et services (écologiques, sociaux et économiques). De plus, à cause de l'intensité des activités économiques (domestiques, industrielles, agricoles, etc.), cette zone constitue le récepteur final des quantités importantes renfermant l'ensemble des substances rejetées dans l'environnement. Ces dernières provenant de plusieurs origines possèdent des propriétés toxiques [5-9]. Par ailleurs, la zone littorale présente une grande fragilité *vis-à-vis* des xénobiotiques, par voie de conséquence, la pollution de cette zone peut porter des atteintes à la structure des biocénoses et à la productivité des écosystèmes marins [9]. Parmi les diverses perturbations anthropiques affectant les systèmes côtiers, nous pouvons citer très particulièrement, la pollution par les éléments en traces métalliques [8].

En Algérie, le déficit en traitement en amant des eaux usées avant leur rejet en mer (p.e. Oueds : El Harrach-Alger, Mazafran-Tipaza, Seybouse et Bouhamra-Annaba, Kebir-Skikda,Chéliff-Mostaganem et El-Mohgoun-Arzew), constitue des causes majeures de dégradation de l'écosystème marin côtier. Ces eaux sont chargées essentiellement par des métaux traces, matières organiques, matières en suspension, détergents et des huiles lubrifiantes [10-20].

La pollution du milieu marin par les métaux traces suscite un grand intérêt au sein de la communauté scientifique [21]. Du fait de leur toxicité et de leur nature non biodégradable, persistante et cumulative, peuvent causer divers effets néfastes et dans certains cas irréversibles sur la composante biotique et abiotique de l'écosystème marin [8,22-27]. Il résulte par conséquent un stress oxydatif suite aux effets potentiellement toxiques des ETM au niveau cellulaire sur les organismes aquatiques (génotoxiques et cytotoxiques variés : inactivation enzymatique, dégradation des protéines, dommage à l'ADN et mortalité cellulaire) [7,28-29].

La surveillance des écosystèmes marins côtiers est exercée depuis plusieurs années afin d'éviter les conséquences parfois graves de la pollution. Pour ce faire, des programmes de

recherche et de développement ont été initiés afin d'unifier les efforts de recherche, standardiser les méthodes et surtout proposer des mesures de préservation et réglementation [30-32]. Dans ce contexte, des méthodes biologiques basées sur des observations qualitatives et/ou quantitatives des organismes vivants dans les milieux naturels sont rapidement apparues comme un moyen potentiel de pallier les insuffisances des méthodes d'analyses chimiques [33].

À l'heure actuelle, deux approches complémentaires basées sur l'étude des organismes vivants sont employées : les « bioindicateurs » et les « biomarqueurs ». Les informations fournies par différents biomarqueurs sont ainsi complémentaires et l'approche « multi-marqueurs » est préconisée et employée par tous les spécialistes de l'ecotoxicologie pour la biosurveillance des milieux [33-35]. En outre, les indices de la bioaccumulation ou de biomarqueurs sont également d'un grand intérêt en raison des informations intégrées qu'ils peuvent apporter sur l'état de santé des écosystèmes ou sur l'environnement en général [5,36-38]. Par ailleurs, la modélisation, a gagné d'avantage, une importance considérable ces dernières décennies dans le domaine d'écotoxicologie, elle permet d'établir le lien entre: (1) la concentration d'exposition et la concentration bioaccumulée par l'organisme et (2), la concentration du contaminant bioaccumulé dans l'organisme et sa toxicité [39,40].

Parmi les différents organismes marins, les mollusques bivalves (telle que *M. galloprovincialis*), reconnues pour être d'excellentes espèces sentinelles du milieu aquatique, sont les plus utilisées dans les réseaux de surveillance ou dans les tests de biotoxicité, en raison de leur large répartition géographique, de leur échantillonnage facile et de maintien au laboratoire, leur comportement sessile, leur sédentarité et leur capacité à accumuler les éléments en trace métalliques [31,41-43].

Nous rappelons que l'idée du thème initial était sur les deux grandes parties: bioaccumulation et biomarqueurs (moule vivante) en comparaison avec la biosorption (coquille de la moule en tant que coproduit utilisé comme support bioadsorbant) en adoptant une démarche de modélisation afin de comprendre le lien entre ces deux phénomènes pour leurs utilisations dans le domaine environnemental. Sachant que notre choix d'étudier la bioaccumulation en premier permettra de se relier avec les réponses biochimiques (biomarqueurs) au niveau de laboratoire afin de s'étaler au milieu naturel (biosurveillance). Faute du temps afin de réaliser les deux grandes parties en parallèle, d'une part et, en vue de notre expertise sur les biomarqueurs (CF.autres travaux en appendice A), d'autre part, nous avons donné une priorité pour la partie « bioaccumulation et biomarqueurs».

Le travail réalisé dans cette présente thèse s'inscrit dans le cadre des activités de recherches initiées par l'équipe de biomolécules chapeauté par le Professeur Badis Abdelmalek (Laboratoire de recherche de chimie des substances naturelles et de biomolécules, U-Blida 1) en 2009 en collaboration avec CNRDPA et plus récemment en collaboration avec l'équipe dephysico-chimie des procédés et formulationdirigé par le professeur Moulai-Mostefa Nadji (Laboratoire Matériaux et Environnement, U-Yahia Farès-Médéa) qui visent à mettre en place des techniques de biosurvaillance et de contrôle de la toxicité de certains produits chimiques en milieux marins en particulier les métaux traces basées sur les réponses biochimiques (biomarqueurs).

Pour ce faire, le présent travaila été consacré aux différentes estimations de la concentration létale médiane (CL_{50}) des trois métaux traces (cadmium, cuivre, et zinc) sur les mollusques bivalves *Mytilus galloprovincialis* et les dosages des biomarqueurs du stress oxydatif (catalase : CAT, glutathione-S-Transférase : GST), et du dommage oxydatif (Malondialdehyde : MDA)et les calculs des indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR), d'une part. Et d'autre part, nous avons (1) dosé les ETM accumulés et (2) calculé des indices de bioaccumulation (IPM et IBMI) chez la moule *vis-à-vis* d'un mélange ternaire cadmium-zinc-cuivre. En dernier lieu, nous avons étudié les interactions toxicologiques métal-métal sur les réponses biologiques afin d'identifier le type de cette interaction (synergique/antagoniste/sans effet).

Ce manuscript de thèse est composé de trois chapitres ; le premier chapitre est consacré à une revue bibliographique qui présentera des concepts de bases relatifs à certains métaux traces (Cd, Zn et Cu) et à leurs accumulations, à leurs effets toxiques et à leurs moyens d'évaluation en écotoxicologie. Aussi la méthode statistique de partitionnement de données. Le deuxième chapitre décrit la partie expérimentale : échantillonnage et acclimatation des moules, test d'écotoxicité aiguë, biotest par le plan d'expérience, analyse des métaux traces par spectrophotométrie d'absorption atomique, analyses biochimiques et les calculs des indices de la bioaccumulation métallique et les indices des réponses intégrées des biomarqueurs.Le troisième chapitre présente les résultats obtenus et leurs discussions pour chacun des aspects de recherche posés, à savoir, l'étude de la toxicité létale du cadmium, du zinc et du cuivre chez la moule méditerranéenne « *Mytilus galloprovincialis* ».L'étude de la bioaccumulation du cadmium, du zinc et du cuivre chez la moule *Mytilus galloprovincialis* par l'utilisation de plan d'expérience.L'étude de l'effet du cadmium, du zinc et du cuivre sur la CAT, GST, MDA et IBR chez la moule *Mytilus galloprovincialis* par l'utilisation de plan d'expérience.

Enfin une conclusion générale, dans laquelle, est exposé les déférents résultats qui sont dégagés à l'issue de ce travail ainsi que des perspectives pour mettre en avant les points qui méritent d'être approfondis et poursuivis.

Synthèse bibliographique

I.1. Introduction

Ce chapitre développe les notions de base sur la pollution marine par les éléments en traces métalliques (ETM) (définition, origine et importance, distribution et devenir dans l'environnement aquatique (section I.2.1 et I.2.2)). La réponse biologique globale comprendra la bioaccumulation du métal, ainsi que les effets induits par le métal bioaccumulé sur le statut oxydatif des mollusques sont traités dans les sections (I.3 et I.4). Nous terminons cette première partie par un résumé sur les facteurs influençant la réponse biologique globale des mollusques.

Une deuxième partie présente les méthodes d'évaluation de la pollution marine par l'approche biologique (section I.6), suivie par les méthodes de la modélisation en écotoxicologie (section I.6.2). Et puis, une description de notre modèle biologique, la moule méditerranéenne « *Mytilusgalloprovincialis* » et son rôle dans la biosurveillance des polluants (section I.6.3). Enfin, une présentation de la classification par partition : méthode de k-moyennes (K-Means).

I.2. Définition de la pollution marine

La définition de la pollution marine la plus couramment reconnue est celle donnée par le groupe mixte d'expert chargé d'étudier les aspects scientifiques de la protection de l'environnement marin (GESAMP) : "l'introduction directe ou indirecte, par l'homme, de substances ou d'énergie, dans le milieu marin, y compris les estuaires, lorsqu'elle a des effets nuisibles tels que dommages aux ressources biologiques, risques pour la santé de l'homme, entraves aux activités maritimes, y compris la pêche, altération de la qualité de l'eau de mer du point du vue de son utilisation et dégradation des valeurs d'agrément" [44].

Parmi ces substances précitées nous citons les éléments traces métalliques « ETM ». Du fait de leur persistance, de leur aptitude à s'accumuler dans les sédiments et le biote, et de leur potentiel toxique, les ETM sont considérés comme de sérieux polluants dansl'environnement marin [27,45,46].

I.2.1. Définition, origine et importance des ETM

L'appellation d'éléments en traces métalliques ou par extension « éléments/métaux traces » désigne les métaux et métalloïdes dont la teneur est inférieure ou égale à 1g. kg^{-1} dans la croûte terrestre, 1mg. kg^{-1} dans les organismes vivants et 1 picomoles.L^{-1} dans

l'eau de mer [47-50]. Cette appellation est préférentiellement utilisée par les scientifiques par rapport àcelle de « métaux lourds », terme défini comme étant tout métal dont la masse volumique est supérieurs à 5 $g.cm^{-3}$ [48,51,52]. Cependant, la classification en métaux lourds est souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » (cas du zinc), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas des métaux (c'est le cas de l'arsenic qui est un métalloïde). Ce terme générique désigne donc indistinctement des métaux et métalloïdes réputés toxiques [52,53].

Dans un contexte biochimique, les métaux traces essentiels ou oligo-éléments sont des micronutriments essentiels à la vie et dont l'absence se traduit par une dysfonction de l'organisme qui ne peut être restaurée que par l'ajout du métal en question, cependant, un élément essentiel peut également être toxique lorsqu'il est présent à de trop fortes concentrations. Les métaux non essentiels (Cd, Hg et Pb) n'ont aucune fonction biologique connue (c'est-à-dire que ces métaux n'interviennent dans aucun processus métabolique). Ils sont considérés comme néfastes dès qu'ils sont présents dans le milieu et entraînent des effets biologiques délétères à de très faibles concentrations [7].

Ainsi, dans un contexte écotoxicologique, pour identifier les métaux « prioritaires »,Wood [54] a proposé une classification des métaux et métalloïdes en trois catégories comme le montre le Tableau I.1.

Tableau I.1. Classification des ETM en fonction de leur toxicité et de leur disponibilité.

Éléments Inoffensifs		Éléments très toxiques et relativement accessibles			Éléments toxiques mais insolubles ou très rares	
Ca	Na	Ag	Cr	Se	Ba	Re
Fe	Rb	Al	Cu	Sn	Ga	Rh
K	Si	As	Hg	Te	Hf	Ru
Li	Sr	Au	Ni	Tl	In	Ta
Mg		Be	Pb	Zn	La	Ti
Mn		Bi	Pd		Nb	W
		Cd	Pt		Os	
		Co	Sb			

Les ETM sont naturellement présents dans la croûte terrestre et qu'ils ne sont ni synthétisés ni détruits par les activités humaines. Ainsi, ces ETM ont été ou sont encore

utilisés dans de très nombreuses applications (industrielles, médicales, agricoles, …etc.) [7,44,53].

Dans ce contexte, ces éléments se retrouvent dans le milieu marin à la fois de façon naturelle tels que l'érosion mécanique ou chimique des roches, l'activité volcanique ou les dépôts atmosphériques mais aussi du fait de rejets d'origine humaine (sources anthropiques : industries, agriculture, agglomération urbaines) [55,56].

En Algérie, ces métaux traces, ont pour origines différentes activités telles que l'activité d'électrolyse de zinc métallurgique (p.e. ALZINC-Ghazaouaet), l'activité de charpente et de chaudronnerie (p.e. ENCC-Annaba), l'activité de fabrication des accumulateurs, batteries et des piles électriques rechargeables (p.e. ENPEC-Alger), l'activité pétrochimique (p.e. Pôle pétrochimiques d'Arzew-Béthioua), activité de fabrication des engrais chimiques (p.e. ASMIDAL-Annaba) et notamment en agriculture par usage abusif des pesticides [10,15,17,19,20,57].

D'après la synthèse des travaux relatifs à la pollution marine réalisée par Grimes [10] dans le cadre du bilan et diagnostic national à partir des données du laboratoire de chimie et de pollution marine de l'ENSSMAL révèle dans divers secteurs de la côte algérienne une pollution métallique localisée dépassant, souvent, les normes admises [58]. Ces teneurs témoignent la présence des sources de pollution très localisées (Tableau I.2).

Tableau I.2. Concentrations d'éléments en traces métalliques d'origine anthropique et dans les sédiments de quelques ports Algériens et Normes d'agence du bassin du Rhône (ABR) (µg.g^{-1} poids sec de sédiment)[10,58].

Ports	ETM [10]	Normes ABR[58]
Ghazaouat	Zinc : 3540,59 ± 1206,33 ; Mercure : 3,87 ± 1,79 ; Plomb : 177,39 ± 103,29	Cuivre: 26 ; Zinc: 88 ; Magnésium : 400 ; Chrome :60 ; Fer :2000 ; Plomb:22 ; Cadmium: 0,6 ; Mercure: 0,2
Oran	Mercure : 0,83 ± 0,31 ; Cuivre : 88,74 ± 23,07 ; Zinc 217,85 ± 41,94	
Alger	Plomb : 230,353 ± 90,191 ; Cuivre : 112,01 ± 39,93 ; Zinc : 338,342 ± 103,737 ; Cadmium : 0,883 ± 0,225 ; Mercure : 1,88 -10,74	
Skikda	Mercure : 7,24 ± 4,47 ; Magnésium : 235,37-397,41	
Bejaia	Cuivre : 22,87-25,48 ; Magnésium : 276,05-308	

I.2.2. Comportement, distribution et devenir des ETM dans l'environnementaquatique

Une fois arrivés dans l'environnement aquatique, les métaux se répartissent entre les différents compartiments de l'environnement aquatique (eau, solides en suspension, sédiments et biote) [44]. En effet, les métaux ne sont donc pas sujets à la biodégradation, mais ils peuvent subir des transformations réversibles (p.e. changements de « spéciation »). On entend par « spéciation » d'un métal sa répartition parmi différentes formes physiques ou chimiques. Effectivement, les métaux traces sont présents dans l'eau de mer sous diverses formes physiques (dissoutes (<10 nm), colloïdales (10-200 nm), particulaires (>200nm)) et chimiques (complexes de coordination telles que: ion métallique libre hydraté, hydroxo-complexes, complexes simples inorganiques et organiques, complexes polymères organiques) [7, 59]. Le tableau I.3 résume quelques données sur les formes de cadmium, zinc et cuivre dissoutes entre les différentes formes chimiques les plus couramment présents dans l'eau de mer (pH=8,1, Chlorinité =19‰ , 25 °C, 1 atm) [59].

Tableau I.3. Distribution de quelques espèces chimiques du Cd, Zn et Cu dans l'eau de mer à pH=8,1, 1 atm, Chlorinité =19‰ et 25 °C.

Forme	Espèces (%)					
	Cadmium	(%)	Zinc	(%)	Cuivre	(%)
Ion métallique libre	$Cd^{2+}(H_2O)_6$	2.5	$Zn^{2+}(H_2O)_6$	17	$Cu^{2+}(H_2O)_6$	1
Hydroxo-complexes	-	-	$Zn(OH)_2^0$	62	$Cu(OH)_2^0$	90
Complexes simples inorganiques	$CdCl^+$	39	$ZnCl^+$	6.4	$CuCO_3^0$	8
	$CdCl_2^0$	51	$ZnCO_3^0$	5.8	$CuOH^+$	1
	$CdCl_3^-$	6	$ZnSO_4^0$	4	-	-
	-		$ZnCl_2^0$	4	-	-

Les principaux processus qui gouvernent la distribution et la répartition des métaux traces sont la dilution, l'advection, la dispersion, la sédimentation, l'adsorption/désorption et la spéciation [44]. La spéciation chimique d'un métal dissous dépendra entre autres de la composition de la solution (pH ; concentrations des divers ligands ; température) et de son affinité pour les ligands disponibles [7,59].

À cet effet, la connaissance de la spéciation d'un élément est d'une grande importance puisqu'elle permet d'une part de comprendre et prédire son comportement dans les

systèmes aquatiques et d'autre part, elle conditionne sa biodisponibilité (proportion du contaminant présent dans l'environnement sous une ou plusieurs formes assimilables par un organisme) et sa toxicité *vis-à-vis* des organismes vivants [7,59, 60-62]. En effet, Morel [63], le premier qu'invoquait l'importance universelle de l'activité de l'ion métallique libre pour déterminer la prise en charge (transport), bioaccumulation et la toxicité des métaux traces cationiques.

Dans ce contexte, le modèle de l'ion libre (free ion activity model : FIAM)[63], et le modèle du ligand biotique (biotic ligand model : BLM) [64] reposent sur la même hypothèse principale, que la forme métallique la plus biodisponible pour les organismes aquatiques est la forme de l'ion libre (M^{n+}) avec quelque exception pour les complexes métalliques neutres et lipophiles (p.e. $HgCl_2^0$) (Figure I.1). En effet, les formes libres sont capables de franchir la barrière cellulaire des organismes vivants, tandis que la présence de ligands, organiques ou inorganiques (les chlorures, sulfates, nitrates, carbonates), peuvent favoriser la formation des complexes qui sont considérés comme peu biodisponibles [7,65]. Ainsi, la mesure exacte des concentrations métalliques biodisponibles dans un milieu n'est pas possible, le terme d'estimation des concentrations biodisponibles dans le milieu est préféré [66].

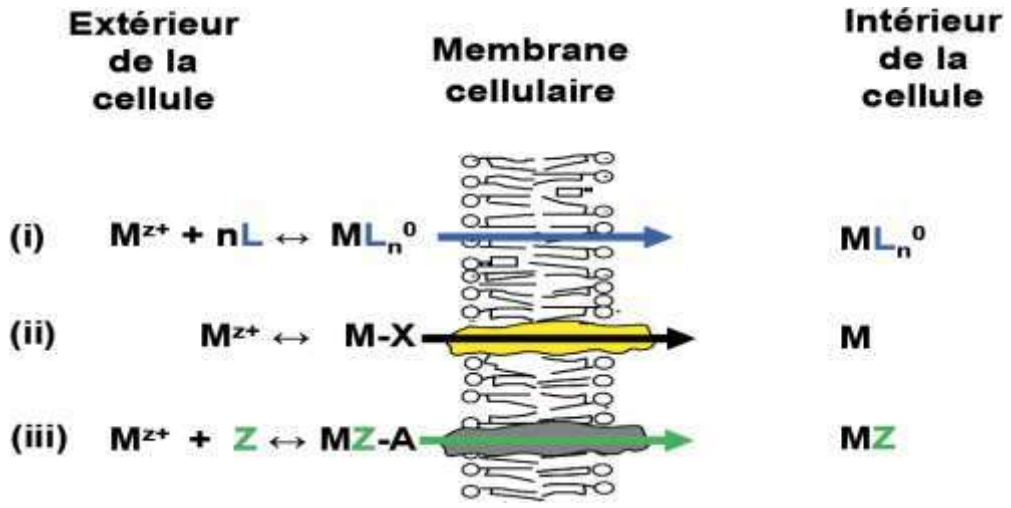


Figure I.1. Prise en charge de métaux par des organismes aquatiques-mécanismes généraux : (i) diffusion passive de complexes métalliques lipophiles ; (ii) transport facilité de cations ; (iii) transport accidentel de cations liés à des anions [67].

I.3. Bioaccumulation et toxicité des ETM chez les moules dans les sites pollués

Parmi les définitions proposées de la bioaccumulation dans la littérature ; pour certains auteurs, il désigne la capacité des organismes à concentrer et accumuler des substances

chimiques à des concentrations supérieures à celles où elles se trouvent dans l'eau du milieu naturel [68]. Chez d'autre auteur, il s'agit d'une rétention nette d'un contaminant au coursdu temps [7] ou il est le résultat des processus par lesquels le contaminant entre dans l'organisme et des processus de décontamination : une combinaison des mécanismes d'excrétion vers l'environnement et de biotransformation endogène [69].

De nombreux organismes marins accumulent les ETM à des concentrations nettement supérieures à celles retrouvées dans leur environnement [70]. De ce fait, plusieurs études de terrain et de laboratoire ont montré qu'on peut corréler les charges métalliques corporelles des organismes aquatiques avec les concentrations dans le milieu [43,71]. En effet, la moule qui filtre en continu l'eau de mer pour se nourrir et respirer concentre des quantités énormes des ETM si l'eau est polluée, par contre, elle « relargue » ces éléments si elle se trouve dans une eau propre. Cette biologie particulière désigne cet organisme comme un témoin irréfutable de la pollution marine locale au même titre que certains organismes planctoniques de mers [72]. Aussi, en raison de son caractère filtreur, sa sédentarité et son pouvoir accumulateur, la moule *Mytilus galloprovincialis* a été utilisée dans la surveillance de la qualité du milieu marin [73-75].

D'un point de vue écotoxicologique, la bioaccumulation résulte du bilan entre :

- Les entrées des métaux, *via* les processus d'adsorption- et d'absorption au travers des barrières biologiques à l'interface « organisme/milieu » (membrane plasmique à l'échelle cellulaire ; revêtement cutané, lamelles branchiales, paroi du tractus digestif pour les organismes supérieurs),
- Les mécanismes de séquestration dans les compartiments tissulaires et cellulaires,
- Les différentes voies d'élimination ou de décontamination [76].

Les principales voies de prise des ETM par les mollusques bivalves sont la voie dissoute/direct (contact avec le métal en solution) et la voie trophique/ indirect (ingestion de nourriture contaminée). Et comme toute la cavité palléale, des mollusques bivalves, baigne dans le milieu environnant, le métal soluble est pris par les organes exposés (branchie et le manteau) et le métal particulaire (adsorbé sur phytoplancton) est pris par le tube digestif. Les mollusques accumulent principalement dans deux organes : l'hépatopancréas et le rein.

En effet, des études de laboratoire montrent que les métaux se distribuent dans les principaux organes de prise : manteau, branchies et glande digestive, puis après un certain temps de latence, s'accumulent dans le l'hépatopancréas et enfin par le rein seront excrétés (organe d'excrétion) et en plus faibles teneurs dans les autres organes [66,77-82].

Le métal une fois pris doit être détoxifié par l'organisme afin de prévenir les manifestations de toxicité qu'il est susceptible d'induire [83]. La détoxication comprend tous les processus, stratégies, ou mécanismes qui permettent de minimiser le potentiel d'un métal à interagir avec des macromolécules essentielles [7]. En effet, tous les organismes accumulateurs ont des mécanismes de détoxication qui visent à limiter la disponibilité intracellulaire des ETM, et par conséquent, leur potentiel toxique. Effectivement, l'organisme accumulateur peut agir sur les ligands intracellulaires disponibles (nature, concentration et compartimentalisation cellulaire).

Dans le cas où, les teneurs intracellulaires en métal seront élevées qui varieront en fonction de l'exposition, la cellule réagit plutôt en synthétisant des ligands d'affinité appropriée, qui permettent de séquestrer le métal dans le milieu intracellulaire et de le rendre non-disponible (p.e. les métallothionéines, ou «MT »).

Ainsi, on dénombre en général d'autres mécanismes de détoxification à travers des processus de séquestration/complexation : (i) séquestration dans des organelles telles que le lysosome (organites cellulaires présents dans toutes les cellules animales, excepté les hématies, et qui a une fonction « d'éboueur » dans la cellule), (ii) séquestration dans des granules insolubles (riche en groupements phosphate et sulfure) [7,66].

L'organe principal de la détoxification et du stockage des métaux chez les organismes aquatiques et en particulier chez les mollusques est le rein [78,80]. La phase finale de la détoxification est l'excrétion des métaux qu'est se fait principalement *via* l'urine et les fèces [66].

La MT influence la distribution du métal dans la cellule de deux manières [7,84] :

- Elle se lie avec les ions métalliques qui entrent dans la cellule (régulation des métaux essentiels et détoxication des métaux traces).
- Elle joue un rôle de « sauvetage » en enlevant les ions métalliques déjà associés aux ligands potentiellement sensibles responsables de la toxicité cellulaire.

L'hypothèse du débordement cellulaire par saturation du mécanisme de détoxication de la MT (spillover ou cytotoxicité cellulaire) [7,85-87] propose que l'accumulation excessive de métaux, au-delà des capacités liguantes ou des capacités de synthèse de la MT, provoque la conjugaison des ions métalliques à d'autres constituants cytosoliques (Figure I.2).

En effet, les métaux accumulés dans le cytosol, sous forme dissoute non liée à la métallothionéine et non stockée dans les granules/lysosomes (surplus de métaux) qui sont

alors responsables de la toxicité cellulaire et des effets néfastes sur la santé de l'organisme aquatique [85-88]. Parmi ces effets potentiellement toxiques on précise le stress oxydatif [6,28].

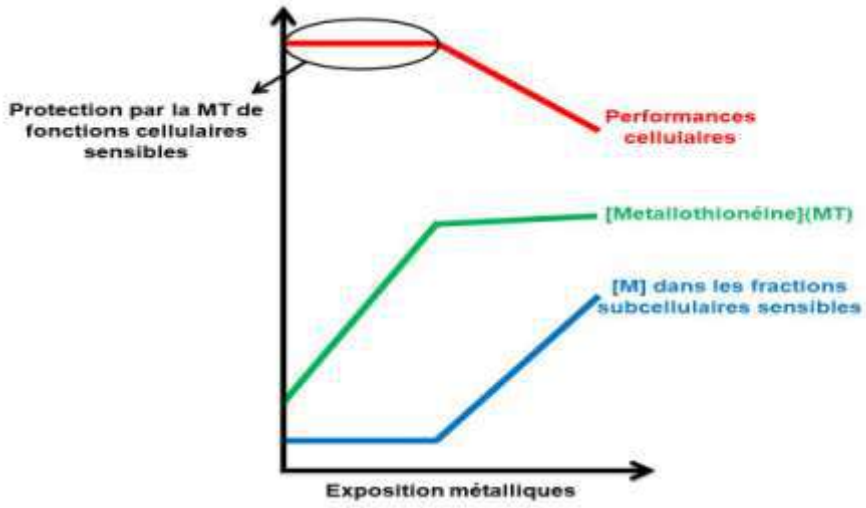


Figure I.2. Modèle classique de cytotoxicité (ou de débordement) cellulaire (d'après Giguère) [85].

I.4. Stress, défense et dommageoxydatif chez les mollusques bivalves

I.4.1. Stress oxydatif des ETM chez les mollusques bivalves

On appelle stress oxydatif une augmentation desespècesréactives de l'oxygène(ERO) qui provoque des dommages cellulaires irréversibles, telles que la peroxydation des lipides ou la dénaturation oxydante des acides aminés et des bases azotées [89]. En effet, les ions métalliques (essentiel/étranger) peuvent stimulerla production des ERO*via*deux mécanismes indirect (1) et direct (2). Dans le mécanisme (1), l'action toxicologique d'un métal, une fois accumulé, découle de son interaction anormale avec une biomolécule essentielle. Cette liaison d'un métal « inapproprié » à des molécules physiologiquement importantes peut induire des effets délétères de différentes manières : en bloquant des groupements fonctionnels essentiels de la biomolécule (souvent des groupements thiol) ; en déplaçant des métaux essentiels de leurs sites chez la biomolécule ; en modifiant la conformation (et donc l'activité) de la biomolécule [7,90] (Figure I.3). Pour le mécanisme (2), que certains métaux susceptibles de subir des changements cycliques de leur état d'oxydation (ions de fer, de cuivre, dechrome, de cobalt, d'arsenic, de titane, de vanadium et deleurs complexes) peuvent générer directement la production d'espèces réactives d'oxygène telles, $O_2^{\bullet-}$ et$OH^{\bullet}$dans le milieu intracellulaire, qui peuvent donner des électrons au H_2O_2, induire ainsi un stress oxydatif (Réaction de type Fenton). L'ion de métal oxydé

peut être réduit par une réaction avec $O_2^{\bullet-}$pour formerl'oxygène moléculaire, il résulte de la fission homolytique de liaison O-O du peroxyde d'hydrogène et peut aussi être produit par les réactions de Fenton et de Haber-Weiss :

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightleftarrows Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet} (\text{Réaction de Fenton}) (I.1)$$

$$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \rightleftarrows O_2 + Fe^{2+} (\text{Réduction du fer}) (I.2)$$

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightleftarrows OH^- + OH^{\bullet} + O_2 (\text{Réaction d}'\text{Haber} - \text{Weiss}) (I.3)$$

Effectivement, l'H_2O_2 joue un rôle d'intermédiaire dans la production de nombreux ERO et, également, pour la formation du radical hydroxyle, *via* l'oxydation de métaux de transition (réaction de fenton), ainsi, il peut réagir avec$O_2^{\bullet-}$, en présence de métaux de transition (catalyseurs), pour former également, *via* la réaction de Haber-Weiss, le radical $OH^{\bullet}$. Ce radical hydroxyle, présenté comme le plus toxique malgré sa faible diffusion, peut attaquer tous les types de constituants cellulaires et engendrer diverses altérations (dégradation protéique, inactivation enzymatique, lipoperoxydation, adduits à l'ADN, etc.) [7,90] (Figure I.3).

Métaux traces

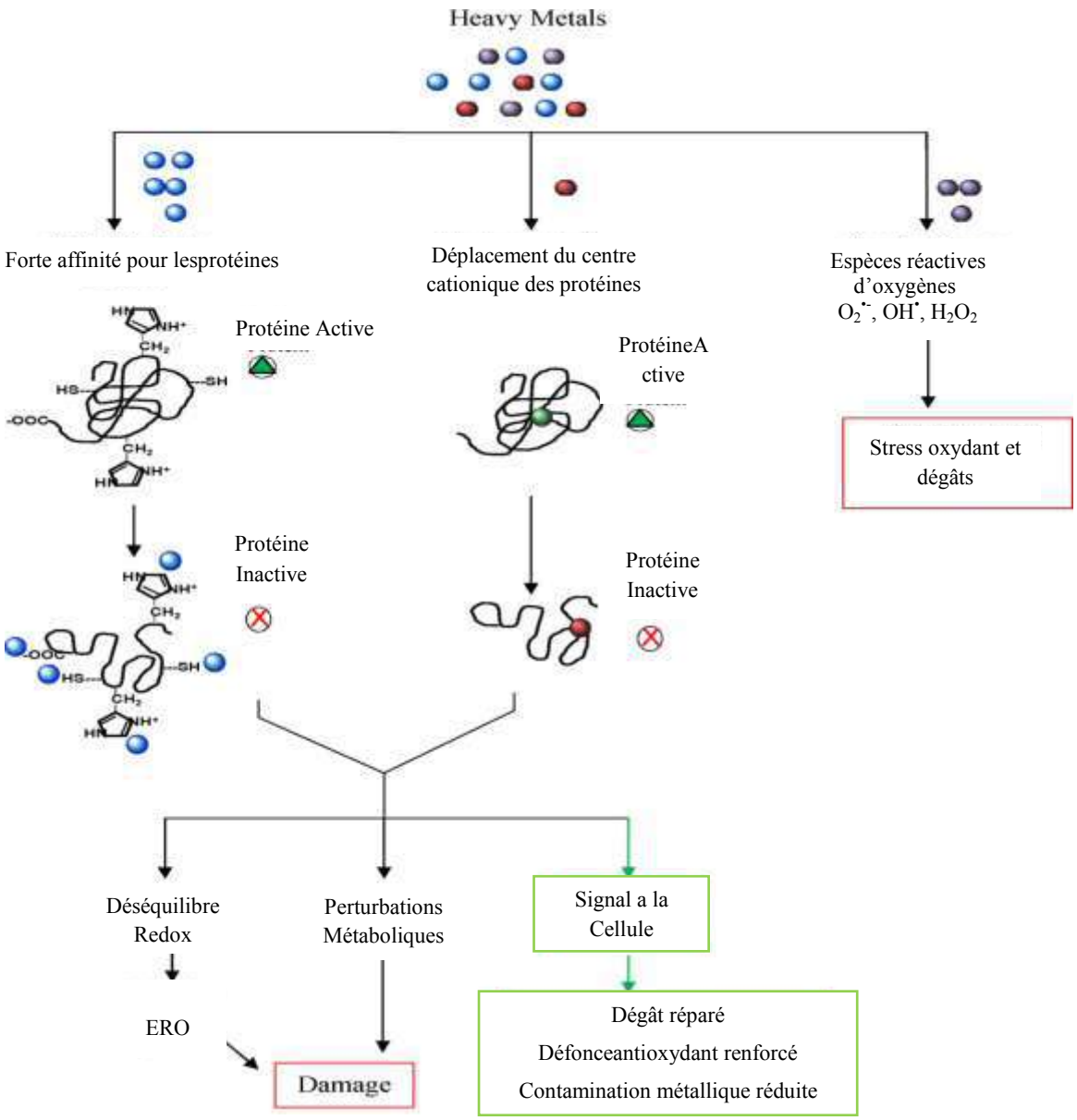


Figure I.3. Toxicité des métaux traces et le stress oxydatif chez l'organisme [91].

I.4.2. Défense et dommageoxydatif chez les mollusques bivalves

Pour se protéger contre le stress oxydatif, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydants (Figure I.4), qui visent : 1) à éliminer les espèces réactives et les catalyseurs de leur formation, 2) à induire la synthèse des antioxydants et 3) à augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées [7].

Protéine
Active

Dégât réparé
Défonce antioxydant
renforcée
Contamination
métallique réduite
et dégâts

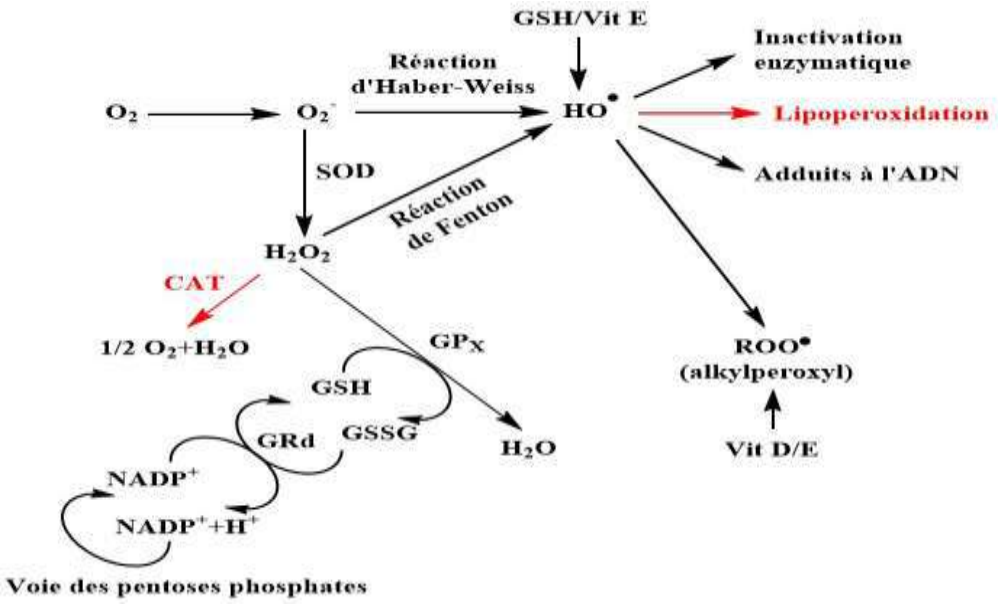


Figure I.4. Enzymes impliquées dans la défense oxydative[7].

En effet, les ERO peuvent être détoxifié par plusieurs systèmes antioxydants enzymatiques : (1) les superoxydes dismutase (SOD) metalloenzymes capables de dismuter l'anion superoxydes en peroxyde d'hydrogène. (2) les peroxydases qui catalysent la réduction conjointe d'un hydroperoxyde et d'un peroxyde organique (glutathion GSH), le maintien d'activité peroxydase implique le recyclage NADPH dépendant du glutathion réduit par une glutathion réductase, le NADPH étant produit par la voie des pentoses phosphatent. (3) les catalases, qui catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

Des antioxydants non enzymatiques agissant comme réducteurs ou capteurs de radicaux vont renforcer l'action des enzymes décrites précédemment. Parmi les réducteurs à fonction thiol libre, le glutathion joue un rôle très important. Le glutathion (tripeptide glutamyl-cystéinyl-glycine) est le thiol protéique le plus abondant dans les organismes vivants. Il est présent majoritairement à l'état réduit (GSH) dans les cellules ; une augmentation de la forme oxydée (GSSG) traduit un stress oxydatif. Il agit comme donneur d'électrons permettant d'éliminer les espèces réactives comme $OH^\bullet$ mais surtout comme substrat des glutathion peroxydases pour la réduction des peroxydes. Les vitamines D et E participent également à l'élimination des espèces réactives de l'oxygène et ce à différents niveaux [7, 90,92].

Récemment, plusieurs études suggèrent que les enzymes de biotransformation comme cytochrome P450 et glutathione-S-transferase (GST) joueraient un rôle antioxydant

potentiel protégeant les cellules concernées des dommages occasionnés par les radicaux libres[93,94]. En effet, les systèmes enzymatiques de détoxification prennent en charge les xénobiotiques dans le but d'augmenter leur hydrosolubilité afin de faciliter leur excrétion dans les fluides biologiques. Ils se déroulent dans le foie chez les vertébrés et principalement dans la glande digestive chez les invertébrés (mollusques). Deux types de réactions interagissent dans les mécanismes de la biotransformation. Les réactions dites de phase I, localisées essentiellement au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, consistent le plus souvent en l'oxydation du substrat par divers systèmes enzymatiques, en particulier les monooxygénases à cytochrome P450. Le métabolite produit, rendu plus hydrosoluble, peut alors être pris en charge par les réactions de phase II. Ces dernières greffent une molécule endogène très polaire sur le substrat oxydé, le rendant ainsi plus facilement excrétable (acide glucuronique, glutathion, sulfate, groupement méthyl,...) [92,95,96].

La déficience des systèmes de défense antioxydants à éliminer l'excès de ERO peut entrainer différents types de dommages cellulaires dont le plus largement étudié est la « peroxydation lipidique » ou « lipoperoxydation » (Figure I.4). Susceptible d'induire des altérations structurales et chimiques des mombranes cellulaires [34,92]. Le processus de peroxydation des lipides implique une chaine de réactions conduisant à la décomposition particulièrement des acides gras polyinsaturés plus sensibles aux réactions oxydantes. Leur dégradation induit la formation d'une grande variété de composés comme des radicaux lipidiques alcoxyles, des cétones, des alcanes, des époxydes et des aldéhydes dont le malondialdéhyde (MDA) est le plus important et le plus étudié. La plupart de ces composés sont toxiques et mutagènes. La peroxydation des lipides peut être initiée par les radicaux hydroxyles particulièrement dans les réactions catalysées par les métaux de transition [7,34,92] (Figure I.4).

I.5. Facteurs influençant la réponse biologique globale

Le lien entre la bioaccumulation et la toxicité est donc un peu complexe car il est influencé à la fois par la biodisponibilité et la physicochimie du milieu, mais également par l'état physiologique des organismes (Figure I.5) [40,79,80]. En effet, la totalité du métal accumulé n'est pas forcément sous une forme biologiquement active, qui signifie alors qu'une fraction du métal peut agir sur des cibles sensibles (sites actifs des biomolécules) et l'autre fraction peut être présente dans l'organisme sous forme détoxifié (sans effet) [97].

La bioaccumulation dépend des propriétés physicochimiques des contaminants, de l'espèce bioindicatrice et des conditions environnementales. Selon le modèle de ligan biotique (MLB), la réponse de l'organisme varie en fonction de trois paramètres, à savoir, la concentration du complexe métal-ligand {M-X-cellule} sur la surface de la membrane cellulaire, la concentration de l'ion métallique libre en solution [M^{z+}] et de la concentration des autres ions (Ca^{2+}, Mg^{2+} et H^{+}) qui pouvant concourir avec M^{z+} pour le ligand biotique. Aussi, la matière organique dissoute (MOD) et l'état physiologique de l'organisme exposé (taille, stade de maturité, capacités d'échange, etc.) peuvent influencer la bioaccumulation [7,39,98]. La figure I.5 schématise l'ensemble de ces paramètres et met en lumière la complexité des mécanismes de la réponse biologique chez les organismes aquatiques.

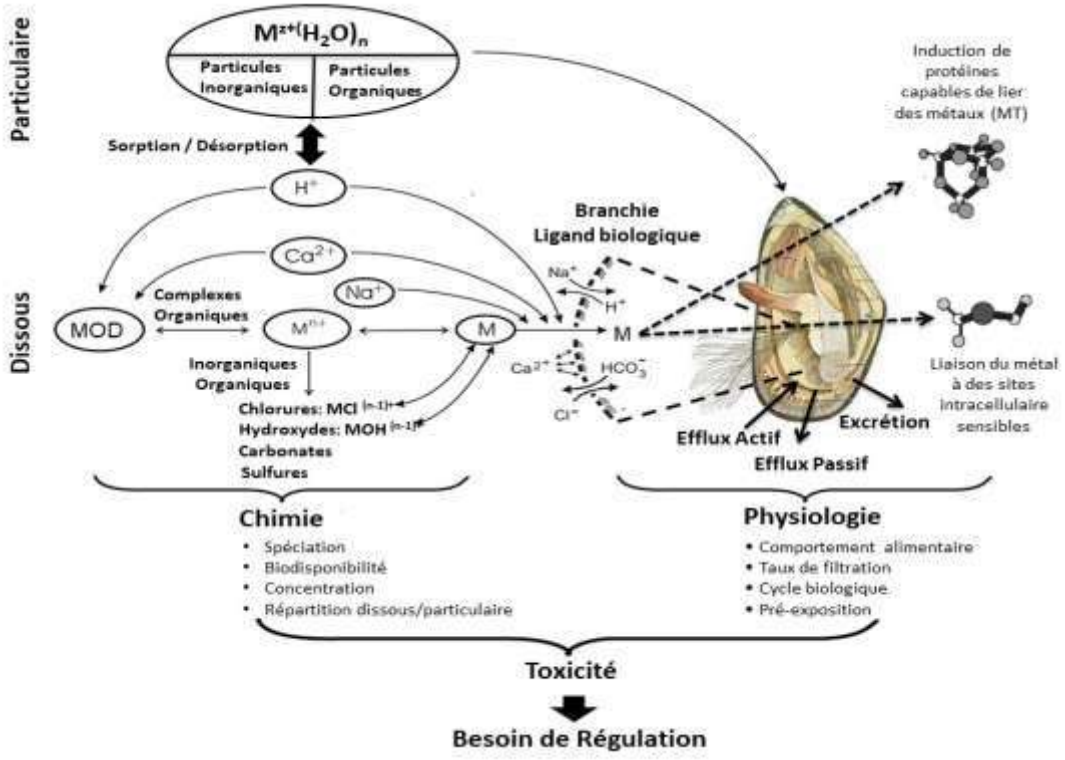


Figure I.5. Schéma de modèle de ligand biotique et les facteurs influençant la réponse biologique (Bioaccumulation-Toxicité) (modifié d'après Pelletieret al.etPaquin et al.) [7,99].

I.6. Ecotoxicologie et moyens d'évaluation de la pollution marine

L'écotoxicologie est définie comme étant la science qui traite l'impact des composés chimiques sur les écosystèmes. Cette science, qui intègre la chimie, la toxicologie et l'écologie, a fait ses premiers pas il y a un peu plus de trente ans lorsque le professeur René Truhaut a défini cette nouvelle discipline comme « une branche de la toxicologie

concernée par l'étude des effets toxiques causés par les polluants sur les constituants des écosystèmes » [100].

Plus tard, Pelletier et al. [7], a défini l'écotoxicologie moléculaire comme une branche de l'écotoxicologie qui traite tout particulièrement des mécanismes fondamentaux de la défense cellulaire face aux stress du milieu et de l'application de la biochimie et de la biologie moléculaire aux problématiques environnementales complexes auxquelles notre société est quotidiennement confrontée.L'écotoxicologie regroupe des études physicochimiques et des études biologiques afin de déterminer la qualité du milieu [101]. L'approche biologique complète efficacement l'approche chimique en se basant sur l'étude de la réponse biologique des organismes aux polluants, par la mesure de paramètres biochimiques, physiologiques, moléculaires, cellulaires et comportementaux [31,102-104].

Ces deux approches (physicochimique et biologique) sont complémentaires et indispensables pour un bon diagnostic de l'état de lieux de la pollution du milieu marin [31,104]. En d'autres termes, c'est l'association de ces deux approches qui permet d'évaluer de façon précise l'état des milieux et des organismes qui y vivent [31,32] (Figure I.6).

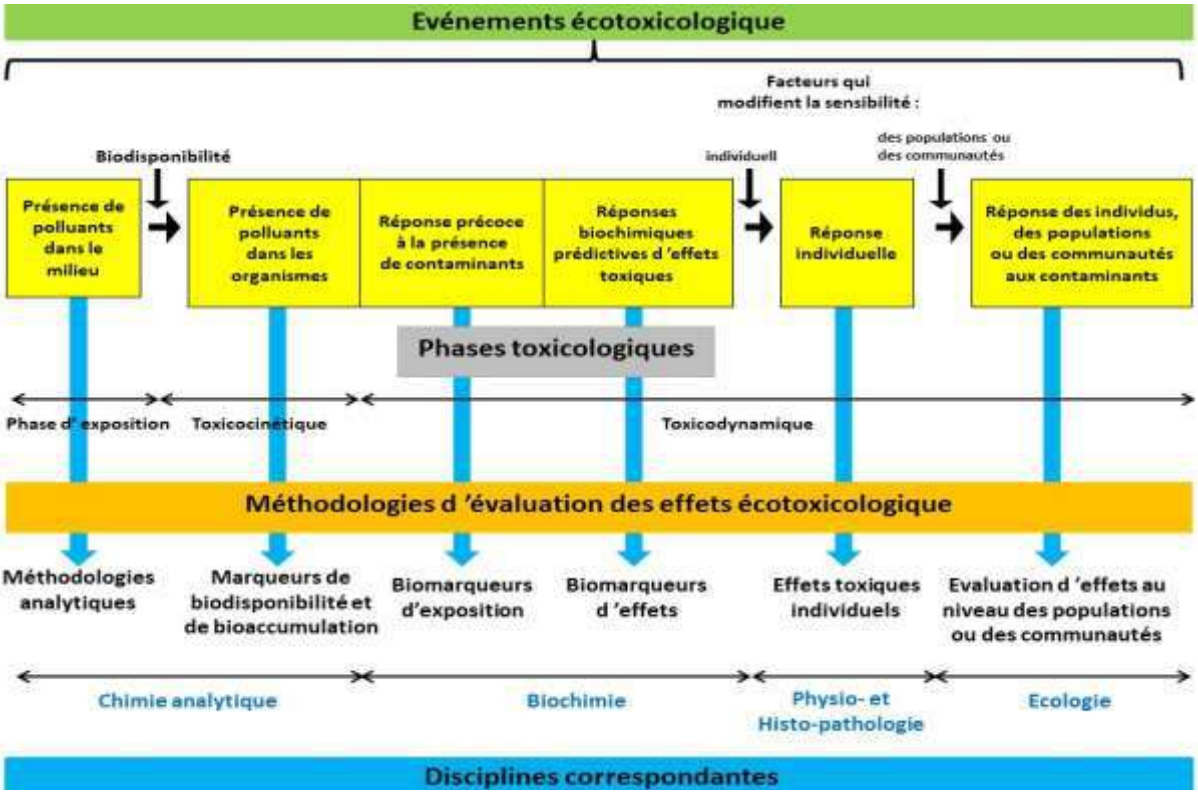


Figure I.6. Représentation des méthodologies permettant d'évaluer les risques écotoxicologiques (modifié d'après un diagramme de Lagadic et al.) [33].

I.6.1. Essais écotoxicologiques en milieux aquatiques

L'évaluation des effets toxiques des contaminants chimiques *vis-à-vis* de la faune marine est en partie basée sur la réalisation dans le laboratoire des essais de toxicité (bioessais ou biotests).

En effet, l'objectif d'un bioessai est d'évaluer, dans des conditions expérimentales précises, l'écotoxicité potentielle d'une substance chimique ou de tout autres contaminants *vis-à-vis* des organismes vivants. Ces tests écotoxicologiques au niveau du laboratoire ont fait l'objet d'une standardisation normalisée afin de fournir des outils adaptés à l'évaluation des dangers des substances chimiques dans la démarche de l'évaluation des risques [57,105].

À cet effet, ces tests écotoxicologiques sont classés selon le type d'exposition (aiguë ou chronique) mais aussi selon le niveau d'observation des effets (intracellulaire, cellulaire, au niveau de l'organisme entier, au niveau des populations ou encore des communautés puis de l'écosystème). Différents critères d'effets peuvent être mesurés : Mortalité, croissance, reproduction, activités enzymatiques comme les biomarqueurs de stress et dommage oxydatif, génotoxicité et mutagénécité [7,28,57,105,106].

I.6.1.1. Bioessais de létalité (CL_{50} et DL_{50}) et bioessais effectifs (CE_{50})

Les tests de toxicité aiguë sont des essais à court terme (quelques minutes, heures à quelques jours en fonction du cycle de vie de l'organisme) après exposition à une dose unique ou à une série croissante de concentration d'un polluant.

Ces essais permettent d'établir une relation entre la concentration d'exposition et l'intensité de l'effet, généralement exprimée par la Concentration Létale (CL_{50}), Dose Létale (DL_{50}) ou la CE_{50}(Concentration Effective), pour lesquels les effets sont observés pour 50% des individus testés. Ces tests de détermination des CL_{50} ou des DL_{50} dans des expositions à court terme sur des organismes de référence (daphnies ou truitelles par exemple) ont été normalisés et constituent un type de bioessais très répondus en écotoxicologie [7,105-108].

Parmi les méthodes utilisées pour la détermination de la CL_{50} est la méthode de Probit[106].

I.6.1.1.1. Fonction de Probit

La relation entre la dose (en échelle logarithmique) et la mortalité (en pourcentage) donne une courbe sous forme sigmoïde (forme S) qui rend l'estimation de la CL_{50} sujette à une forte erreur [105,109].

Pour une exposition unique, la méthode de Probit fournit une méthode de transformation pour convertir la courbe logarithmique dose-réponse en une droite. La variable de Probit Y est reliée à la probabilité P par la formule de Finney [110]. L'équation de la variable de Probit Y est basée sur une variable causale, V (représentant la dose), et au moins deux constantes (K_1 et K_2). Ces équations linéaires sont de la forme suivante [109] :

$$Y= K_1+K_2\log (V) \quad (I.4)$$

Cette fonction Probit peut servir donc à calculer la probabilité de mortalité quand des organismes sont exposés à des substances toxiques. Aussi, l'application de la transformation de Probit est valide pour des données ayant une distribution normale [106, 109,111]. Ainsi, il est nécessaire que les données doivent renfermer au moins deux mortalités entre 0 et 100% pour appliquer le modèle [111]. Enfin, il est nécessaire avant de déterminer la CL_{50} de corriger la mortalité naturelle dans l'essai témoin. Celle-ci ne doit pas dépasser 10% (≤ 10%) pour considérer un bioessai est valide. Abbott [112] a proposé la correction suivante :

$$P_c= (P_0-P_t)/ (100-P_t)\times 100 \quad (I.5)$$

Avec : P_c = Mortalité corrigée,

P_0 = Mortalité observée,

P_t = Mortalité témoin.

Le développement des logiciels de traitement statistique des données permet d'avoir le tracé direct des données et déduire les paramètres de toxicité (comme CL_{50}) par rapport à la méthode classique qui est basée sur le calcul manuel et les tables de Probit donnant la transformation des pourcentages de mortalité en Probit pour chaque concentration correspondante [106,109,111].

L'intervalle de confiance renseigne sur la variation d'un essai particulier. Il est plus étroit à la CL_{50} et il s'élargit aux taux supérieurs et inférieurs de l'effet [111]. Elle permet d'estimer la variation interne des résultats de l'essai. Un intervalle de confiance large indique que la CL_{50} estimée comporte une plus grande incertitude. La fiabilité de la CL_{50} estimée est faible et son utilité risque d'être limitée. Un intervalle de confiance étroit indique que la CL_{50} estimée comporte une petite incertitude. La CL_{50} estimée est fiable et d'une bonne utilité. Autrement dit, s'il fallait répéter l'essai principal, la nouvelle CL_{50} estimée devrait avoisiner la première CL_{50} estimée et ces deux estimations devraient

avoisiner la CL_{50} initiale [111,113]. Aussi, il est préférable de joindre avec les paramètres de toxicité, la valeur de Khi-deux qui exprime la qualité de l'ajustement [111,114].

I.6.1.2. Biomarqueurs et analyse de la toxicité : Concept générale

Les biomarqueurs sont apparus en écotoxicologie dans les années quatre-vingts [33]. En effet, l'écotoxicologie utilise les biomarqueurs pour mettre en évidence de façon précoce une pollution [101]. Le concept de biomarqueurs se définit comme une réponse au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale d'un organisme suite à l'exposition présente ou passée à un polluant [33].

Ces réponses constituent un système d'alarme précoce de la santé de populations naturelles sous forme d'un signal intégré du stress [115]. En écotoxicologie, les biomarqueurs ont été classés en biomarqueurs d'exposition, d'effets et de susceptibilité [33,34]. Tandis que De Lafontaine et al. [116] ont classé les biomarqueurs en deux catégories : les biomarqueurs de défense et les biomarqueurs de dommages (Tableau I.4). Cette classification est désormais adoptée par plusieurs écotoxicologistes [34].

Actuellement, les écotoxicologistes se sont intéressés à cette nouvelle approche méthodologique dans la surveillance de l'environnement. Cette biosurveillance (biomonitoring) s'attache directement aux effets des xénobiotiques sur les populations, les communautés et les écosystèmes exposés [7,34,117].

Tableau I.4. Les différents types de biomarqueurs et quelques exemples [34].

Catégories de BM	Description	Exemples
De défense	Réaction de défense d'un organisme exposé à un contaminant.	- Défense antioxydantes, - Enzyme de phase II (GST), - Métallothionéines (MT), - EROD.
De dommage	Altération directe causée à l'organisme par les contaminants toxiques.	- Peroxydation lipidique (MDA), - Acétylcholinestérase (AchE), - Stabilité de la membrane lysosomale, - Vitellogénine - Dommage de l'ADN.

En effet, dans le domaine de l'environnement, la biosurveillance (active ou passive) se définit comme « l'utilisation des réponses à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique, écologique) d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une dégradation de l'environnement et pour en suivre son évolution » [33,118].

En outre, la biosurveillance englobe d'autre concepts tels que:

1) les bioindicateurs (espèces ou groupes d'espèces qui, par leur présence et/ou leur abondance, sont significatifs d'une ou de plusieurs propriétés de l'écosystème),

2) les bioaccumulateurs (organismes, par leur mode de vie et/ou leurs caractéristiques physiologiques et métaboliques, ayant la capacité d'accumuler certains contaminants directement à partir du milieu ambiant ou par d'autre voie (nourriture) jusqu'à des niveaux nettement supérieurs au niveau de contamination du milieu extérieur (eau, sédiment, atmosphère, etc)).

L'intérêt d'utilisation de biomarqueurs pour suivre la qualité des milieux présente l'avantage d'une évaluation de plusieurs polluants biodisponibles. C'est une évaluation intégrée dans le temps et dans l'espace, non seulement en termes de présence, mais également par rapport aux effets résultants de ces polluants sur les populations (animales, végétales ou microbiennes) [31].

À cet effet, plusieurs auteurs proposent ces biomarqueurs comme un outil fiable dans les études de biosurvaillance qualitative et quantitative des éléments en trace métalliques (ETM) de l'environnement marin par les mollusques bivalves [119-123]. Aussi, le développement de ces outils diagnostiques est primordial dans le cadre de l'évaluation des risques en écotoxicologie [7,124].

Par ailleurs, le handicap principal à l'utilisation des biomarqueurs dans le milieu naturel demeure à l'interférence avec d'autres facteurs abiotique (température, pH, salinité, oxygène dissout) et biotiques (sexe, index gonadosomatique), ces facteurs, parfois regroupés sous l'expression « facteurs de confusion » [31,125].

Effectivement, l'utilisation de biomarqueurs pour suivre l'évolution de la qualité de l'environnement impose que les écosystèmes soient caractérisés avec précision à la fois de point de vue physico-chimique et écologique. En effet, la connaissance des facteurs de variations naturelle des biomarqueurs est fondamentale pour distinguer le signal d'une perturbation causée par des polluants du « Bruit de fond » que constituent les fluctuations naturelles des biomarqueurs.

Dans le cadre des expérimentations en conditions contrôlées, l'influence des facteurs autres la contamination par des polluants peut être facilement réduite ou, à défaut, caractérisée avec une précision relativement satisfaisante [31].

I.6.1.2.1. Bioessais basés sur les biomarqueurs chez les mollusques bivalves

Récemment, les expérimentations en conditions contrôlées ont démontré que les biomarqueurs peuvent être utilisés pour évaluer l'exposition des individus à des xénobiotiques et déterminer leurs effets sur les structures et les fonctions vitales de l'organisme [33,43,125,126].

Les mollusques bivalves se manifestent par une réponse antioxydante *vis-à-vis* à une contamination métallique. Cette réponse est traduite par l'induction de plusieurs antioxydants mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène [7,28]. Certaines études sur le stress oxydatif chez les bivalves (*Perna viridis*), exposés au cuivre, zinc et au cadmium, sont répertoriées dans le tableau I.5 en rappelant les conditions d'exposition et les tissus étudiés [127,128].

Les enzymes indiquées ci-dessous (Tableau I.5) ont été proposées comme biomarqueurs de stress oxydatif dans des programmes de surveillance environnementale [34,129]. Ces bioessaies ont permis d'envisager l'utilisation des biomarqueurs dans le milieu naturel, notamment dans le cadre des programmes de surveillance de la qualité de l'environnement [31]. Ainsi, tous ces bioessaies (biomarqueurs et bioindicateurs) ainsi que leurs exploitations dans des études intégrées sur mésocosmes (renfermant la faune, la flore, sédiments, microorganismes etc.) au laboratoire et *in situ* sont des approches complémentaires pour l'évaluation des risques écotoxicologiques [6,129,130].

Tableaux I.5. Modification de l'activité des enzymes antioxydantes chez *Pernaviridis* exposée au cadmium, cuivre et au zinc[127,128].

Métaux	Temps	Tissus/Organe	Réponse Biochimique
Cadmium (CL_{50}) (0.5 $mg.L^{-1}$)	1j, 7j, 15j et 30j	GD, BR, ME	↑ CAT, ↑ GST, ↑ MDA

Cuivre 10 ,15 ,23 ,34 ,51 ($\mu g.L^{-1}$)	30j	Tissus totaux	↑ CAT, ↑GST, ↑ MDA
Zinc 8, 15, 32, 64, 128 ($\mu g.L^{-1}$)	30j	Tissus totaux	↑ CAT, ↑GST, ↑ MDA

(Augmentation (↑), diminution (↓) par rapport aux témoins)

D'autres espèces appartenant au même genre des mollusques bivalves ont été utilisées dans les études de toxicologie de l'environnement marin comme *Mytilus galloprovincialis, Mytilus edulis, Perna perna, Ostrea edulis, Crassostrea gigas, Ruditapes decussatus, Donax trunculus*[3,7,9,21,28,43].En Algérie, *Mytilus galloprovincialis,* est une espèce très commune que l'on rencontre dans la majorité des élevages de moules comme : la Ferme mytilicole (Culture Marine) à Kouali 3-Tipaza, l'élevage aquacole méditerranée (EAM), Ain Tagourait -Tipaza, et ORCAmarine, Ain Taya-Alger, ou dans leur milieu naturel dans les zones rocheuses comme : Fouka -Tipaza et Zéralda- Alger. Cette espècecohabite avec le genre *Pernaperna* comme la plage de Figuier Boumerdes Algérie [43,126].

En Algérie, peu de travaux de recherches se sont intéressés àl'utilisation des réponses biologiques (bioaccumulation ou biomarqueurs) des organismes marins, telles que les mollusques bivalves « *M. galloprovincialis »* ou niveau de laboratoire (bioessai) ou sur le terrain (biosurveillance) dans la surveillance de la qualité du milieu marin. Le tableau I.6 résume quelques travaux réalisés en Algérie relatifs à ces tests de biosurveillance ou bioessai par l'utilisation des mollusques bivalves marins.

Tableaux I.6. Quelques travaux locaux de bioessai et biosurveillance.

Type de l'expérience et les Réponse Biologiques	Espèces	Polluants / Contaminants	Établissement / Année
Biosurveillance (Bioaccumulation)	*Donax trunculus*	ETM	Univ- Annaba 2006 [131]
Biosurveillance (Biochimiques)	*Donax trunculus*	Pollution mixte	Univ- Annaba 2007 [132]
Biosurveillance (Bioaccumulation)	*Mytilus. galloprovincialis*	ETM	Univ-Oran 2007 [71]

Bioessai (Biochimiques)	*Mytilus. galloprovincialis*	Colorants	Univ- Blida 2014 [133]
Bioessai (Biochimiques)	*Perna perna*	ETM	Univ- Blida 2014 [43]
Biosurveillance (Biochimiques/Bioaccumulation)	*Perna perna*	ETM Bactéries	Univ- Blida 2015 [134]
Bioessai (Physiologique)	*Perna perna*	ETM	Univ- Blida 2016 [135]

-Suite de tableau-

Biosurveillance (Bioaccumulation/Biochimiques)	*Mytilus. galloprovincialis*	ETM, HAP PCB	Univ- Oran 2017 [136]
Bioessai (Biochimiques)	*Mytilus. galloprovincialis* *Perna perna*	Pollution mixte	Univ- Blida 2020 [137]
Biosurveillance (Biochimiques)	*Mytilus. galloprovincialis* *Perna perna*	Pollution mixte	CNRDPA 2020 [138]
Biosurveillance (Bioaccumulation)	Physiologique *galloprovincialis*	Radioélément	Univ- Mostaganem 2021 [139]
Biosurveillance (Bioaccumulation)	*Mytilus. galloprovincialis*	ETM	Univ- Mostaganem 2021 [140]
Bioessai (Bioaccumulation)	*Mytilus. galloprovincialis*	ETM	Univ-Média 2021[141] Présente Étude
Biosurveillance (Bioaccumulation)	*Mytilus. galloprovincialis* *Perna perna*	ETM	ENSSMAL 2021 [74]
Bioessai (Biochimiques)	*Mytilus. galloprovincialis* *Perna perna*	ETM	CNRDPA 2022 [126]

I.6.1.2.2. Biomarqueurs étudiés

- **La catalase (CAT)**

La catalase (CE 1.11.1.6) est une hémoprotéine tétramérique avec un atome de fer par sous-unité, a une masse d'environ 220 kDa. La catalase est une enzyme peroxysomale et présente sous plusieurs isoformes, dont le rôle est de prévenir la peroxydation des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée (H_2O_2). Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante [142-145] :

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} O_2 + 2H_2O \quad \text{(I.6)}$$

Durant le métabolisme chez les organismes aérobies, la CAT connue pour sa fonction d'élimination du peroxyde d'hydrogène, mais aussi pour être induite par divers polluants organiques générant un stress oxydatif (HAP, PCB,pesticides et les métaux traces)[43,146,147]. Par ailleurs, les travaux effectués sur les biomarqueurs de stress oxydatif au laboratoire et surtout *in situ* montrent que cette activité enzymatique serait très sensible aux facteurs environnementaux et le caractère non spécifique de leur réponse constitue un avantage comme indicateur d'un état de pollution mixte [147-150].

- **La glutathion S Transferase (GST)**

La GST (CE.2.5.1.18), une enzyme de biotransformation de phase II et présente sous plusieurs isoformes, catalyse la réaction de conjugaison des xénobiotiques à caractère lipophile et de leurs métabolites avec un ligand endogène polaire (GSH) [151]. En effet, la GST catalyse l'attaque nucléophile de l'atome de soufre du GSH sur un composé électrophile pour donner des conjugués X-SG. Cette réaction est la première étape de la formation des acides mercapturiques [151], qui sont des composés N-acétylés dérivés de composés électrophiles. Cette voie permet la détoxication des composés chimiques en les rendant plus hydrophiles [152].

Effectivement, l'addition se fait soit directement sur les groupements fonctionnels du xénobiotique et dans ce cas, la molécule est directement métabolisée par la GST, soit, lorsque la molécule ne possède pas de groupement fonctionnel qui permet cette réaction, sur les groupements hydrophiles générés au cours de la phase-I par l'action préalable des monooxygénases à cytochrome P450(Figure I.7) [151,152,153].

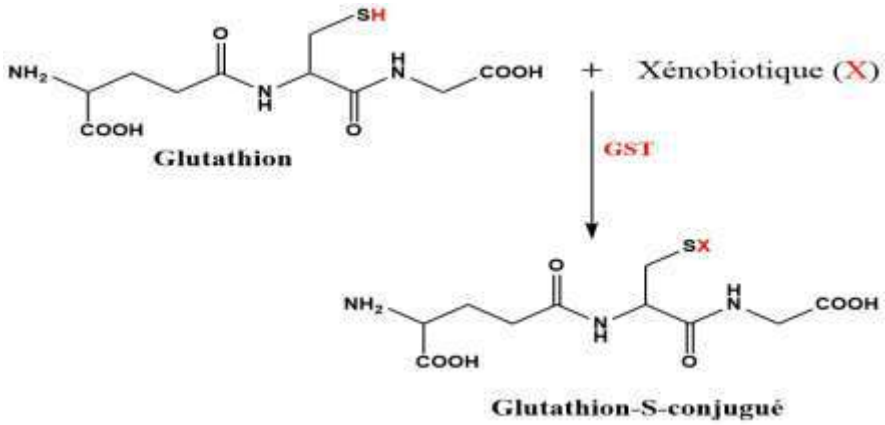


Figure I.7.Mécanisme de détoxication des glutathion S-transférases (GST) [153].

La GST jouent donc un rôle majeur dans la neutralisation et la détoxication de certains xénobiotiques en augmentant leur hydrosolubilité et en facilitant ainsi leur élimination [101]. Récemment, plusieurs études suggèrent que les GST jouent également un rôle dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif et la détoxication des produits réactifs issus de la lipoperoxydation [154,155].

En effet, à côté des GST cytosoliques qui sont impliquées dans la détoxication des composés électrophiles, il a été mis en évidence l'existence d'une forme membranaire de GST. Cette isoenzyme qui est activée par les espèces réactives de l'oxygène que sont les peroxydes d'hydrogène et l'anion superoxyde, participe à la protection cellulaire *vis-à-vis* des altérations induites par des molécules oxydantes [156].

La GST microsomale participe également à la détoxication des produits réactifs issus de la lipoperoxydation [157]. L'expression de la GST a été montrée en laboratoire et *in situ* chez mollusques bivalves exposées au pesticides, métaux traces et hydrocarbures [158,159]. Cette particularité en fait une activité intéressante en tant que marqueur biochimique d'exposition.

- **Malondialdéhyde (MDA)**

C'est un produit issu de la dégradation complète des lipides en présence des ERO [34,92] (Figure I.8). Aussi, c'est un agent alkylant puissant capable de réagir avec les macromolécules biologiques, notamment, les lipides membranaires. Le taux de MDA est proportionnel à l'extension de la peroxydation lipidique [160].

En effet, la peroxydation lipidique conduit à une dénaturation des acides gras polyinsaturés des membranes (AGPI)(Figure I.8). Lorsque les systèmes antioxydants deviennent inefficaces à enrayer les agressions toxiques des contaminants (inorganiques et

organiques), les dommages cellulaires peuvent être estimés par le taux de MDA [28,92,161].

Ce biomarqueur constitue une méthode de mesure simple du stress oxydatif en peroxydation lipidique [162,163]. Les travaux de biomonitoring (passive ou active) ontlargementdémontré que le dosage de MDA chez les mollusques bivalves présente un intérêt *vis-à-vis* des contaminations multiples [164-167].

De plus, de forts taux de MDA ont déjà été observés chez des mollusques bivalves ayant été exposés à la présence de métaux traces dans le milieu tels que *Mytilus galloprovincialis*[122, 166]et *Pernaviridis* [127,168].

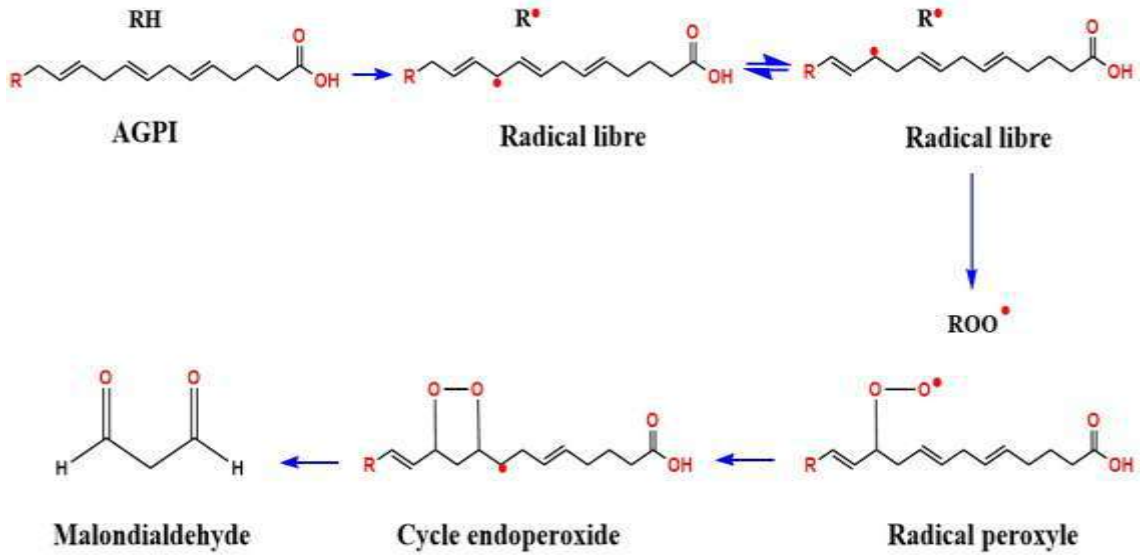


Figure I.8. Formation de MDA par peroxydation lipidique [169].

I.6.2. Modélisation en écotoxicologie

I.6.2.1. Modélisation par les approches « équilibre et cinétique »

En écotoxicologie, les modèles toxico-cinétiques/toxico-dynamique (TK/TD) sont des outils mathématiques utilisés pour évaluer le risque environnemental des éléments traces métalliques au cours du temps, couplant les évaluations de l'exposition et des effets. En effet, l'étude de la toxico-cinétique (TK) est réalisée pour établir le lien entre la concentration d'exposition et la concentration bioaccumulée par l'organisme. Par la suite, l'étude toxico-dynamique (TD) est réalisée pour établir le lien entre la concentration du contaminant bioaccumulé dans l'organisme et sa toxicité [39,40].

Les modèles cinétiques (modèle cinétique à compartiment et modèle cinétique à base physiologique) et le modèle d'équilibre sont utilisés pour évaluer la bioaccumulation des contaminants du milieu dans les organismes aquatiques [170]. Le modèle cinétique à

compartiment décrit les flux d'un contaminant entre deux compartiments (eau et l'organisme). Ce modèle repose sur une cinétique d'ordre un, où l'organisme est considéré comme un compartiment homogène, caractérisé par un taux d'entrée et un taux de sortie du contaminant. Cependant, le modèle cinétique à base physiologique prend en compte la physiologie de l'organisme en intégrant clairement la notion de taux d'ingestion de la nourriture (TI), d'efficacité d'assimilation (EA), ainsi que le taux croissance des organismes (TC).

Par contre, le modèle d'équilibre repose sur l'hypothèse que l'organisme est dans un état stationnaire avec son milieu environnementale (l'exposition et les facteurs environnementaux et physiologiques affectant l'accumulation et l'excrétion du contaminant restent constants pendant un temps suffisant). Dans ces conditions simplifiées, l'état stationnaire est généralement décrit par le facteur de bioconcentration (FBC) qui correspond au rapport de la contamination de l'organisme sur celle du milieu. Ce facteur est utilisé pour évaluer la bioaccumulation des contaminants du milieu dans les organismes aquatiques pour divers métaux (Cr, Ag, Se, Cd, Zn, Co, Ni) chez les mollusques bivalves marins et dulçaquicoles [170].

Récemment Yen Le et al.[40], ont modélisé la toxico-cinétiques/toxico-dynamique chronique du cuivre dans la moule *Mytilus galloprovincialis* en tenant compte de l'homéostasie régulatrice des ions et du stress oxydatif. En effet, le terme de « modèle toxico-cinétique » [170,171] utilisé dans la littérature scientifique peut aussi apparaître sous les termes de « modèle biodynamique» [172], « modèle bio-cinétique » [173], « modèle bioénergétique » [174] ou encore « modèle à base bioénergétique » [175].

Ainsi, parmi les modèles cinétiques à base physiologique, le modèle biodynamique est le plus communément utilisé pour évaluer la bioaccumulation chez les organismes aquatiques [172]. De ce fait, il a été étudié pour divers métaux (Cr, Ag, Se, Cd, Zn, Co, Ni) chez mollusques bivalves marins et dulçaquicoles [80].

I.6.2.2. Modélisation et optimisation par les plans d'expérience

L'idée originale dans cette thèse est de combiner les plans d'expérience (PE) avec les réponses biologiques dans le but de modéliser et optimiser ces réponses biologiques et les interactions écotoxicologiques.

En effet, dans l'approche modélisation-optimisation par les plans d'expérience, la moule est considérée comme un système fermé dans lequel, seules sont prises en compte les entrées et les sorties, appelées respectivement : facteurs (qui correspondent aux

grandeurs chimiques modifiables par l'expérimentateur et sensées influer sur les variations de la réponse) et réponses (qui correspond à la grandeur biochimique ou physiologique étudiée). Les processus biochimiques internes dans la moule sont totalement ignorés (Figure I.9).

Effectivement, cet outil mathématiquecherche à déterminer la relation entre les réponses et les facteurs (phase de modélisation). Ainsi, la détermination de la (ou des) combinaison(s) de facteurs conduit à une optimisation de la réponse et aussi la mise en évidence des éventuelles interactions entre les facteurs. Avec les plans d'expériences on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences [176,177].

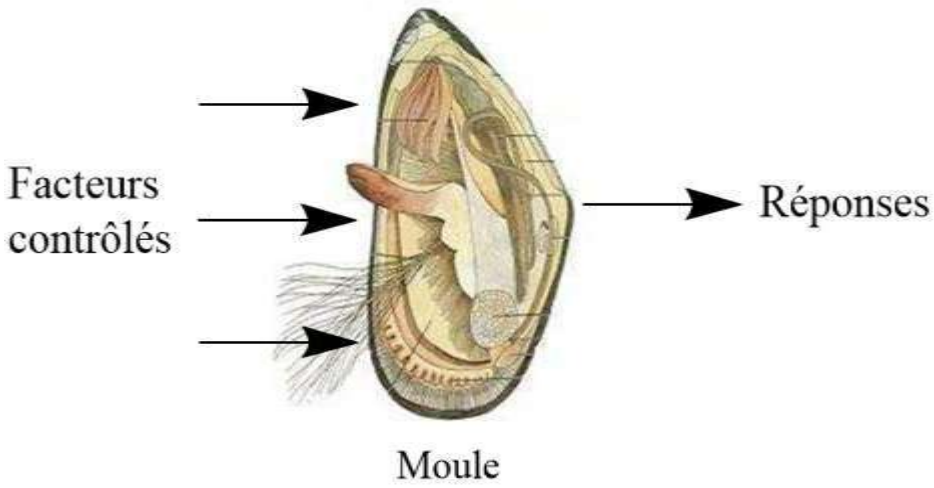


Figure I.9. Représentation en boîte noire du processus biologique.

Différentes méthodes de plans expérimentaux existent [176,177]. Citons, entre autres, le plan de surface de réponse. Néanmoins, cette dernière méthode est un ensemble de techniques de plan d'expériences qui permettent de mieux comprendre et d'optimiser la réponse. Les plans composites centrés (central composite design : CCD) et les plans de Box-Behnken sont les principaux types de plans de surface de réponse [178].

En outre, le plan composite à faces centrées (CCF) est un type de plan composite centré avec une valeur d'alpha (α) de 1 (Figure I.10). Dans ce plan, les points axiaux se trouvent au centre de chaque face de l'espace factoriel ; par conséquent, les niveaux sont égaux a + 1 [179].

Aussi, chaque facteur est représenté sur un axe orienté, prenant des valeurs à l'intérieur de son domaine de variation. Ce dernier est limité par un niveau bas noté par -1 et un

niveau haut noté par $+1$. Les k axes sont orthogonaux entre eux deux à deux et constituent une base de l'espace vectoriel R^k, de dimension k, appelé espace expérimental.

La réunion des domaines de variation de chaque facteur définit le domaine d'étude. Ce domaine d'étude (appelé aussi domaine expérimental prospecté) est la partie de l'espace expérimental que l'expérimentateur a retenu pour faire ses essais. Une étude (c'est-à-dire un ensemble d'expériences bien définis) est représentée par une série de points disposés dans le domaine d'étude [179,180].

I.6.3. Modèle biologique

Selon Lubet [181], la position systématique de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lmk, 1816) s'établit comme suit :

Règne : Animalia
Sous- règne : Métazoaires
Phylum : Mollusca
Classe : Lamellibranches ou Bivalvia
Sous-classe : Ptériomorphes
Ordre : Filibranchiata
Superfamille : Mytiloidea
Famille : Mytilidae
Genre : Mytilus
Espèce : *Mytilus galloprovincialis*

L'anatomie de cette espèce est fournie sur la Figure I.11.

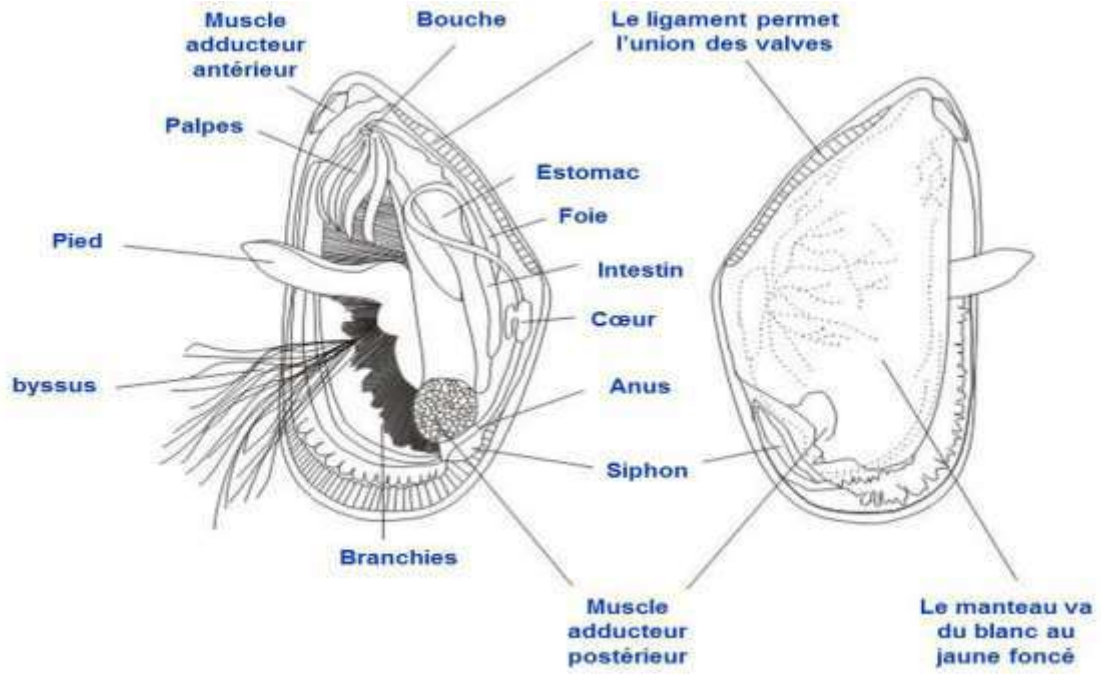


Figure I.10: Anatomie de la moule *Mytilus galloprovincialis* [182].

Les mollusques, et plus particulièrement les bivalves, sont parfaitement désignés pour être employés comme espèces sentinelles dans la biosurveillance de la pollution et les bioessais. On les considère parmi les organismes qui accumulent le plus de polluants dans l'environnement (un facteur de bioaccumulation de l'ordre de 10^5a été rapporté dans certains cas chez *Mytilus edulis*)[183].

Les mesures des contaminants chimiques dans les tissus de bivalves fournissent une évaluation de la biodisponibilité. En effet, celles-ci ne sont pas apparentes dans des compartiments tels que l'eau, les particules en suspension ou le sédiment. Aussi, ces organismes sont des bioindicateurs utilisés pour révéler précocement la présence et la toxicité d'un ou plusieurs polluants dans le milieu [184].

Différents critères sont pris en compte pour le choix des mollusques bivalves en tant qu'espèces sentinelles, à savoir :

- Leur large distribution géographique, qui permet les comparaisons entre différents sites.

- Leur abondance, qui permet de réduire l'impact des prélèvements sur la structure et la densité de la population mais également de faciliter les prélèvements.

- Leur sédentarité, afin que l'état des individus puisse être directement corrélé avec le niveau de pollution du site [92,185].

Le mollusque bivalve *Mytilus galloprovincialis* a été utilisé pour la réalisation de notre présent travail. L'aire de répartition de cette espèce s'étend sur la côte atlantique depuis la baie d'Agadir (Maroc) jusqu'aux iles britanniques et englobe aussi l'ensemble du bassin méditerranéen, l'Afrique du Sud, la Nouvelle-Zélande et la Californie [186,187].

I.6.3.1. Biologie et écologie de la moule *Mytilus*

Les moules, comme la plupart des bivalves, sont des microphages qui se nourrissent de plancton et de particules de matière organique en suspension dans l'eau qu'elles filtrent [188]. Les branchies constituent l'organe clé dans la mesure où elles assurent la filtration. Leur forme en lamelles et les battements de leurs cils permettent l'acheminement des divers éléments nutritifs contenus dans l'eau de mer vers le tube digestif. Le taux de filtration est évalué par le volume d'eau que filtre un individu en $mL.min^{-1}.g^{-1}$ de poids sec (chez un individu adulte de 50 à 60 mm = 40 à $100mL.min^{-1}.g^{-1}$de poids sec à 26°C et à faible concentration algale). Cette propriété de filtration peut être influencée par de facteurs intrinsèques et le stress environnemental exercé par le milieu (extrinsèques) et est utilisée comme un indicateur biologique témoignant d'un stress général sur ces organismes [82,95,189,190].

Aussi, la croissance constitue un indicateur physiologique (détermination du rapport entre les niveaux de production et la croissance) qui peut être utilisé pour renseigner sur l'état de santé du milieu [191]. En effet, une bonne partie de l'énergie fournie par la nutrition est dépensée par l'effort de reproduction (gamétogenèse, émission de produits gonadiques). Une autre partie de cette énergie est emmagasinée sous forme de réserves dans les tissus d'autres organes (manteau, glande digestive, …). Elle servira pour la croissance de l'animal. Cette dernière se traduit par l'augmentation des dimensions de l'organisme [192] et dépend essentiellement de la disponibilité des éléments nutritifs dans le milieu. Ces éléments sont aussi le facteur prépondérant qui contrôle la répartition de ce mollusque [181].

Généralement, les moules sont des organismes gonochoriques (à sexe séparé) mais elles peuvent présenter de rares cas d'hermaphrodisme [193]. La période de la reproduction de la moule *Mytilus galloprovincialis* n'est pas synchronique et varie de manière importante selon les individus, le lieu et l'année [194] (Tableau. I.7). Elle est liée à plusieurs facteurs dont la température et l'abondance de la nutrition (quantité et qualité) apparaissent comme déterminant dans la maturité des gonades [195]. Malgré son caractère saisonnier son cycle de reproduction peut avoir des variations spatio-temporelles considérables [196].

Djediat [197] indique une période de ponte qui se situe entre les mois de janvier, février, mars et le mois de mai pour la moulière de la jetée du port d'Alger. Dans le port d'Oran (site pollué), l'étude de la biologie des moules a montré que le cycle de reproduction est étalé sur toute l'année sans période de repos sexuel bien distincte, avec une période de ponte principale entre novembre et février et une seconde entre mars et juin [198].

Tableau I.7. Les différents stades du cycle de reproduction chez *M. galloprovincialis.*

Cycles de reproduction		Référence bibliographique	
		(Dardignac) [195]	(Bhaby et al.) [196]
Stade	Phase	Période	
Stade 0	Le stade de repos	Juillet et Août	Août et Septembre
Stade 1	La gamétogenèse	Septembre	Septembre à Janvier
Stade 2	Les gamètes sont visibles	Octobre	Janvier
Stade 3.a	Les gamètes sont mûrs	Novembre	Février
Stade 3.b	Début de ponte	Février	Mars
	Ponte principale	Mars	Mai et Août
	Ponte secondaire	Avril-Mai	-

I.7. Classification par partition : Méthode de k-moyennes (K-Means)

Le regroupement (*Clustering*) est une méthode de classification non supervisée. Elle consiste à rassembler des données en un nombre limité de groupes (clusters) naturels. Son objectif est l'obtention d'une représentation concise du comportement d'un système à partir d'un grand ensemble de données [199].

Selon Tufféry [200], le regroupement est une méthode descriptive et non prédictive. Il consiste à regrouper des objets en un nombre limité de groupes ou classes, qui ont deux propriétés : 1) les groupes (ou clusters) ne sont pas prédéfinis par l'analyse, mais découverts au cours du traitement ; 2) les groupes rassemblent les individus de la population ayant des caractéristiques similaires (homogénéité interne) et séparent ceux ayant des caractéristiques différentes (hétérogénéité externe). Afin de former des groupes

homogènes, des critères de proximité ou de similarité sont définis en introduisant des mesures de distance [199,200].

Le choix des algorithmes de regroupement comme K-moyennes est porté principalement des méthodes de partitionnement basées sur la construction de diverses partitions sur les données et dont le nombre de groupes est défini à priori.

L'algorithme des « K-moyennes »(K-means)[201,202] est une méthode statistique de partitionnement de données : son but est de regrouper les observations en K classes (ou clusters) dans lesquelles chaque observation (par exemple ici des activités enzymatiques ou la bioaccumulation) appartient à la partition avec la moyenne la plus proche [203].

Ces méthodes produisent k classes à partir d'un ensemble de n objets, de telle sorte que la fonction objective$E = \sum_{r=1}^{K} \sum_{x_j \epsilon C_r} (x_i - g_r)^2$soitminimum. Dans l'expression de E, les C_r sont les classes, x_i est un point d'une classe et g_r le point-moyen de classe C_r [204]**.**

Cette méthode est un type d'apprentissage non supervisé, qui est utilisé lorsqu'on a des données non étiquetées (c'est-à-dire des données sans catégories ni groupes définis). C'est une méthode efficace qui permet de diviser un ensemble de données en k classes homogènes. L'algorithme fonctionne de manière itérative pour affecter chaque point de données à l'un des k groupes en fonction des caractéristiques fournies. Les classes de données sont regroupées en fonction de la similarité des éléments [204,205].

Les paramètres d'entrée dans la méthode k-means est le nombre de classes. La mesure de ressemblance habituellement employée est la distance euclidienne classique.

Le fonctionnement de l'algorithme des k-means se résume dans les étapes suivantes :

(1) Choisir k objets au hasard: ils servent de centres des classes initiales,
(2) Affecter chaque objet au centre le plus proche; il en résulte une partition en k classes;
(3) Recalculer les centres de chacune de ces classes: chaque classe est représentée par son centre qui, en général, n'est pas un point de l'échantillon;
(4) Répéter les pas 2 et 3 jusqu'à stabilité des centres (les centres ne bougent plus) [204].

La Figure I.12 montre un exemple simple d'exécution de k-means (processus de clustering) sur des données avec un K=3.

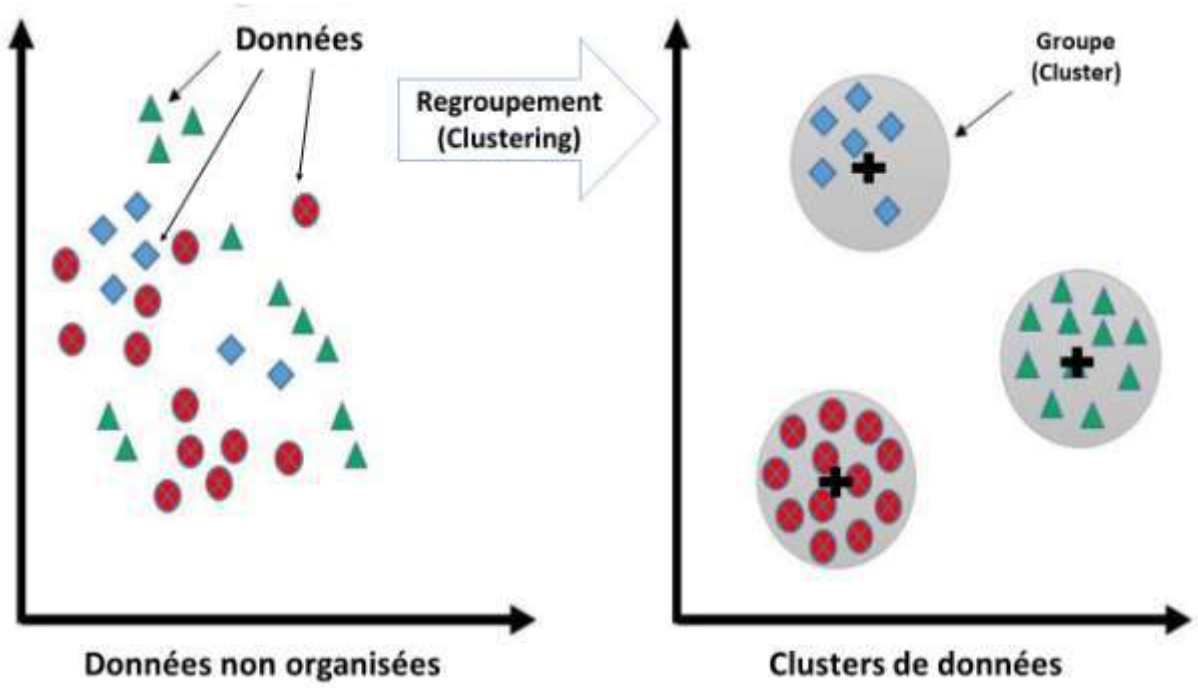


Figure I.11. Exemple simple du processus de partitionnement (clustering) basé sur k-means [206].

Il existe de nombreuses méthodes de type k-means. Elle diffère suivant la sélection des k objets initiaux, le calcul des dissimilarités entre objets, les stratégies de calculs des moyennes des classes et la prise en compte de données catégorielles ou mixtes. Les deux méthodes suivantes: méthode des centres mobiles et méthode des nuées dynamiques, présentes dans plusieurs logiciels, sont apparentées à ces méthodes k-means [204,205].

La méthode des k-moyennes est la plus simple, la plus rapide et la plus utilisée dans les applications scientifiques, industrielles et environnementale [207,208]. Toutefois, elle présente aussi des limites car le nombre de classe doit être fixé au départ, le résultat dépend de la configuration initiale des centres des classes, et les classes sont construites par rapport à des objets potentiellement inexistants (les centres) [204].

Matériel et Méthodes

II.1. Introduction

Ce chapitre est réservé à la présentation de l'échantillonnage et l'acclimatation du matériel biologique, des tests d'écotoxicité aiguë et le bioessai par le plan d'expérience utilisés dans ce travail. Ainsi que, les techniques des dosages : ETM, biomarqueurs (CAT, GST et MDA) et les calculs des indices de bioaccumulation (IBMI et IPM) et les indices de biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2). L'analyse des clusters par la méthode de k-moyennesest décrite à la fin de ce chapitre.

II.2. Échantillonnage et acclimatation des moules

Les moules *M. galloprovincialis* (4,5-5,5 cm) ont été échantillonnées dans une ferme mytilicole (Culture Marine) à Kouali 3, Tipaza, Algérie (N 36 ° 35,496 ', E 002 ° 30,669'). Après la collecte, les moules ont été immédiatement transportées au laboratoire de la ferme Culture Marine et acclimatées dans des bacs (1,5 L d'eau de mer naturelle par individu) pendant une période de 15 jours sous les conditions contrôlées : aération (7,39 ± 0,14 mg L^{-1}), température (17,56 ± 0,2 °C), salinité (37 psu) et pH (8,01 ± 0,2), lumière naturelle et sans aucune source de nourriture supplémentaire. L'eau de mer, renouvelée chaque 24h, est considérée comme la source unique de la nourriture. Ces différents paramètres physicochimiques de l'eau, ont été suivis quotidiennement, avant et après chaque renouvellement de l'eau des bacs, par des multiparamètres de types WTW-Multi 340i (oxygène dissous, température et pH) et salinomètre de type WTW-Cond 330i (salinité et température). Cette période d'acclimatation est cruciale afin de stabiliser les moules et éviter tout éventuel stress. Les critères de choix des tailles sont d'ordre biologique (adultes), mais également d'ordre pratiques [209,210]. Ainsi, le choix des individus des moules est basé sur leur bonne état de santé (le byssus doit être présent avec bonne fermeture de la coquille) [209,210].

II.3. Test d'écotoxicité aiguë

Les bioessais de toxicité (écotoxicité) aiguë à concentration multiples, sont effectués selon le mode d'intoxication statique avec répétition. En brief, dans des bacs (en polystyrène : 42x28x19 cm^3), quinze (15) individus de moules *Mytilus galloprovincialis*, sont exposés pendant 72 heur (h) aux différentes concentrations de solutions métalliques de Cadmium ($CdSO_4$,Sigma Aldrich, CAS :10124-36-4),de Zinc ($ZnSO_4$, CAS :7646-65-7et

de Cuivre($CuSO_4$, Sigma Aldrich , CAS:7758-99-8)de telle façon que leurs concentrations soient comprises entre:

- 0,50 et 4,00 $mg.L^{-1}$ pour le Cadmium et le Zinc.
- 0,025 et 0,20$mg. L^{-1}$ pour le Cuivre.

Les conditions expérimentales sont les suivantes : aération (8,01 ± 0,14 $mg\ L^{-1}$), température (16,78 ± 0,00 °C), salinité (37±0,00 psu) et pH (7,83 ± 0,06), lumière naturelle et sans aucune source extérieure de nourriture. Des témoins ont été utilisés dans des bacs contenant de l'eau de mer naturelle (Figure II.1.).

Avant chaque renouvellement du milieu (24h), la mortalité est contrôlée dans chaque unité expérimentale. Une moule est considérée comme morte quand les valves sont ouvertes et ne se ferment pas en réponse à un stimulus tactile [122, 211]. Pour les individus fermés lors du contrôle, on essaie d'écarter légèrement les valves. L'absence de résistance et la non fermeture immédiate indiquent la mort [122,212]. Les individus morts sont retirés de l'unité expérimentale et comptabilisés.

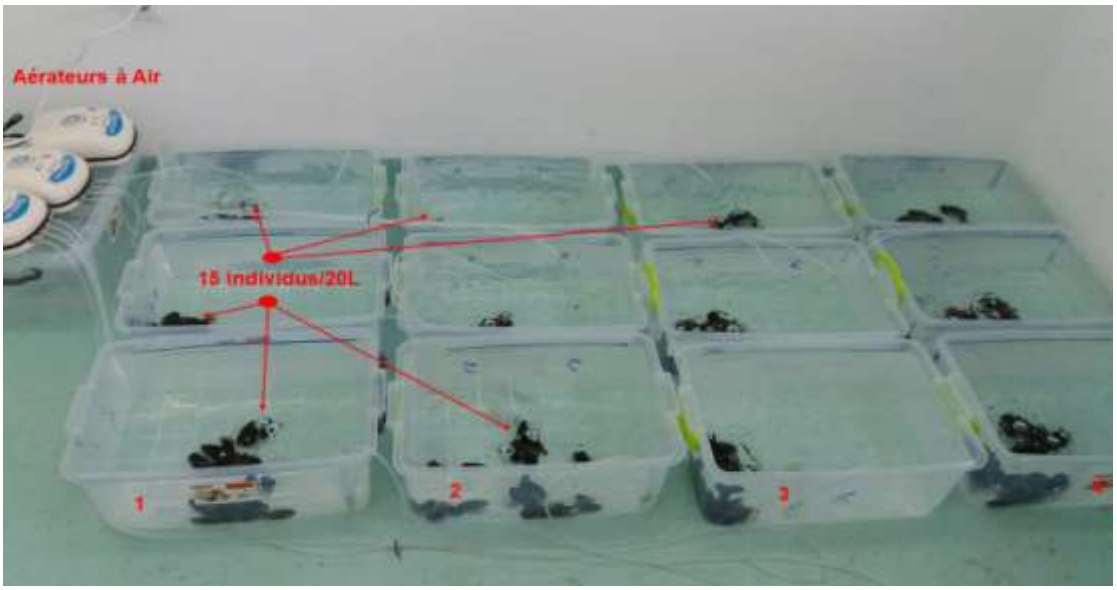


Figure II.1. Dispositif expérimental utilisé pour le test d'écotoxicité aiguë (Photooriginale).

II.3.1. Détermination de la concentration létale médiane (CL_{50})

À la fin de l'essai, on calcule la mortalité cumulée (en 24, 48 et 72h) pour chaque concentration. Pour la validité du bioessai de toxicité aiguë en respectant la condition que la mortalité chez les témoins ne dépasse pas 10%à la fin ducycle expérimental [111, 213].

Le calcul de la concentration létale médiane après 72h d'exposition (CL_{50}-72h) est effectué par la méthode des Probit au moyen d'un logiciel IBM SPSS Statistics 25 qui calcule l'équation de la courbe de régression de la mortalité (Probit) en fonction du log_{10} de la concentration des métaux traces testés.

II.4. Bioessai par le plan d'expérience

Le plan d'expérience (PE) utilisé pour la réalisation de ce travail est le plan d'expérience pour surface de réponse. En effet, ce plan constitue une méthodologie puissante, qui permet d'aller plus loin dans la modélisation des phénomènes que les plans factoriels, en fournissant à l'expérimentateur les lois de variation précises des paramètres de l'étude [176,177]. Effectivement, ce type de plan permet d'optimiser l'organisation des essais. Cette organisation permet également d'obtenir le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Elle permet aussi d'obtenir la meilleure précision possible sur la modélisation des résultats [176,177]. Dans notre cas, cette méthode vise à déterminer d'une façon quantitative la variation d'une réponse biologique (bioaccumulation ou biomarqueurs) *vis-à-vis* des facteurs sélectionnant les métaux trace (ETM). Le domaine d'étude est choisi de manière à inclure tous les points expérimentaux effectués (17 essais), en prenant pour niveaux bas, les valeurs minimales des trois facteurs (0 mg L^{-1}) et pour niveaux hauts leurs valeurs maximales (10% CL_{50}-72hmg L^{-1}) (Figure II.2 ; Tableau II.1). Ce choix est justifié par rapport au taux de létalité des mélanges ternaire des ETM [214].

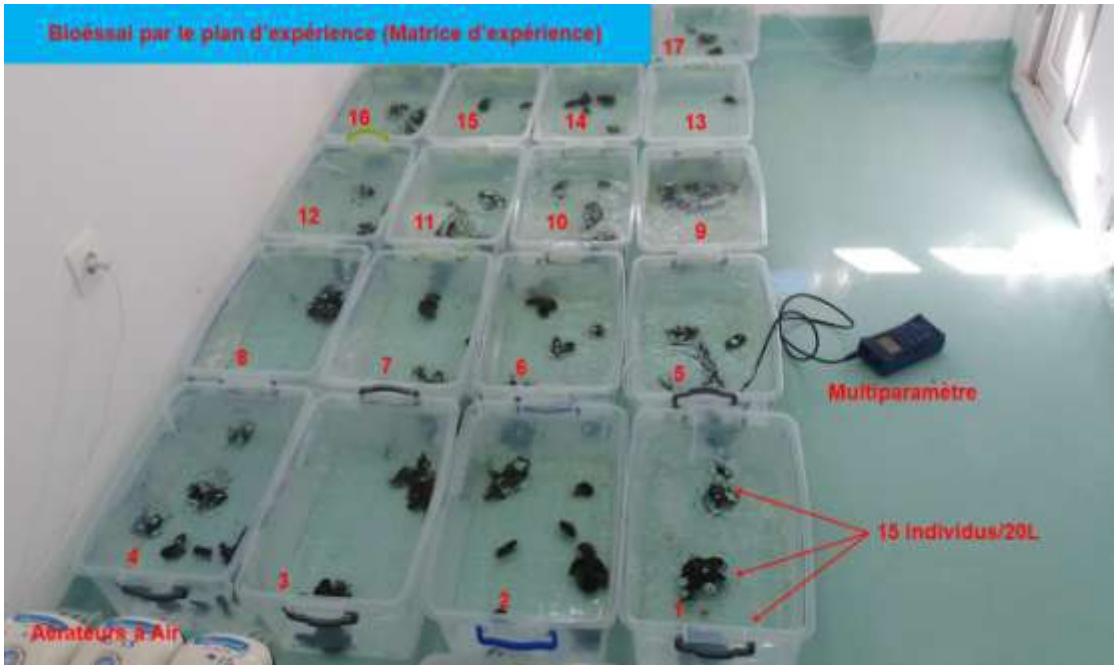


Figure II.2. Dispositif expérimental utilisé pour le test CCF (Photo originale).

L'ensemble des expériences, destiné à évaluer l'effet des facteurs (concentration initiale en Cd^{2+}, Cu^{2+} et Zn^{2+}) et de leurs interactions écotoxicologique, est regroupé dans une matrice selon le plan composite centré à faces centrées (CCF) des plans de surface. Le plan est basé sur un plan factoriel complet (2^3), trois points centraux et des points axiaux (ou étoiles, α=1) qui permettent d'estimer la courbure. Chaque facteur est étudié à 3 niveaux. Dans la matrice d'expériences (Tableau II.1), le passage des variables d'origine A aux variables codées (variables centrées réduites (v.c.r)) X, et inversement, est donné par la formule suivante (A_0 est la valeur centrale en unités courantes) [176,177] :

$$X = \frac{A - A_0}{Pas} \qquad (II.1)$$

A est la valeur codée de la variable, X est la valeur réelle de la variable, A_0 est la valeur du point central et Pas est la variation entre les niveaux haut et bas.Les variables codées et réelles correspondantes aux conditions expérimentales sont définies dans la matrice d'expériences (Tableau II.1).

Tableau. II.1. Matrice d'expériences.

N° d'essai	Facteurs		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1	0	0
10	+1	0	0
11	0	-1	0
12	0	+1	0
13	0	0	-1
14	0	0	+1
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Facteurs ($mg.L^{-1}$)	Symbole	Niveau		
		-1	0	1
Concentration nominale en Cd^{2+}	X_1	0	5% CL_{50}-72h	10% CL_{50}-72h
Concentration nominale en Zn^{2+}	X_2	0	5% CL_{50}-72h	10% CL_{50}-72h
Concentration nominale en Cu^{2+}	X_3	0	5% CL_{50}-72h	10% CL_{50}-72h

Dans l'intervalle expérimental, les données obtenues à la suite de ce plan sont soumises à une analyse de régression et modélisées sous forme d'un modèle mathématique (polynôme) de second degré (équation II.2), où on exprime la variation de la réponse en fonction des différents facteurs étudiés.

Il permet aussi, l'identification les types d'interaction écotoxicologique entre les facteurs. L'estimation des coefficients de régression est réalisée par la méthode des moindres carrés [176,177]selon l'équation suivante :

$$Y = \beta_0 + \sum_1^{n=3} \beta_i X_i + \sum_1^{n=3} \beta_{ii} {X_i}^2 + \sum_1^{n=3} \beta_{ij} X_i X_j \text{(II.2)}$$

Y est la réponse prévue, les facteurs :linéaire (X_i),quadratique (X_i^2) etd'interaction (X_iX_j).Les effets : linéaire (β_i), quadratique (β_{ii})et d'interaction(β_{ij}).β_0 est une constante.

L'évaluation de la qualité du modèle permet de savoir si le modèle explique bien l'ensemble des résultats des essais du plan d'expériences. On peut vérifier la validité de modèle mathématique à l'aide d'outils statistiques.

Parmi ces techniques décrites pour effectuer cette évaluation sont : 1) l'examen graphique des résultats, 2) les tests statistiques (analyse de la variance, test de Fisher, les coefficients de détermination (R^2 et $R^2_{ajusté}$)), 3) l'analyse des résidus [176,177,215].

Les logiciels Matlab 2017 et le Minitab Trial version 20 (Minitab Inc., State College, PA, USA) ont été utilisés pour la génération de matrice d'expériences du plan composite centré à faces centrées (CCF) pour les réponses biologiques (bioaccumulation et biomarqueurs) induites par les mélanges de métaux traces et la représentation graphique des données obtenues.

Dans notre cas d'étude le plan CCF est le mieux adapté aux bioessais par rapport aux d'autres plans (p.e. plan composite centré réduit CDD)car il fournit d'haute qualité de prédictions dans le domaine d'étude[176,177].

II.5. Analyse des métaux tracespar spectrophotométrie d'absorption atomique

II.5.1. Décoquillage, lyophilisation et broyage

Les moules (10 individus sont suffisant pour cette étape) sont disséqués (décoquillés) le jour même avec un scalpel en acier inoxydable, et égouttée afin d'éliminer le liquide intervalvaire [80,209,210]. La chair est placée dans un pilulier en polyéthylène et congelé (-20 °C) avant d'être lyophilisés.

En effet, il est généralement souhaitable de sécher les échantillons biologiques avant analyse. Cette opération améliore l'efficacité de la minéralisation acide en éliminant l'eau qui diluerait les réactifs dans le cas d'une minéralisation d'échantillons humides.

De plus, l'homogénéisation des échantillons secs est meilleure que celle des échantillons humides et améliore grandement la représentativité des faibles prises d'éssai.

La lyophilisation qui est pratiquée à basse température est une technique plus appropriée pour le séchage de moule. Cette technique permettant la déshydratation de l'échantillon (la moule) congelé par sublimation à basse température (-55 °C) et sous vide (0,1 bar) pendant 72h. Cette technique est préférable à la déshydratation à l'étuve car cette dernière entraine une perte de métal trace le plus volatile comme le Hg [209,210].

Dans notre travail, les moules sont lyophilisées avec un lyophilisateur ALPHA 1-2 LD plus, Martin Christ, (-55° C, 0,1 bar, 72h).

Enfin, la chair lyophilisée (séchée) est broyée en poudre à l'aide d'un mortier en porcelaine et stockée dans des piluliers en polyéthylène avant d'être minéralisés (Figure II.3)[210].

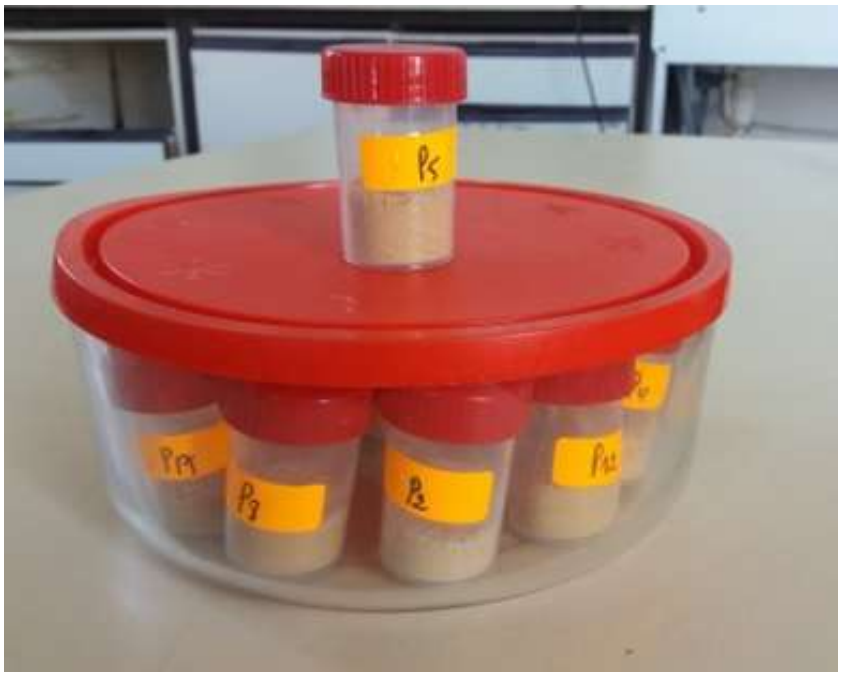


Figure II.3. Échantillon de la moule lyophilisé et broyé (Photo originale).

II.5.2. Préparation des minéralisâts et analyse par SAA

Desaliquots contenant chacun 500 mg d'échantillon lyophilisé et broyé sont minéralisés à 120 °C sur plaque chauffante (Ceran 500, 22 SR) avec de l'acide nitrique concentré (Panreac, 69%, CAS : 1310037.1611) dans des tubes en Téflon avec bouchons (60 mL, Savillex) durant 2 heures. Après digestion acide des échantillons, les minéralisâts sont

complétés avec de l'eau distillée et sont soumis à des dosages pour Cd, Zn et Cu (Figure II.4).



Figure II.4. Minéralisation des échantillons (Photo originale).

Des blancs doivent être préparés pour chaque série d'analyse. Ils sont préparés de la même manière que les échantillons, exceptés qu'aucun échantillon n'est ajouté dans les flacons de digestion.

Le Cd et le Cu sont analysés à l'aide d'un appareil Agilent (modèle AA 240Z) comprenant un four en graphite alimenté par l'argon(Figure II.5-Annexe 3). La correction de l'absorption non spécifique est assurée par l'effet Zeeman [210].

L'analyse du Zn a été réalisée à l'aide d'un appareil Agilent (modèle AA 240FS) à flamme alimentée par un mélange air-acétylène. Ce spectrophotomètre est équipé d'une lampe au Deutérium, ce qui permet d'éliminer le bruit de fond.

Les longueurs d'onde d'absorption (nm) pour le cadmium , le zinc et le cuivre sont 228,8,213,9 et 327,4, respectivement.

Dans notre étude, nous avons vérifié la justesse des mesures en utilisant le standard SRM2976-AIEA utilisé pour l'analyse de Cd, Zn et Cu.Ce standard permet de vérifier la justesse et la reproductibilité de la méthode qui est certifié et subit le même traitement de minéralisation citées auparavant.

La différence entre la valeur mesurée (V^{mes}.) et la valeur référence ($V^{réf}$.) est calculée et le Δ est définit comme suit [210,217].

$$\Delta(\%) = \frac{|V^{mes} - V^{réf}|}{V^{réf}} * 100 \text{(II.3)}$$

Si Δ % < 10 aucune correction n'est apportée.

Si non, la correction est obligatoire (V^{Corr}: Valeur corrigée) et s'effectue de la manière suivante :

$$V^{Corr} = \frac{V^{mes}}{1+\frac{\Delta}{100}} \text{(II.4)}$$

Dans notre cas, les méthodes de détermination sont reproductibles pour le Cd, Zn et Cu (coefficient de variation des mésures est de 3,84%, 0,77% et 9,32%, respectivement). Ceci signifie que la méthode utilisée est reproductible.

Cette méthode est précise pour le standard étudié, puisque toutes les valeurs moyennes mesurées sont proches à des concentrations certifiées (coefficient de variation Δ (%) < 10) avec un taux de récupération supérieure ou égale à 95%. Les valeurs de performances obtenues sont résumées dans le tableau II.2.

TableauII.2. Valeur certifiée et valeur mesurée des métaux traces dans un échantillon de référence certifiés "chaire de moule *Mytilus galloproincialis*(SRM2976-AIEA)".

Élément	Valeur mesurée ($\mu g.g^{-1}$ poids sec)	Valeur certifiée ($\mu g.g^{-1}$ poids sec)	Récupération (%)
Cd	0,78 ± 0,03	0,82 ± 0,16	95,12
Zn	131,05 ± 1,013	137 ± 13	95,65
Cu	3,86 ± 0,36	4,02 ± 0,33	96,02

La teneur en élément métallique est mesurée par la spectrométrie d'absorption atomique dont le minéralisât d'échantillons et/ou de standards certifiés, de même que dans les blancs sont déterminées à l'aide de la formule suivante [210] :

$$\text{Concentration } \left(\text{en } \mu g.g^{-1} \text{ poids sec}\right) = \frac{(C-C_B)\times V}{P} \text{(II.5)}$$

Sachant que :

P : Poids d'échantillon de départ (prise d'essai en µg).

V : Volume final du minéralisât (en mL).

C : Concentration en élément mesurée dans le minéralisât (en $\mu g.L^{-1}$).

C_B : Concentration en élément mesurée dans le blanc ($\mu g.L^{-1}$).

Cette concentration est exprimée par rapport au poids humide (frais)ou sec suivant la nature de la prise d'éssai. Dans le cas d'échantillons séchés, on peut revenir au poids humide par le calcule suivant [210] :

$$C_{\text{poids humide}}\ (\text{en } \mu g.\, g^{-1}\ ) = \frac{C_{\text{poids sec}}\ (\text{en } \mu g.g^{-1}\ ).(100 - \text{humidité } (\%))}{100} \text{(II.6)}$$

La teneur en humidité en pourcent des échantillons correspondant à la différence entre la masse de la chair humide (frais, avant séchage) et la chair lyophilisée (sèche, après séchage) sur la masse de la chair humide et le taux multiplié par 100 [209,210].

II.5.3. Les indices de la bioaccumulation métallique

Pour comparer le degré de la bioaccumulation des métaux traces étudiés (contamination métallique) chez les moules, pour différentes expositions, nous pouvons exprimer la charge métallique par une seule valeur de la bioaccumulation globale des trois métaux traces, deux indices IBMI[38] et IPM[5]sont calculés avec les équations suivantes :

$$\text{IBMI } = \frac{\sum_1^n \frac{C_i}{C_{imax}}}{n} \text{(II.7)}$$

Ou IBMI : indice de bioaccumulation moyen individuel (multi-métal),

n : est le nombre totale des métaux étudiés,

C_i : est la concentration individuelle de métal bioaccumulé i,

C_{imax} : est la concentration maximale des métaux étudiés, (0 <IBMI< 1).

$$\text{IPM} = (Cf_1 \times Cf_2 \ldots\ldots \times Cf_n)^{\frac{1}{n}} \text{(II.8)}$$

Ou IPM : indice de pollution métallique,

Cf_n : la concentration du métaln bioaccumulé.

II.6. Analyses biochimiques des biomarqueurs

II.6.1. Préparation de la fraction post-mitochondriale (S_9)

Les moules (5 individus restants) sont disséqués (décoquillés) comme précédemment expliqués. La masse fraîche est séparée de la coquille, lavée avec du tampon Tris-HCl (Sigma Aldrich, CAS : 77-86-1 ; 100 mM ; pH 7,4 ; -4 °C) et égouttée afin d'éliminer le liquide intervalvaire [218,219]. Elle est ensuite broyée à l'aide de bras mixeur (Sonashi - SHB-178) pendant 1 minute (3000-3600 $tr.min^{-1}$). L'homogénéisation est faite dans dix volumes du même tampon Tris. L'homogénat est ensuite placé dans une centrifugeuse réfrigérée (Centurion Scientific K3 Series) à -4 °C (9000 $tr.min^{-1}$ pendant 30 min).

Les fractions destinées aux dosages biochimiques sont impérativement préparées à -4 °C. Le surnageant récupéré après centrifugation correspond à la fraction post-mitochondriale (désignée S_9) (Figure II.6) [220,221] sur laquelle le dosage des protéines et des activités enzymatiques sera effectué. Cette fraction est, soit utilisée aussitôt pour le dosage des protéines et biomarqueurs, ou bien stockée à -86 °C (Labologic Freezer LA-538) jusqu'à son utilisation.

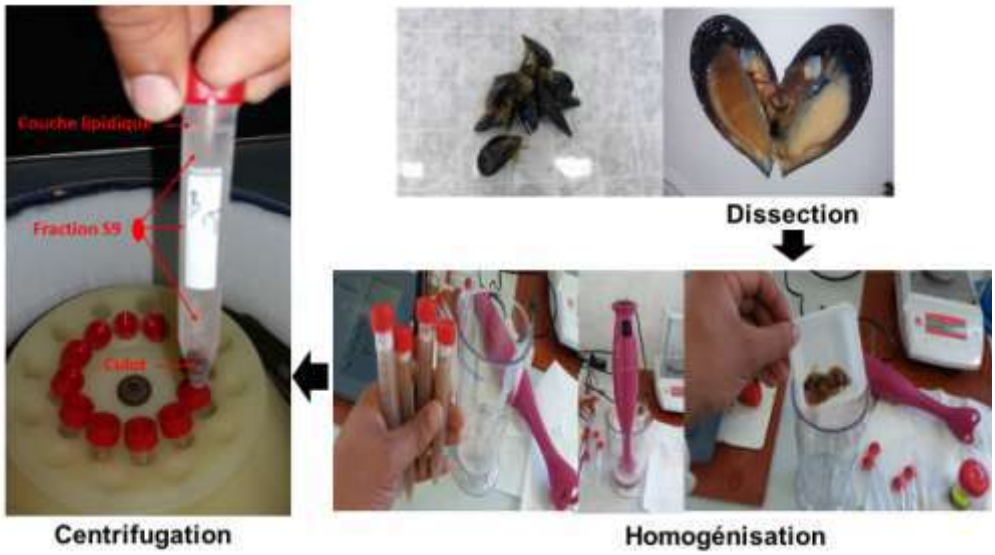


Figure II.5. La fraction post mitochondriale (S_9) préparée (Photo originale).

II.6.2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines nous permettra d'exprimer les activités enzymatiques telles que la catalase et la glutathion S-transférase en µmole. min^{-1}. mg^{-1} de protéines ou U. mg^{-1} de protéines et en nmole. min^{-1}. mg^{-1} de protéines, respectivement.Le protocole de dosage des protéines par la méthode de Lowry et al. [222] est détaillé en Appendice B.

II.6.3. Dosage des biomarqueurs

Dans notre pratiquetrois biomarqueurs ont été déterminées : l'activité enzymatique catalase (CAT), l'activité enzymatique glutathion S-transférase (GST)et le malondialdéhyde (MDA).Les protocoles de dosage des biomarqueurssont détaillés en Appendice B.

II.6.4. Les indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR)

Pour comparer le degré d'induction des enzymes antioxydants et dommage oxydatif chez les moules par les métaux traces étudiés pour différentes expositions, deux indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2) sont calculés par la combinaison de toutes les réponses des biomarqueurs mesurés (CAT, GST et MDA) en une seule réponse

globale (intégrée) facilitant la lecture de la batterie des marqueurs et donnant l'information rapide sur l'état des organismes altérés (sous stress oxydatif) ainsi que l'état de pollution de milieu.

II.6.4.1. Développement de l'indice de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1)

Une classification des biomarqueurs (CAT, GST et MDA) par l'utilisationde la méthode des k-moyennes (K-Means) et le calcul d'un nouvel indice de la réponse intégrée des biomarqueurs a été développée dans cette étude pour les biotests basé sur la méthodologie des travaux de terrain de Chèvre et al.[37] et Benali et al. [218]. Tout d'abord, nous avons utilisé les résultats des biomarqueurs obtenus chez les moules *Mytilus galloprovincialis* dans différentes expositions aux métaux traces selon le plan composite CCF (Essai 1à 17).

En effet, ces résultats ont été classés en quatre catégories par l'utilisation de l'analyse des clusters par la méthode des k-moyennes.

Le choix de nombre du clauster (n=4) dépond des coefficients de détermination (R^2 et R^2ajusté) du modèle d'IBR_1 (Tableau II.3).

Tableau II.3. Coefficients de détermination d'IBR_1en fonction de nombre de cluster.

n	IBR_1	
	R^2	$R^2_{ajusté}$
2	87,67	71,81
3	93,50	85,14
4	96,74	92,56

Aprés la classification parla méthode des k-moyennes, les biomarqueurs étudiés sont classés en quatreclasses en prenant en compte de la pollution métallique à degré très bas à la pollution métallique à degré très élevée (Tableau II.4). Par exemple, si les niveaux des biomarqueurs entre 18,30 et 22,48 U. mg^{-1} protéine, 15,46 et 27,34nmole. min^{-1}. mg^{-1} de protéines et 19,27 et 25,21nmole. mg^{-1}de protéine pour la CAT, GST et MDA respectivement, les nombres des classes attribués à ces biomarqueurs est 2 et les niveaux de pollution sont « modérées » (Tableau II.4).

Et puis, les nombres de classes attribuées à ces biomarqueurs ont été additionnés pour permettre le calcul d'un indice de la réponse intégrée des biomarqueurs qui correspondant à la pollution métallique au niveau des bacs d'exposition selon le CCF.

L'indice est calculé comme suit :

$$IBR_1 = \sum_{i=0}^{n=3} CNCBR_i = (CNCCAT + CNCGST + CNCMDA) \text{(II.9)}$$

Ou CNCCAT, CNCGST, CNCMDA, représentent la valeur de clauster de classification de chaque biomarqueur à chaque exposition (Essai-1-17) durant 72heures.

Tableau II.4. Classification des valeurs des biomarqueurs établie grâce à l'analyse des clauster par la méthode des k-moyennes

Classe	Niveau de pollution	CAT	GST	MDA
1	Pollution Faible	[12,78-14,23]	≥ 9,82	[11,89-17,74]
2	Pollution modérée	[18,30-22,48]	[15,46-27,34]	[19,27-25,21]
3	Pollution élevée	[24,16-29,21]	[32,72-46,93]	[29,19-30,28]
4	Pollution très élevée	≤ 48,31	≤ 59,30	≤ 38,91

Cette classification par cluster nous permettra de calculer l'indice IBR_1.Les résultats des IBR_1 obtenus sont représentés en bars superposés par l'utilisation de logiciel Origin 2018 64Bit.

II.6.4.2. Indice de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_2)

La valeur de l'indice de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_2) a été calculée par le logiciel *R (IBRtools package)*, selon la méthode décrite dans Sanchez et al. [124]. Donc, l'IBR_2 permet :

×(1) de déterminer les écarts des réponses des biomarqueurs entre la ligne de base (témoin) et chaque groupe exposé aux métaux traces,

××(2) la comparaison inter-essai (Essai1-essai17)des valeurs IBR_2.

La méthode de calcul est décrite ci-dessous :

1) Transformation logarithmique des données : les données des biomarqueurs individuels (X_i) sont comparées à une donnée de référence moyenne (X_0), qui est une transformation logarithmique appliquée pour réduire la variance.

$$Y_i = Log_{10}\left(\frac{X_i}{X_0}\right) \text{(II.10)}$$

2) Normalisation des Y_i : la moyenne générale (μ) et l'écart type (σ) de Y_i ont été normalisés pour permettre une comparaison des réponses des biomarqueurs dans les essaies de plan d'expérience.

$$Z_i = (\frac{(y_i - \square)}{\sigma})(II.11)$$

3) Définition d'un indice de déviation des biomarqueurs : la moyenne de la réponse normalisée du biomarqueur (Z_i) et la moyenne des données du biomarqueur de référence (Z_0) sont utilisées pour obtenir A.

$$A = (Z_i - Z_0)(II.12)$$

4) Pour obtenir une réponse multi-biomarqueur intégrée nommée IBR_2 : on additionne la valeur absolue des paramètres A calculés pour chaque biomarqueur dans chaque groupe expérimental.

$$IBR_2 = \sum_{i=1}^{n} |A_i| (II.13)$$

Les résultats des IBR_2 obtenus sont représentés en diagrammes radar par l'utilisation de logiciel Origin 2018 64Bit.

II.6.5. Analyse des clusters par la méthode des k-moyennes (K-Means)

Dans notre travail, pour tous les résultats obtenus de la bioaccumulation et biomarqueurs et leurs indices, nous utilisons la technique du clustering dans le but de structurer la population d'étude (données) en nombre (K) de classes ou groupes homogènes (appelés aussi cluster). Le nombre de clusters K est déterminé par l'utilisateur selon la modélisation choisie. Chaque classe représente une tranche/segment de la population d'étude ayant un certain degré d'homogénéité et dont les membres partagent des propriétés similaires. Dans notre étude, ces classes correspondent aux degrés de bioaccumulation ou degrés d'induction des biomarqueurs étudiés. Ainsi, nous avons attribué pour chaque classe de pollution métallique ou degrés d'induction des biomarqueurs étudiés un code-couleur, par exemple la couleur verte correspond au degré bas de pollution par contre une coloration rouge correspond à un degré de pollution très élevé et ceci permettra de faciliter la lecture des données. L'analyse de classification automatique (K-mean cluster) des résultats obtenus dans cette étudeest effectuée par le logiciel IBM SPSS Statistics 25.

III.1. Toxicité létale du cadmium, du zinc et du cuivre chez *Mytilus galloprovincialis*

III.1.1. Introduction

Dans le contexte d'une pollution métallique marine, les effets biologiques (léthaux ou sub-létaux) des métaux toxiques présents dans l'environnement côtiers et marins sont provoqués par l'interaction du métal avec un récepteur biologique à la surface ou à l'intérieur de l'organisme vivant telles que les moules de genres *Mytilus* [7,28]. Bien qu'ils soient résistants aux métaux du point de vue de l'action létale, les mollusques bivalves répondent très bien au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale à des concentrations sublétales [7,82]. Aussi, l'évaluation de ces effets sublétales s'intéresse par définition à des concentrations toxiques mais sans effet létal pour une durée d'exposition [82,230].

En effet, les concentrations de métaux requises pour déclencher ces réponses sont inférieures à celles qui provoquent une crise (mortalité, inhibition des activités biologiques) dans l'organisme cible ou une dégradation visible de l'écosystème marin (disparition de population et espèces) [7]. Par contre, la toxicité aiguë (concentration létale), permet d'identifier les symptômes d'une intoxication. Elle sert souvent de point de départ pour les études de toxicité car elle informe sur la toxicité létale et s ublétal [7,28,35]. Il est donc nécessaire dans les études écotoxicologiques notamment chez les bivalves, d'établir les seuils de concentrations sublétales et létales ainsi que l'évolution de la mortalité au-delà de ces seuils. Dans ce contexte, la détection et la quantification de ces réponses à l'intérieur de la moule *vis-à-vis* des effets sublétaux est utile et pourrait servir d'indicateur précoce, sensible et spécifique d'un stress environnemental [231].

À cet effet, le test de toxicité aiguë au laboratoire consiste à exposer différents lots des mollusques bivalves, à différentes concentrations des métaux traces, dans des conditions bien contrôlées. Il permet de déterminer la concentration létale de métal qui entraîne 50% de mortalité et les résultats seront comparables aux autres études [111,232].

L'objectif de cette partie de l'étude consiste à déterminer la concentration létale médiane (CL_{50}-72h) du cadmium, du zinc et du cuivre *vis-à-vis* de la moule *Mytilus galloprovincialisvia* un test de toxicité aiguë afin de définir le domain des effets sublétaux des métaux étudiés (concertations au-dessous de la CL_{50}) pour l'étude de la bioaccumulation et les biomarqueurs par le plan d'expérience.

Cette CL_{50}-72h nous permettra aussi de connaître et de comparer leur sensibilité par rapport à la littérature et de classer les métaux étudiés selon leur toxicité au niveau du

laboratoire. D'autre part, cette CL_{50}-72h nous permettra aussi de déterminer les valeurs limites à respecter dans les rejets des eaux usées *vis-à-vis* des *Mytilus* de genre *galloprovincialis*.

III.1.2. CL_{50} des métaux (Cd, Zn et Cu) calculée par la mortalité

Les résultats des tests de toxicités aiguës sont présentés dans le tableau III.1.1.
Ces résultats, basés sur la mortalité, montrent que les métaux étudiés (Cd, Zn et Cu) ont des effets létaux à court terme chez *Mytilus galloprovincialis.*

Tableau III.1.1. Concentration létale CL_{50}-72h de cadmium, zinc et cuivre pour *M. galloprovincialis*.

Métal	CL_{50}-72h ($mg.L^{-1}$)	Intervalle de confiance (IC) avec une probabilité de 95 %	
		Limite inferieur	Limite supérieure
Cd	2,60	2,05	3,61
Zn	1,86	1,15	3,88
Cu	0,10	0,07	0,15

En effet, le cuivre est le plus toxique *vis-à-vis* de *Mytilus galoprovincialis*, suivi par le zinc et le cadmium. Effectivement, le cuivre exerce une toxicité létale à des concentrations relativement faibles ($\geq$ 0,025$mg.L^{-1}$) par rapport au cadmium et le zinc ($\geq$ 0,5 $mg.L^{-1}$) durant 72h d'éxposition. Ces essais toxicologiques révèlent une relation dose-réponse durant la durée d'exposition et les CL_{50}-72h enregistrées pour cadmium, zinc et le cuivre sont de 2,60 (2,05-3,61) mg. L^{-1}, 1,86 (1,15-3,88) mg. L^{-1} et 0,10 (0,07-0,15) $mg.L^{-1}$ respectivement après 72h d'éxposition.

Les résultats obtenus chez les spécimens exposés à une toxicité aiguë aux cadmiums, zinc et le cuivre montrent que la mortalité augmente avec la concentration d'exposition. En effet, de nombreux travaux de recherches ont montré que la mortalité des mollusques bivalves au cours des tests de toxicités était positivement corrélée avec l'augmentation de la concentration de métaux et la période d'exposition [122,232].

Aussi, la sensibilité marquée des moules *Mytilus galloprovincialisvis-à-vis* des éléments traces étudiés est déterminée par le calcul de la CL_{50}-72h. En effet, ces résultats suggèrent que les moules *M. galloprovincialis* étaient les plus sensibles aux effets toxiques des éléments essentiels (Cu et Zn) par rapport aux éléments non essentiels (Cd). Cette dernière remarque est semble être liée du fait que les sels de cuivre sont connus comme des molluscicides efficaces [82,233,234].

En tenant compte des CL_{50}-72h entre les métaux étudiés, on peut les classer selon l'ordre de toxicité décroissante suivant : Cu > Zn > Cd.

Ce résultat de classement de Cu en premier concorde avec ceux enregistrés chez certains mollusques. Par exemple un ordre de toxicité décroissante (Cu > Cd) a été trouvé pour *Mytilus galloprovincialis* [122], Cu > Cd > Zn pour *Perna viridis* [123], Cu > Cd > Zn pour *Modiolus philippinarum* [232], Cu > Zn > Cd pour *Cingulina cingulata* [232], Cu > Cd > Zn pour *Perna viridis* [235] et Cu > Cd > Zn pour *Mya arenaria* [236].

Le zinc et le cuivre sont indispensables pour le métabolisme normal des êtres vivants (oligoéléments/micronutriments)à faible concentration ; en particulier comme co-enzymes et dont l'absence se traduit par un dérèglement d'une fonction de l'organisme qui ne peut être restaurée que par l'ajout du métal en question. Au contraire, le cadmium (Cd), n'a aucune fonction biologique connue (c'est-à-dire que ce métal n'intervient dans aucun processus métabolique). Néanmoins, ce métal se retrouve dans les tissus des êtres vivants, parfois en grande concentration à cause de l'exposition à la pollution métallique [7,237,238].

Les différences de mode d'action toxique entre métaux au niveau biochimique, comportementale et physiologique chez la moule suggèrent que leurs toxicités aiguës soient différentes et irréversibles avec certains métaux (Cu et Hg) tandis qu'elles sont faibles pour d'autres (Zn, Pb, Cd). Dans ce contexte, les réponses comportementales, métaboliques et physiologiques telles que le mouvement des valves, le taux de sécrétion de mucus et les excrétions solubles (azoté et phosphoré), ont été utilisées comme des réponses au toxicité des métaux [82,123,135,239,240].Les caractéristiques physico-chimiques de notre milieu d'éssai ont probablement une influence sur les résultats de toxicité. En effet, dans l'eau de mer, des concentrations élevées d'ions tels que le calcium et le chlorure peuvent réduire la biodisponibilité du Cd par des processus de compétition et de complexation, respectivement. Ainsi, dans l'eau de mer, la formation d'espèces de chlorure de Cd réduit la toxicité du Cd, ou par la compétition du calcium pour l'absorption [241]. Ainsi à une salinité de 35 ‰, la majeure partie du chlorure de cadmium se transforme en un complexe neutre $[CdCl_2]^0$[242].

Des espèces de mollusques bivalves ont fait l'objet de nombreux essais toxicologiques afin d'estimer les CL_{50} après un temps d'exposition aux métaux traces. À notre connaissance et par rapport la littérature scientifique, il n'y a pas d'études de toxicité à court terme en utilisant les moules *M. galloprovincialis* ayant suivies les mêmes protocoles (taille, nombre d'individus, modalité d'essai, durée d'exposition) [122, 241]. En plus, les différences légères de valeurs CL_{50} pour Cu, Cd et Zn enregistrées dans les mollusques marins ne sont pas similaires et peuvent être attribuées à différents sites et périodes de collecte, nature/type desespèces,

salinités expérimentales, conditions d'essais en laboratoire et les régions géographiques [232,235].

Pour ces raisons, les valeurs de CL_{50} déterminées dans cette présente recherche peuvent être comparées avec plusieurs valeurs de CL_{50}mentionnées pour quelques espèces de mollusques marins (Tableau III.2).

Tableau III.1.2. Les CL_{50}mentionnées pour quelques espèces de mollusques marins.

Espèces	Tailles (cm)	Métal	Durée (h)	CL_{50}(mg. L^{-1})	Références
Mytilus galloprovincialis	4-5	Cu	96	0,35 ± 0,02	[122]
		Cd		1,7 ± 0,1	
Modiolus philippinarum	1± 0,2	Cd	72	0,28 (0,17-0,46)	[232]
		Zn		4,04 (1,56-10,32)	
		Cu		0,03 (0,02-0,06)	
Perna viridis	1,5-2,0	Zn	72	6,20 (4,63-8,31)	[243]
		Cu		0,08 (0,07-0,10)	
	3-4	Cd	96	1,57	[235]
		Zn		6,09	
		Cu		0,62	
Mya arenaria	3,8-4,9	Cd	48	0,15	[236]
		Zn		1,55	
		Cu		0,035	

Ainsi une corrélation négative entre la CL_{50} et la durée d'exposition [244]. Pour *M. philippinarum* (1± 0,2 cm de longueur) exposé au Cu, la CL_{50} diminue avec le temps d'exposition : CL_{50}-24h (0,13 (0,08-0,49) $mg.L^{-1}$)>CL_{50}-48h (0,07 (0,04 -0,22) $mg.L^{-1}$) >CL_{50} -72h (0,03 (0,02-0,06) $mg.L^{-1}$) > CL_{50}-96h (0,02 (0,01-0,03) $mg.L^{-1}$) [232]. Ces résultats impliquent que les moules possèdent un taux d'alimentation élevé et sont donc plus sensibles à la toxicité des métaux dans les tests de toxicité à court terme [122].

Enfin, notre objectif de cette partie était de déterminer les CL_{50}-72h de Cd, Zn et Cu pour *Mytilus galloprovincialis* et de les introduire comme des domaines de définitions de niveaux

sublétaux de facteurs sur *Mytilus galloprovincialis* pour modéliser et optimiser la bioaccumulation des métaux traces et les réponses biochimiques (biomarqueurs) par le plan d'expériences. D'autre part, ces résultats peuvent être utiles pour déduire les normes de qualité des eaux marines dans les eaux côtières de la baie de Bousmail en Algérie. En effet, les CL_{50}-72h trouvés sont inférieurs aux normes algériennes des métaux traces admises dans les rejets d'effluents liquides industriels pour le Zn et le Cu et supérieur pour le Cd (Tables III.1.2) [245]. Ainsi, les valeurs limites algerienne des métaux traces dans les effluents liquides industriels rejeté dans le milieu marin ne doivent pas dépasser les valeurs détectées dans ces essais biologiques basés sur la mortalité. Cette exigence est primordiale pour la préservation de l'espèce.

TableauIII.1. 3. Valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents liquidesindustriels.

Paramètres	Unités	Valeurs limites
Cd	$mg.L^{-1}$	0,2
Zn	$mg.L^{-1}$	3,0
Cu	$mg.L^{-1}$	0,5

Conclusion

L'éxposition aiguë des moules « *Mytilus galloprovincialis* » à des concentrations létales à court terme pour le cadmium (Cd), le zinc (Zn) et le cuivre (Cu) a été réalisée *via* la détermination des CL_{50} durant 72heures d'éxposition. Cette partie d'étude nous a permis de conclure d'importantes points suivants :

1) Les trois métaux étudiés ont des effets létaux à court terme à travers les CL_{50}-72h enregistrées chez *Mytilus galloprovincialis* (2,60, 1,86 et 0,10 mg. L^{-1} pour le Cd, Zn et Cu, respectivement). Donc, le classement de la sensibilité *vis-à-vis* ces métaux est la suivante : Cd<Zn<Cu.

2) À l'exception de deux autres métaux, le Cu exerce une toxicité létale à très faibles concentrations à court terme, ce qui peut engendrer des toxicités des moules dans les milieux récepteurs car la norme Algérienne fixée pour les rejets des effluents industriels fixée est supérieure à la CL_{50}.

Par ailleurs, les CL_{50} trouvées seront exploitées dans l'étude de la bioaccumulation et la toxicité des métaux traces *via* le bioessai par le plan d'expérience afin de définir les domaines de définitions sublétaux des facteurs (Cd, Zn et Cu).

III.2. Modélisation de la bioaccumulation des métaux traces par l'utilisation de plan d'expérience

III.2.1.Introduction

L'approche de bioaccumulation permet d'évaluer l'état de pollution du milieu et estimer les eventuels impacts sur la santé du consommateur [81,246-250]. Ceci met en valeur les bioindicateurs comme outils comparables aux mesure physicochimiques [249] d'où cette approche est actuellement considérée plus efficace que les mesures directes dans l'eau [246].

Dans les biotests écotoxicologiques classiques, les organismes vivants sont exposés au nombre limité des doses des xénobiotiques (unaire, multiple/mélange « binaire et/ou ternaire ») pendant une durée prédéterminée. De plus, les relations « dose-réponse » et les interactions écotoxicologiques (antagoniste, synergique et non interaction) entre le mélange des métaux ne sont pas définies en continu dans le domaine de variation (entre la limite inférieure (niveau bas) et la limite supérieure (niveau haut) des doses (facteurs)) au cours d'exposition [43,81,251-253].

Afin de relier la contamination des milieux et celle des organismes, différents modèles mathématiques (modèle d'équilibre et le modèle cinétiques) ont été utilisés pour décrire et prédire les processus de la bioaccumulation dans les organismes aquatiques [81,120,170]. En effet, ces modèles dépendent aux plusieurs facteurs tels que : les compartiments, la physiologie de l'organisme en intégrant clairement la notion de taux d'ingestion de la nourriture (TI), d'efficacité d'assimilation (EA), ainsi que le taux de croissance des organismes (TC)[81,246].Parmi les modèles cinétiques à base physiologique, le modèle biodynamique est le plus communément utilisé pour évaluer la bioaccumulation chez les organismes aquatiques [172].

Récemment, les indices de la bioaccumulation chez les organismes aquatiques tels que l'IBMI et l'IPM ont été utilisés soit sur le terrain (*in situ)* ou soit au niveau du laboratoire pour évaluer la charge métallique corporelle par la combinaison de la bioaccumulation des différents métaux (multimétallique) en un seul indice qui est l'IBMI ou l'IPM [254-257].

Par ailleurs, à notre connaissance, il n'existe aucune étude publiée dans la modélisation en écotoxicologie sur la combinaison entre la bioaccumulation de métaux tracesdans les organismes marins en particulier les mollusques bivalves et le plan d'expériences (PE) pour le but de modéliser et optimiser la bioaccumulation des métaux traces.

Dans ce contexte, il semble très important d'utiliser les techniques statistiques et en particulier la méthodologie de surface de réponse (MSR) pour modéliser et optimiser la

bioaccumulation par l'utilisation les organismes sentinelles dans les bioessais écotoxicologiques. Cette originale application permet d'obtenir le maximum d'informations avec le minimum d'expériences. Aussi, elle est souplesse, précise avec sûreté, rapide et à faible coût [176,177].

Dans ce travail, le plan composite centré à faces centrées (CCF) à trois facteurs a été utilisé pour évaluer et prédire (1) la bioaccumulation des métaux traces (éléments essentiels: Zn^{2+}, Cu^{2+}, élément non essentiel/xénobiotiques : Cd^{2+}) et (2) la charge métallique totale par l'utilisation des indices de bioaccumulation (IBMI et IPM) chez *Mytilus galloprovincialis*. Aussi, les interactions toxicologiques (antagonistes, synergiques et sans/zéro interaction) entre les facteurs (métal-métal) ont été également identifiées et optimisées.

III.2.2. Modélisation/Optimisation de la bioaccumulation et les interactions toxicologiques

L'approche CCF a été adoptée pour l'étude des effets individuels et des interactions écotoxicologiques des variables sélectionnées (X_1, X_2, X_3) sur les réponses étudiées: la bioaccumulation des métaux traces (Cd, Zn et Cu) et les indices de la bioaccumulation (IBMI et IPM). Ces réponses expérimentalesen fonction des variables indépendantes sont citées dans le tableau III.2.1.

III.2.2.1. Modèles de bioaccumulation des ETM, IBMI et IPM

Les modèles postulés de second degré de la bioaccumulation et leurs indices proposés dans cette étude sont basés sur des hypothèses simples qui dépendent uniquement de la concentration des métaux traces accumulés dans les tissus de *M. galloprovincialis* lors des expositions à des concentrations sublétales. Pour construire ces modèles, les réponses de l'accumulation de Cd (Y_1, $\mu g.g^{-1}$ poids humide), de Zn (Y_2, $\mu g.g^{-1}$ poids humide) et de Cu (Y_3,$\mu g.g^{-1}$ poids humide), l'IBMI (Y_4) et le IPM (Y_5) ont été corrélées avec les trois facteurs indépendants par l'utilisation de polynôme du second ordre (Eq.II.2) et elles sont données par les équations Eq.III.2.1, Eq. III.2.2, Eq. III.2.3, Eq. III.2.4 et Eq. III.2.5, respectivement.

$$Y_1 = 10{,}44 + 9{,}95X_1 - 2{,}41X_2 - 0{,}39X_3 - 2{,}28X_1X_2 - 0{,}56X_1X_3 + 0{,}10X_2X_3 - 0{,}22\,X^2{}_1 + 1{,}90\,X^2{}_2 - 1{,}59\,X^2{}_3 \quad \text{(III.2.1)}$$

$$Y_2 = 55{,}05 - 2{,}43\,X_1 + 11{,}23\,X_2 + 0{,}76\,X_3 - 1{,}38\,X_1X_2 - 2{,}00\,X_1X_3 + 6{,}29\;X_2X_3 - 4{,}97\,X^2{}_1 - 1{,}40\;X^2{}_2 - 6{,}11\,X^2{}_3 \quad \text{(III.2.2)}$$

Tableau III.2.1. Réponses de la bioaccumulation des métaux traces (Cd, Zn et Cu) et les indices de la bioaccumulation (IBMI et IPM).

Essai	Facteurs			Réponses									
	Niveaux codés			Accumulation des métaux traces						Indices de la bioaccumulation			
				Y_1 : Cd µg.g^{-1}ph		Y_2 : Zn µg.g^{-1}ph		Y_3 : Cu µg.g^{-1}ph		Y_4: IBMI		Y_5: IPM	
	X_1	X_2	X_3	VR[a]	VP[b]	VR[a]	VP[b]	VR[a]	VP[b]	VR[a]	VP[b]	VR[a]	VP[b]
1	-1	-1	-1	00,06	00,62	37,59	35,89	01,46	01,37	00,34	00,34	01,50	02,09
2	+1	-1	-1	26,45	26,23	38,05	37,82	01,72	02,19	00,58	00,59	12,03	11,63
3	-1	+1	-1	00,78	00,15	49,03	48,54	01,13	01,17	00,34	00,36	03,51	02,23
4	+1	+1	-1	16,85	16,63	44,98	44,93	01,41	01,19	00,46	00,45	10,23	10,71
5	-1	-1	+1	00,67	00,77	29,39	28,86	04,69	04,89	00,39	00,41	04,52	03,92
6	+1	-1	+1	23,60	24,11	22,85	22,75	03,81	03,75	00,71	00,68	12,72	13,88
7	-1	+1	+1	00,60	00,70	67,03	66,69	08,09	07,60	00,37	00,36	06,88	07,16
8	+1	+1	+1	15,59	14,91	53,93	55,04	05,61	05,68	00,46	00,46	16,77	16,07
9	+1	0	0	00,40	00,25	49,46	52,51	03,41	03,75	00,35	00,33	04,08	05,07
10	-1	0	0	19,58	20,16	48,38	47,64	03,45	03,19	00,49	00,51	14,84	14,29
11	0	-1	0	15,73	14,76	39,87	42,42	03,51	03,00	00,49	00,49	13,02	12,25
12	0	+1	0	08,52	09,93	65,13	64,89	03,27	03,86	00,39	00,39	12,20	13,41
13	0	0	-1	08,75	09,23	45,72	48,17	01,60	01,40	00,40	00,39	08,62	09,20
14	0	0	+1	08,48	08,44	49,85	49,71	05,12	05,40	00,42	00,44	12,94	12,79
15	0	0	0	11,67	10,44	58,45	55,05	03,75	03,41	00,42	00,41	13,68	12,52
16	0	0	0	11,25	10,44	55,87	55,05	03,66	03,41	00,42	00,41	13,20	12,52
17	0	0	0	09,29	10,44	55,48	55,05	03,00	03,41	00,40	00,41	11,56	12,52

Facteurs	Symbole codé	Niveaux		
		-1	0	+1
Concentration nominale de Cd^{2+}	X_1	0	5% CL_{50}-72h (0,13)	10 % CL_{50}-72h (0,26)
Concentration nominale de Zn^{2+}	X_2	0	5% CL_{50}-72h (0,09)	10 % CL_{50}-72h (0,18)
Concentration nominale de Cu^{2+}	X_3	0	5% CL_{50}-72h (0,005)	10 % CL_{50}-72h (0,01)

[a]Valeur réelle, [b]Valeur prédite.

$$Y_3 = 3{,}41 - 0{,}27X_1 + 0{,}42X_2 + 2{,}00X_3 - 0{,}19X_1X_2 - 0{,}48X_1X_3 + 0{,}73X_2X_3 + 0{,}05X^2{}_1 + 0{,}02X^2{}_2 - 0{,}01\,X^2{}_3 \quad \text{(III.2.3)}$$

$$Y_4 = 0{,}41 + 0{,}08X_1 - 0{,}04X_2 + 0{,}02X_3 - 0{,}04X_1X_2 + 0{,}00X_1X_3 - 0{,}01X_2X_3 + 0{,}01\,X^2{}_1 + 0{,}03\,X^2{}_2 + 0{,}00X^2{}_3 \quad \text{(III.2.4)}$$

$$Y_5 = 12{,}52 + 4{,}61X_1 + 0{,}58X_2 + 1{,}79X_3 - 0{,}26X_1X_2 + 0{,}10X_1X_3 + 0{,}77\,X_2X_3 - 2{,}84\,X^2{}_1 + 0{,}30\,X^2{}_2 - 1{,}52\,X^2{}_3 \quad \text{(III.2.5)}$$

II.2.2.2. Évaluation de la qualité des modèles mathématiques

Plusieurs indicateurs sur la qualité des modèles postulés sont utilisés afin d'évaluer leurs résultats et choisir les plus performants pour les prévisions dans le domaine d'étude. Ainsi, pour montrer que les modèles établis pour chacune des réponses expliquent bien les résultats expérimentaux. Parmi ces outils il yal'analyse de la variance, la recherche globale de l'ajustement (R^2 et $R^2_{ajusté}$) du modèle et l'analyse des résidus [176,177].

III.2.2.2.1. Les coefficients de détermination (R^2 et $R^2_{ajusté}$)

Pour évaluer le degré d'explication du modèle par rapport aux réponses mesurées, on établit les coefficients de détermination (R^2 et $R^2_{ajusté}$) [176,177]. Puis, on définit le coefficient de détermination R^2 comme étant la fraction des variations de la réponse expliquée par le modèle seul.Autrement dit, c'est le rapport de la somme des carrés des réponses calculées (corrigées de la moyenne) à la somme des carrés des réponses mesurées (corrigées de la moyenne).

Cette statistique prend des valeurs comprises entre 0 et 1. En effet, si le modèle permet de retrouver exactement la valeur des réponses mesurées, la somme des carrés des réponses calculées est égale à la somme des carrés des réponses mesurées.

Le R^2 est égal à 1, si le modèle fournit des réponses calculées égales à la moyenne. Par contre, si la somme des carrés des réponses calculées est égale à 0 ceci signifie que le R^2 est égal à 0. Dans ce cas, on dit que le modèle n'a pas d'explication des réponses issues du modèle [176,177, 258,259].

Le coefficient de détermination ajusté $R^2_{ajusté}$ est défini de façon similaire que R^2, comme étant la fraction des variations de la réponse expliquée par le modèle seul, mais relativement aux degrés de liberté correspondants (nombre des termes : linéaires - interactions -

quadratiques). En effet, le coefficient de détermination $R^2_{ajusté}$ prend en compte le nombre de variables et la taille de l'échantillon (p.e. 17 essaies)[176, 258-260].

Le R^2 le plus élevé est simplement obtenu en incluant toutes les variables, mais la meilleure équation de régression multiple n'utilise pas nécessairement toutes les variables disponibles. À cause de ce problème, la comparaison des différentes équations de régression multiple se fait mieux avec le coefficient de détermination ajusté, qui tient en compte de nombre de variables et de la taille de l'échantillons [259].

Aussi, les coefficients de détermination (R^2 et $R^2_{ajusté}$) jouent un rôle comme des indicateurs de la signification des coefficients du modèle. Myers et al.[261] ont signalé que lorsque R^2 et $R^2_{ajusté}$diffèrent considérablement, il y a de fortes chances que des termes non significatifs aient été inclus dans le modèle.

Dans notre travail, les valeurs du coefficient de détermination R^2 des modèles de l'accumulation de Cd, Zn et Cu et les indices de bioaccumulation (IBMI et IPM) obtenues sont égales à 0,99, 0,98, 0,96, et 0,97 et 0,96, respectivement. Cela signifie que 96-99% des variations de ces réponses sont expliquées par ces modèles et que l'intervalle 1-4% reste par conséquent inexpliquée par faute de différences.

Les coefficients de détermination ajustés ($R^2_{ajusté}$) sont 0,98, 0,95, 0,91, 0,93 et 0,92 pour les réponses de l'accumulation de Cd, Zn, Cu, IBMI et IPM respectivement. Ils représentent une correction des R^2 qui permettent de prendre en compte le nombre de variables utilisées dans les modèles. Ces deux coefficients montrent une bonne corrélation entre ces modèles (valeurs prédites) et les données expérimentales (valeurs observées) (Figure III.2.1.a et Figure III.2.1.b).

Par ailleurs, les valeurs de R^2 et $R^2_{ajusté}$ pour toutes les réponses signifient que le modèle explique bien les résultats. Selon Demim et al. [262] et Barrick et al. [208], les modèles mathématiques sont de bons outils pour décrire et prédire la nature des relations entre les facteurs abiotiques et les réponses biochimiques à la fois *in situ* et au laboratoire.

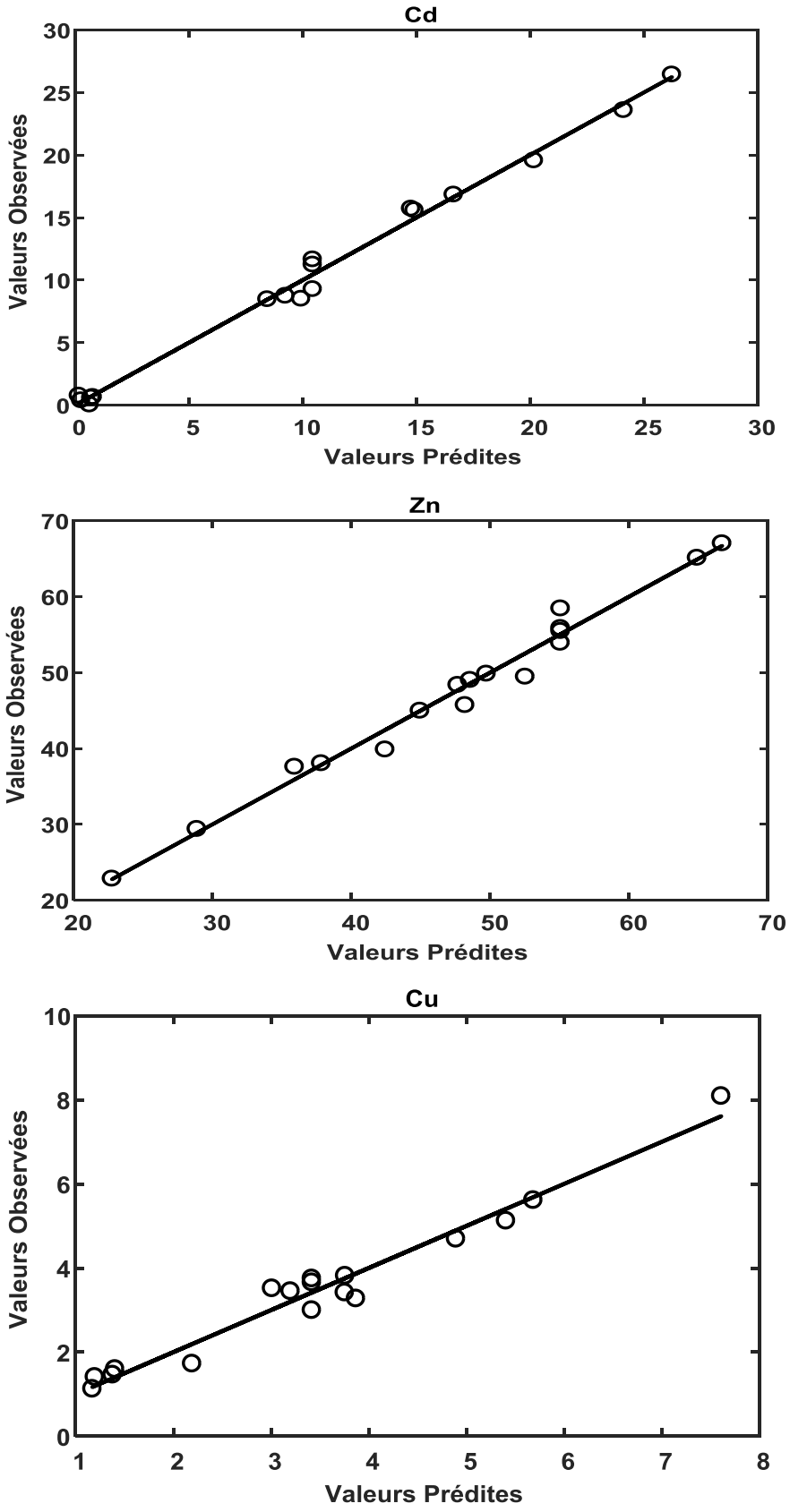


Figure III.2.1.a. Valeurs des réponses observées en fonction des réponses prédites (cas de Cd, Zn et Cu).

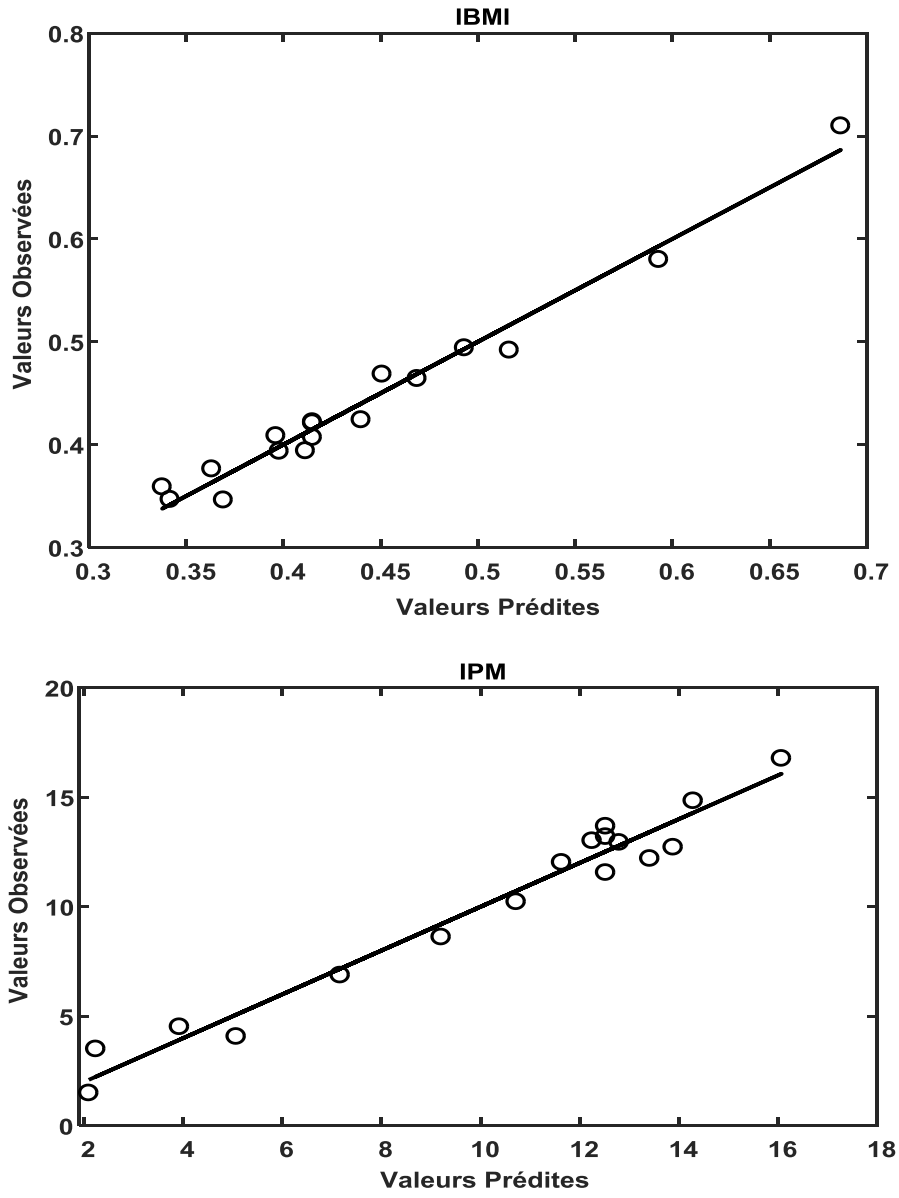


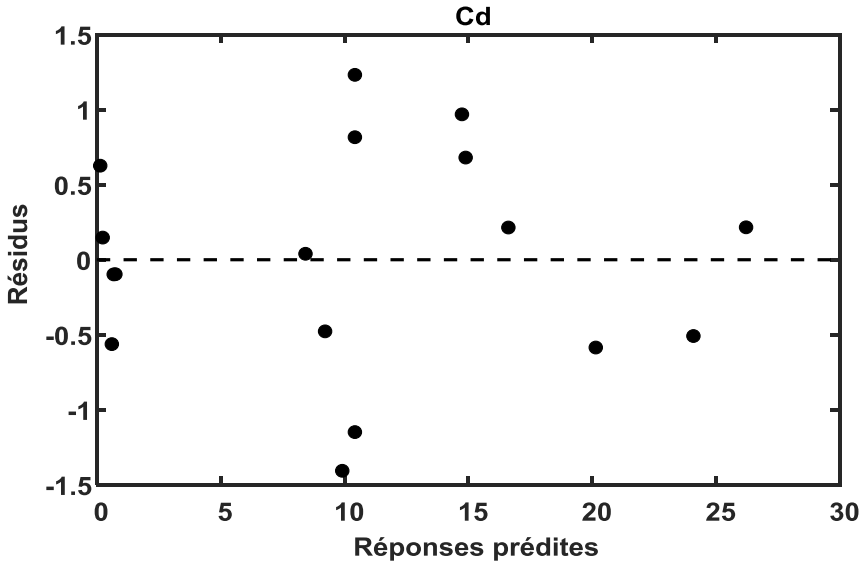
Figure III.2.1.b. Valeurs des réponses observées en fonction des réponses prédites (cas de IBMI et IPM).

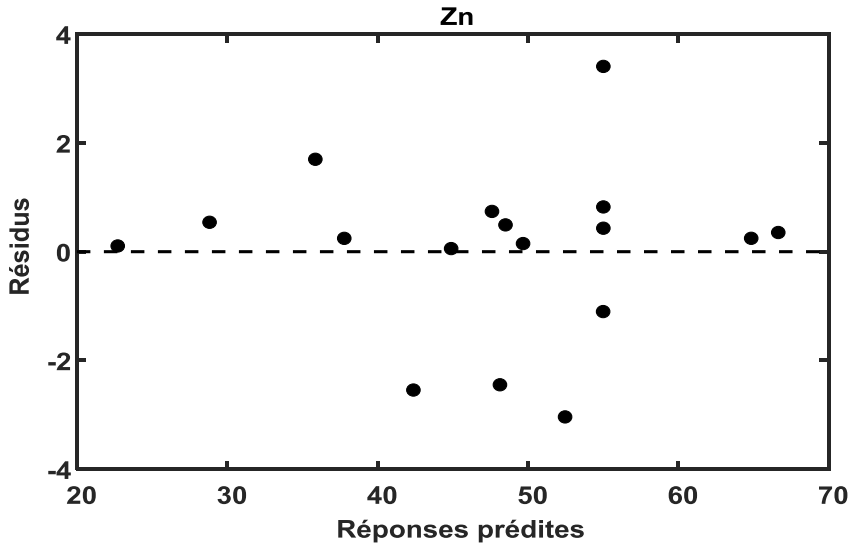
III.2.2.2.2. Analyses des résidus

L'analyse des résidus a pour objectif de tester la validité d'un modèle de régression. Elle permet de juger l'adéquation d'un modèle. Par définition, les résidus ou « erreurs observées » sont définis comme étant les différences entre les valeurs observées et les valeurs estimées par un modèle de régression ($e_i = Y_i - \widehat{Y}_i$), ils ont la particularité de représenter la partie non expliquée par l'équation de régression. Les méthodes d'analyse des résidus sont principalement des méthodes graphiques, parmi lesquelles, nous pouvons citer : le graphique des résidus en fonction des valeurs estimées ($\widehat{Y}_i$). Ce graphique étant l'un des plus fréquemment utilisées pour vérifier la validité d'un modèle. L'analyse de ces graphiques est

assez simple pour la vérification. En effet, il s'agit de vérifier que la représentation des résidus ne présente aucunetendance (structure) particulière (p.e.tendance parabolique : modèle choisi est inadéquat) [176,261,263,264].

Dans notre travail, les résultats d'analyses des résidus par les graphes qui portent la valeur des résidus en fonction des réponses prédites de la bioaccumulation des ETM et les indices (IBMI et IPM) (Figure III.2.2.a et Figure III.2.2.b) montrent que les valeurs des résidus en fonction des réponses prédites sont faibles qui signifient que les valeurs des réponses prédites et mesurées étaient très proches et leur dispersion ne présentent pas une tendance particulière dans la plupart des cas étudiés. À cet effet, nous pouvons considérer que les résidus sont bien répartis au hasard. Ceci nous permet de déduire d'une façon affirmative que les modelés établis expliquent bien les résultats expérimentaux.





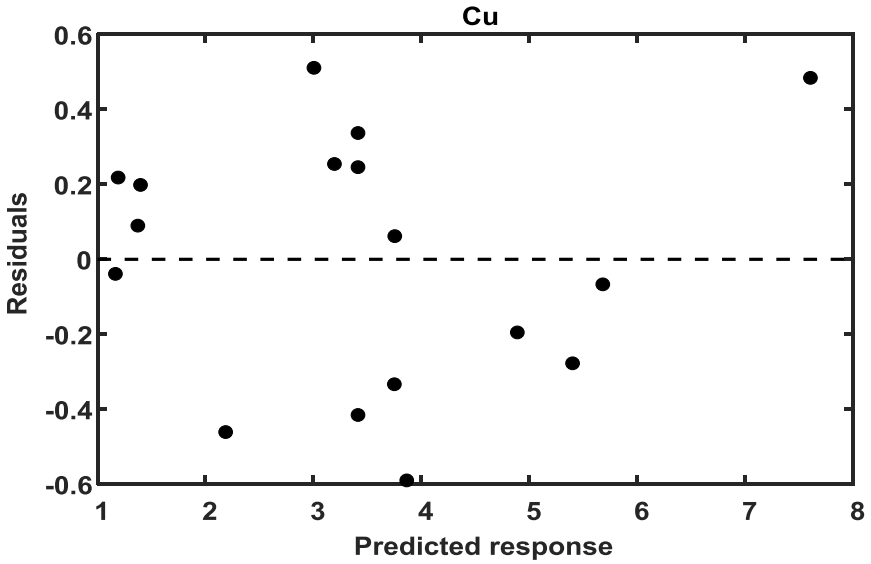
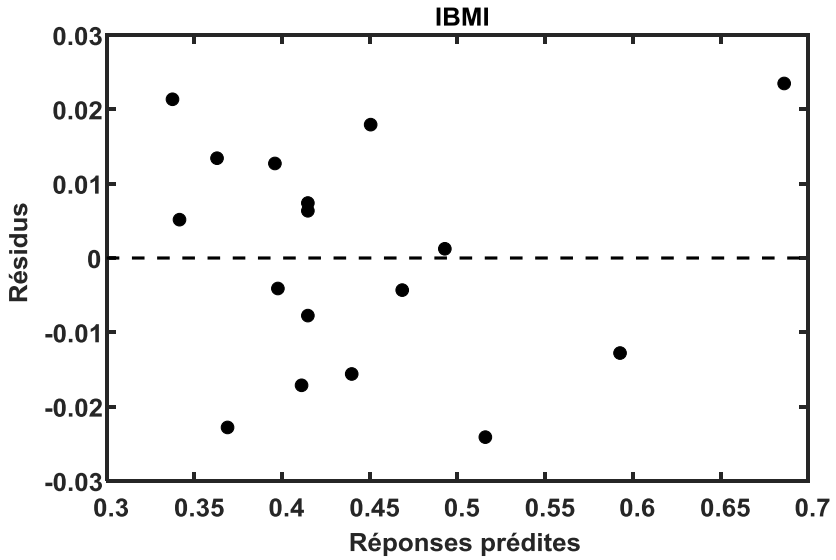


Figure III.2.2.a. Diagramme des résidus pour les réponses bioaccumulation (cas de Cd, Zn et Cu).



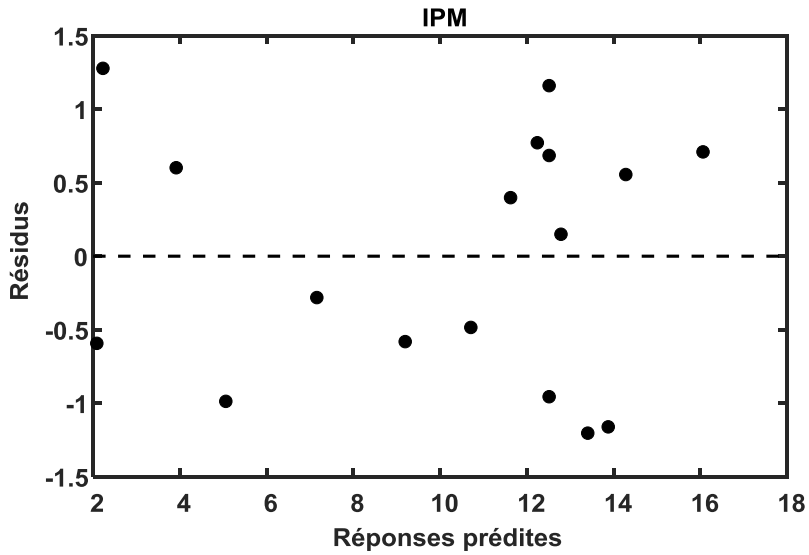


Figure III.2.2.b. Diagramme des résidus pour les indices(cas de IBMI et IPM).

III.2.2.2.3. Analyse de la variance (ANOVA)

Par définition, la variance de la population est égale à la somme des carrés des écarts à la moyenne divisée par le nombre de degrés de liberté des écarts à la moyenne de l'échantillon. À cet effet, l'analyse de variance consiste à évaluer les variances des écarts (p.e. Erreur expérimentale, écarts d'ajustement (lack of fit) et résidus) et les comparer entre elles. À cet effet, l'analyse de la variance (ANOVA) est appliquée pour l'évaluation globale des modèles obtenus, manque d'ajustement et la significativité des facteurs ou effets. En effet, l'analyse ANOVA est basée sur le statistique de Fisher-Snedecor et la valeur-p associée [176,177,265,266].

Le test de Fisher-Snedecor est un test qui permet de comparer deux variances. Pour conclure que le modèle postulé, l'effet d'un facteur ou l'interaction «x», par exemple, est significatif, nous cherchons à montrer que la variance (carré moyen) associée au modèle, ou facteur et ou à l'interaction étudié(e) (CM_x) est supérieure à la variance associée au résidu (CM_r). On définit ainsi l'hypothèse statistique H_0, appelée hypothèse nulle, consiste à vérifier l'absence d'influence du facteur étudié ($H_0 : \beta_1 = \beta_2 = \ldots = \beta_m = 0$).

En fonction du risque α (il est généralement fixé à 5%), la loi de Fisher-Snedecor détermine un seuil de refus de l'hypothèse nulle que l'on appellera $F_{théorique}$. Ce test consiste donc à comparer le rapport entre CM_xet CM_rnoté (F de Fisher,F_{obs} ou F_0) avec la valeur $F_{théorique}$que nous trouvons dans le tableau lié à la loi de Fisher-Snedecor, en fonction : de degrés de liberté du facteur étudié (ddl_x), de la résiduelle (ddl_r) et du risque α que l'on choisit

(Appendice D). Aussi, ce rapport permet de calculer la probabilité que ces deux variances (carrés) ne soient pas égales [176,177,260, 265,266].

Si la probabilité (valeur p) associée au F de Fisher est inférieure à α (α = 0,05) l'hypothèse nulle H_0 est rejetée. Et si H_0 est rejetée, le test nous permet de conclure qu'au moins un des paramètres n'est pas égale à zéro et que la relation globale entre y et l'ensemble des variables indépendantes X_1, X_2,……, X_p est significative. Dans ce cas de non significativité, les termes concernés peuvent être exclus du modèle. Cependant, si H_0 ne peut être rejetée, nous ne disposons pas de preuves statistiques suffisantes pour conclure à l'existence d'une relation significative [265].

Le test F de Fisher est utilisé pour déterminer s'il existe une relation significative entre la variable dépendante et l'ensemble des variables indépendantes ; on parle de test de signification globale. Ainsi, le test t de student est utilisé pour déterminer si chacune des variables indépendantes est significative. Un test de Student est effectué pour chaque variable indépendante du modèle ; on parle de test de signification individuelle [265].

Ce test est dit le test F et propose une généralisation importante du test t de Student. Tandis qu'avec le test t on peut tester H_0: $\beta_i=0$, le test F nous permet de considérer l'hypothèse nulle H_0: $\beta_1=\beta_2= \ldots. =\beta_p=0$, une hypothèse qui concerne plusieurs coefficients à la fois. Le test de Student est une instance particulaire du test F, c'est-à-dire si on teste un seul coefficient, le carré du test t est en effet un test F[267]. À cet effet, la p-value du test de Student sur l'unique prédicteur est égale à la p-value du test de Fisher [266].

Dans ce travail, la valeur théorique $F_{0.05,\ 1,\ 9}$ est égale à 3,29 pour des degrés de libertés 7 (numérateur) et 9 (dénumérateur), et avec un intervalle de confiance de 95% (α=5%) (table de la loi de Fisher-Snedecor, Appendice C). Ainsi, le test de Fisher-Snedecor (F) est calculé pour les modèles et ces valeurs sont supérieures à 3,29 : $F_{model\ (Cd)}$=100,77, $F_{model\ (Zn)}$ = 42,20, $F_{model\ (Cu)}$ = 21,26, $F_{model\ (IBMI)}$=27,57 $F_{model\ (IPM)}$ = 21,72. Aussi, comme indiqué dans les tableaux III.2.2-III.2.6, les probabilités (Valeur-p) associée au test de Fisher (F) sont inférieures à 0,05. Cela signifie que les risques de la non significations des modèles sont inférieures à 0,05%, ce qui sont négligeables. Ces résultats indiquent que les modèles postulés sont globalement significatifs.

L'adéquation du modèle est testée par l'analyse statistique du manque d'ajustement (lack of fit). En effet, un modèle de régression présente une inadéquation de l'ajustement lorsqu'il n'est pas capable de décrire correctement les relations fonctionnelles entre les facteurs expérimentaux et la variable de réponse.

L'inadéquation de l'ajustement peut survenir si des termes importants pour le modèle, comme des interactions ou des termes quadratiques, ne sont pas inclus. Elle peut survenir également si l'ajustement du modèle donne plusieurs valeurs résiduelles exceptionnellement importantes. En règle générale, le modèle est bien ajusté aux données, si la variance due au manque d'ajustement est non significative. C'est-à-dire si la valeur -F est très faible et la valeur de p est supérieure à 0,05 [176,177,262,268].

L'analyse des tableaux III.2.2-III.2.6permet d'observer une faible valeur de F pour l'accumulation de Cd, Zn et Cu et les indices de bioaccumulation (IBMI et IPM), elles sont respectivement de 0,66, 2,63, 1,73,9,97 et de 1,40. La valeur de P est supérieure à 0,05, elle est respectivement de 0,69, 0,29, 0,40, 0,09 et de 0,46.

Aussi, ces valeurs de F signifiants qu'il ya des probabilités de 69, 29, 40, 9 et 46 % pour que les variances d'ajustement soient négligeables devants les variances des erreurs expérimentaux pour les modèles de l'accumulation de Cd, Zn et Cu et les indices de bioaccumulation l'IBMI et l'IPM respectivement. Cette analyse indique que la variance due au manque d'ajustement est non significative montrant que les modèles adoptés pour l'accumulation des métaux traces étudiés et les indices de bioaccumulation sont bien ajustés.

Les tableaux III.2.2-III.2.6présente l'analyse statistique des coefficients. Nous remarquons dans le cas du l'accumulation de Cd que tous les coefficients dans le modèle (III.2.2) sont significatifs avec une valeur-p inferieurs à 0,05 à l'exception de celui correspondant au termes Cu, Cd×Cd, Cu×Cu, Cd×Cu et Zn×Cu.

Dans le cas de Zn, tous les coefficients du modèle (III.2.3) sont significatifs avec une valeur-p inférieur à 0,05 à l'exception de celui correspondant au terme Cu, Zn×Zn et Cd×Zn.

Dans le cas de Cu, tous les coefficients du modèle (III.2.4) sont significatifs avec une valeur-p inférieur à 0,05 à l'exception de celui correspondant au terme Cd, Cd×Cd, Zn×Zn, Cu×Cu et Cd×Zn.

Dans le cas de l'IBMI, tous les coefficients du modèle (III.2.5) sont significatifs avec une valeur-p inférieur à 0,05 à l'exception de celui correspondant au terme Cd×Cd, Zn×Zn, Cu×Cu, Cd×Cu et Zn×Cu.

Dans le cas de l'IPM, tous les coefficients du modèle (III.2.6) sont significatifs avec une valeur-p inférieur à 0,05 à l'exception de celui correspondant au terme Zn, Zn×Zn, Cu×Cu, Cd×Zn, Cd×Cu et Zn×Cu.

On conclut dans cette partie de la modélisation que les tests statistiques montrent que les modèles établis pour chacune des réponses expliquent bien les résultats expérimentaux. Ces

modèles vont pouvoir être utilisés pour faire des prévisions des réponses dans le domaine d'étude (notre cas d'étude : bioaccumulation des ETM et leurs indices de bioaccumulation).

Table III.2.2. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse de l'accumulation de Cd.

Source	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur F	Valeur de P
Modèle-Cd	9	1107,92	123,10	100,77	0,00
Linéaires	3	1051,09	350,36	286,80	0,00
Cd	1	991,12	991,12	811,31	0,00
Zn	1	58,40	58,40	47,81	0,00
Cu	1	1,56	1,56	1,28	0,29
Carré	3	12,50	4,16	3,41	0,08
Cd×Cd	1	0,14	0,14	0,11	0,74
Zn×Zn	1	9,74	9,73	7,97	0,02
Cu×Cu	1	6,85	6,85	5,61	0,05
Interaction à 2 facteurs	3	44,33	14,77	12,10	0,00
Cd×Zn	1	41,68	41,67	34,11	0,00
Cd×Cu	1	2,58	2,57	2,11	0,19
Zn×Cu	1	0,08	0,08	0,07	0,80
Erreur (Résidus)	7	8,55	1,22		
Inadéquation de l'ajustement	5	5,32	1,06	0,66	0,69
Erreur pure	2	3,23	1,61		
Total	16	1116,47			

Table III.2.3. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse de l'accumulation de Zn.

Source	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur F	Valeur de P
Modèle-Zn	9	2150,28	238,92	42,20	0,00
Linéaires	3	1327,26	442,42	78,15	0,00
Cd	1	59,13	59,13	10,44	0,01
Zn	1	1262,22	1262,22	222,96	0,00
Cu	1	5,91	5,91	1,04	0,34
Carré	3	458,41	152,80	26,99	0,00
Cd×Cd	1	66,39	66,39	11,73	0,01
Zn×Zn	1	5,25	5,25	0,93	0,36
Cu×Cu	1	100,03	100,03	17,67	0,00
Interaction à 2 facteurs	3	364,61	121,54	21,47	0,00

Cd×Zn	1	15,34	15,34	2,71	0,14
Cd×Cu	1	32,27	32,27	5,70	0,04
Zn×Cu	1	317,00	317,00	56,00	0,00
Erreur (Résidus)	7	39,63	5,66		
Inadéquation de l'ajustement	5	34,40	6,88	2,63	0,29
Erreur pure	2	5,23	2,61		
Total	16	2189,91			

Table III.2.4. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse de l'accumulation de Cu.

Source	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur F	Valeur de p
Modèle-Cu	9	49,15	5,46	21,26	0,00
Linéaires	3	42,65	14,21	55,34	0,00
Cd	1	0,77	0,77	3,00	0,12
Zn	1	1,84	1,84	7,19	0,03
Cu	1	40,03	40,03	155,82	0,00
Carré	3	0,01	0,00	0,02	0,99
Cd×Cd	1	0,00	0,00	0,04	0,85
Zn×Zn	1	0,00	0,00	0,00	0,94
Cu×Cu	1	0,00	0,00	0,00	0,96
Interaction à 2 facteurs	3	6,47	2,15	8,41	0,01
Cd×Zn	1	0,31	0,31	1,21	0,30
Cd×Cu	1	1,89	1,89	7,39	0,03
Zn×Cu	1	4,27	4,27	16,62	0,00
Erreur (Résidus)	7	1,79	0,25		
Inadéquation de l'ajustement	5	1,46	0,29	1,73	0,40
Erreur pure	2	0,33	0,16		
Total	16	50,94			

Table III.2.5. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse IBMI.

Source	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur F	Valeur P
Modèle-IBMI	9	0,13	0,01	27,57	0,00
Linéaires	3	0,10	0,03	67,54	0,00
Cd	1	0,07	0,07	150,69	0,00
Zn	1	0,02	0,02	42,87	0,00
Cu	1	0,00	0,00	9,06	0,02
Carré	3	0,00	0,00	4,14	0,05
Cd×Cd	1	0,00	0,00	0,73	0,42
Zn×Zn	1	0,00	0,00	4,71	0,06

Cu×Cu	1	0,00	0,00	0,05	0,83
Interaction à 2 facteurs	3	0,01	0,00	11,04	0,00
Cd×Zn	1	0,01	0,01	27,17	0,00
Cd×Cu	1	0,00	0,00	0,55	0,48
Zn×Cu	1	0,00	0,00	5,41	0,05
Erreur (Résidus)	7	0,00	0,00		
Inadéquation de l'ajustement	5	0,00	0,00	9,97	0,09
Erreur pure	2	0,00	0,00		
Total	16	0,13			

Table III.2.6. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse IPM.

Source	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur F	Valeur de p
Modèle-IPM	9	309,49	34,38	21,72	0,00
Linéaires	3	248,19	82,73	52,25	0,00
Cd	1	212,57	212,57	134,26	0,00
Zn	1	3,38	3,38	2,14	0,18
Cu	1	32,24	32,24	20,36	0,00
Carré	3	55,83	18,61	11,76	0,00
Cd×Cd	1	21,65	21,65	13,68	0,00
Zn×Zn	1	0,25	0,25	0,16	0,70
Cu×Cu	1	6,21	6,21	3,92	0,08
Interaction à 2 facteurs	3	5,45	1,81	1,15	0,39
Cd×Zn	1	0,55	0,55	0,35	0,57
Cd×Cu	1	0,08	0,08	0,06	0,82
Zn×Cu	1	4,80	4,80	3,04	0,12
Erreur (Résidus)	7	11,08	1,58		
Inadéquation de l'ajustement	5	8,61	1,72	1,40	0,46
Erreur pure	2	2,46	1,23		
Total	16	320,57			

III.2.2.3. Effets des facteurs opérationnels sur la bioaccumulation

L'effet (ou effet principal) de facteur (x) sur la réponse (y) est défini comme la variation de cette réponse quand ce facteur passe du niveau bas au niveau haut [261,263,269]. L'effet moyen d'un facteur (effet/2) est la demi-différence de la variation de la réponse entre le niveau haut (y_2) et le niveau bas du facteur (y_1) ou c'est la variation de la réponse quand on passe du niveau zéro au niveau haut du facteur. Cette déférence est représentée par les coefficients des termes du premier degré (β_1, β_2, β_3) du modèle mathématique. Et, l'effet

global d'un facteur est la différence de la variation de la réponse entre le niveau haut (y_2) et le niveau bas du facteur (y_1) [176,177,260,263].

Dans le cas d'absence d'effet, les coefficients sont non significatifs (P > 0,05) et différents de zéro [258, 270,271]. Au contraire, si les coefficients sont significatifs (P < 0,05) et différents de zéro, le signe d'un coefficient (+ ou -) définit la direction de la relation entre l'effet et la réponse. Le signe positif indique que lorsque la valeur d'un effet change, la valeur de la réponse change également dans la même direction (effet positif), tandis que pour le signe négatif, la réponse change dans la direction opposée (effet négatif). La valeur absolue des coefficients mesure l'importance de la relation [258, 272, 273].

Dans le cas de la bioaccumulation du Cd, une variation de X_1 d'un niveau bas au niveau haut a entraîné une augmentation de 19,91 µg. g^{-1} poids humide dans le processus de bioaccumulation, tandis qu'une augmentation de X_2 et X_3 a entraîné une diminution du processus de bioaccumulation de 4,83 µg. g^{-1} poids humide et 0,79 µg. g^{-1} poids humide, respectivement.

Dans le cas de la bioaccumulation du Zn, l'élévation de X_2 et de X_3 d'un niveau bas au niveau haut a entraîné une augmentation du processus de bioaccumulation de 22,46 µg. g^{-1}poids humide et de 1,53 µg.g^{-1} poids humide respectivement, tandis qu'une augmentation de X_1 a entraîné une diminution du processus de bioaccumulation de 4,86 µg.g^{-1} poids humide.

De plus, dans le cas de la bioaccumulation du Cu, l'élévation de X_2 et de X_3 d'un niveau bas au niveau haut a entraîné une augmentation de 0,85 µg. g^{-1}poids humide et de 4,00 µg. g^{-1}poids humide dans le processus de bioaccumulation, alors qu'une augmentation de X_1 a entraîné une diminution de l'efficacité de la bioaccumulation de 0,55 µg. g^{-1}poids humide.

Dans le cas de l'IBMI, l'élévation de X_1 et X_3 du niveau bas au niveau haut a entraîné une augmentation de la charge métallique de 0,17 et 0,04 respectivement, tandis qu'une augmentation de X_2 a entraîné une diminution de la charge métallique de 0,09.

Pour l'IPM, l'élévation de X_1, X_2 et X_3 a entraîné une augmentation de la charge métallique de 9,22, 1,16 et 3,59, respectivement.

Les moules *Mytilus galloprovincialis* ont une grande capacité d'accumulation des métaux traces provenant du milieu environnant (eau, sédiments et/ou nourriture) en raison de leur sédentarité et de leur comportement de filtration [217,251]. En outre, la connaissance de l'accumulation des métaux traces dans les moules à travers les biotests au laboratoire et/ou *in situ* pourrait fournir des informations très utiles pour l'écotoxicologie marine [43, 252, 274].

Dans le groupe témoin (Essai1-Table III.2.1), les concentrations des métaux étudiés dans les tissus de *Mytilus galloprovincialis* ont diminué dans l'ordre suivant : Zn (37,59 µg.g^{-1}poids humide) > Cu (1,46 µg.g^{-1}poids humide)> Cd (0,06 µg.g^{-1}poids humide) et étaient en dessous de niveaux maximums admissibles. Concernant le Cd, le seuil métal fixé par la réglementation algérienne[275] (1,0 µg de Cd.g^{-1} poids humide), est toujours inférieure aux seuils et selon le Codex alimentaire turc [276]qui précise une norme concernant les deux autres métaux traces étudiés (50 µg de Zn et 20 µg de Cu par g^{-1} poids humide) sont également inférieures (Tableau III.2.7).

Ces résultats sont comparables aux études de biosurveillance où la bioaccumulation (teneur en métaux traces) chez *Mytilus galloprovincialis* selon l'ordre Zn > Cu > Cd [217]. De même, Kamaruzzaman et al. [63] ont signalé que la bioaccumulation des métaux dans les tissus de la moule verte *Perna viridis*est dans l'ordre suivant : Zn > Cu > Cd, montrant que les métaux traces essentiels sont trouvés à un taux plus élevé que les métaux non essentiels. García-Navarro et al. [251] ont déclaré que la concentration en métaux oligo-éléments détectée dans le groupe témoin peut être considérée comme optimale pour le développement du processus physiologique. En effet, l'augmentation de l'accumulation de Cd, Zn et Cu dans les moules lors de tests de bioaccumulation dans des conditions de laboratoire a été signalée par certains auteurs [43,123,238,252].

Comme cela a été démontré pour les invertébrés marins, la toxicité des métaux est le résultat de la bioaccumulation, qui est un processus dépendant du temps, ainsi que d'un système d'exposition spécifique (statique ou dynamique), de facteurs physiologiques, de facteurs chimiques (p.e., la biodisponibilité) et de facteurs environnementaux [81,239,277,278].

Nous pouvons conclure que le Zn est le facteur le plus important du processus de bioaccumulation puisque son coefficient est le plus grand confirmé par le modèle choisi pour le Zn (11,23 µg.g^{-1} poids humide calculé par le modèle). Jakimska et al. [274] ont déclaré que le niveau de zinc est plus élevé dans les tissus frais des mollusques car c'est un élémentessentiel dans les processus métaboliques et un constituant de l'hémocyanine chez les mollusques.

Une corrélation linéaire de la bioaccumulation de Cd, Zn et Cu qui dépend du type de métal et de la concentration de métal dans le milieu expérimental dans des conditions contrôlées de concentration. Cette observation est en accord avec celle de Mersch et al. [253] ; ils ont trouvé une corrélation linéaire hautement significative entre les concentrations de Cu et de Cd dans le milieu et les niveaux de métal dans la moule "*Dreissena polymorpha*". De

même, Boudjema et al. [43] ont observé que la bioaccumulation de Cd, Pb et Cu chez *Perna perna* est linéaire et dépend aussi de la concentration de métaux traces dans le milieu expérimental.

Sur la base des effets principaux des facteurs du plan d'expérience, la bioaccumulation prédite des métaux traces est classée selon l'ordre suivant : Zn > Cd > Cu. Après l'éxposition, la teneur des métaux traces dans les moules dépasse largement les deux normes admissibles fixés par la réglementation algérienne [275] et le Codex alimentaire turc [276] (Tableau III.2.7). Ces différents niveaux d'accumulation et de sélectivité des métaux pourraient être dus à la compétition entre les ions métalliques pendant différents mécanismes de la prise en charge et de régulation des métaux [7,123].

Ainsi, selon le critère de la capacité d'accumulation des métaux trace, les moules tant que fruits de mer peuvent être des causes de risque sanitaire pour le consommateur.

III.2.2.4. Optimisation de la bioaccumulation et l'identification des interactions métal-métal

Les surfaces de réponses (3D), isoréponses (2D) de la bioaccumulation (métaux traces et leurs indices) et les diagrammes d'interactions métal-métal ont été générés à partir des modèles de régression pour décrire : (1) les types des interactions toxicologiques entre deux variables indépendantes sur la bioaccumulation des métaux traces et leurs indices et (2) les paramètres optimaux du processus biologique.

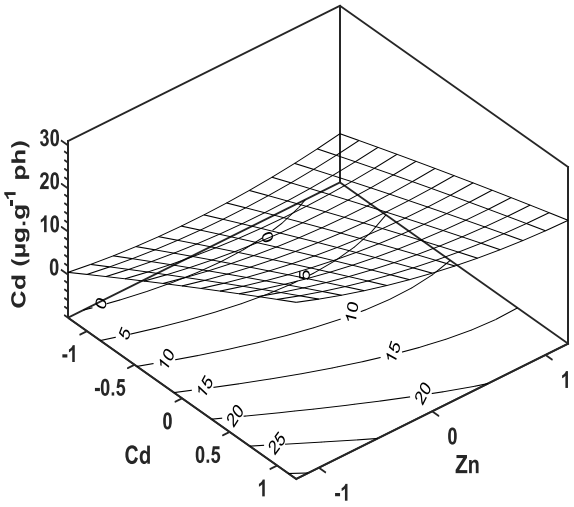
La méthodologie de surface de réponses (MSR) est l'une des plus importantes méthodes générales utilisées dans l'analyse des effets combinés produits par les mélanges des métaux traces [262,279]. En effet, les interactions toxicologiques se produisent lorsque l'effet d'une variable indépendante (facteur 1) varie en fonction du niveau d'une autre variable indépendante (facteur 2) [176,177, 280-284].En conséquence, l'interaction apparaît comme la demi différence entre l'effet moyen du facteur 1 au niveau haut du facteur 2 (effet noté ef^{+}) et l'effet moyen du facteur 1 au niveau bas du facteur 2 (effet noté ef^{-}) [176,177]. Elle traduit une variation de l'effet moyen d'un facteur en fonction du niveau d'un autre facteur. La valeur dedemi différence de l'effets moyens représente les coefficients des interactions d'ordre deux (β_{12}, β_{13}, β_{23}) dans les modèles (Eq. III.2.1, Eq. III.2.2, Eq. III.2.3, Eq. III.2.4 et Eq. III.2.5). Une interaction est décrite comme synergique lorsque l'exposition à une variable indépendante provoque une augmentation significative de l'effet d'une autre. Au contraire, une interaction est décrite comme antagoniste lorsque l'exposition à une variable indépendante entraîne une réduction de l'effet d'une autre variable [176,177,280,284].

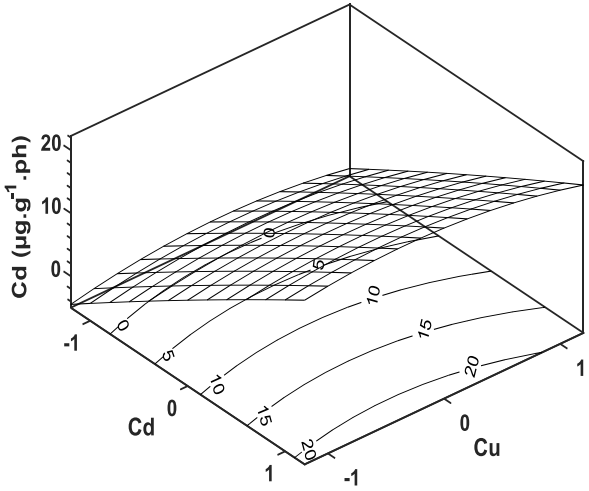
De même, dans les diagrammes des interactions (Fig.III.2.3, Fig.III.2.4, Fig.III.2.5, Fig.III.2.6 et Fig.III.3.7), les droites des effets ne sont pas parallèles, il y a une interaction significative entre deux facteurs (synergiques ou antagonistes) et les droites parallèles (ou presque parallèles) indiquent l'absence (zéro) d'interactions entre les facteurs (interaction non significative) [176,177, 280,284]. En cas d'interaction légère, les lignes du graphique ne se croisent pas [176,177,280,284]. Plus les droites s'écartent de la parallèle, plus le degré d'interaction est élevé. En revanche, pour une interaction forte (significative), les lignes du graphique se croisent [176,177,280,284].

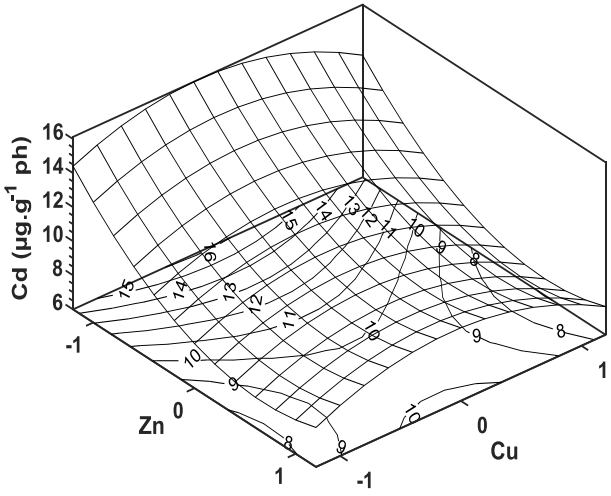
Dans cette étude, les métaux traces étudiés pourraient interférer et entraîner une interaction synergique, antagoniste ou absence d'interaction (interaction zéro ou nulle) sur la bioaccumulation de Cd, Zn et Cu par les moules. Sur la base du test F de Fisher-Snedecor, les coefficients du modèle et les courbes de contour 2D (Fig.III.2.3 à Fig.III.2.7) permettent d'identifier les types d'interactions toxicologiques métal-métal sur la bioaccumulation du Cd, Zn et Cu et sur les indices de la bioaccumulation (IBMI et IPM).

Dans le cas de la bioaccumulation du Cd, la figure III.2.3-a montre une interaction antagoniste entre X_1 et X_2. La bioaccumulation du Cd (en µg. g^{-1}poids humide) est maximale lorsque la concentration de Cd dans le milieu expérimental est au niveau haut et la concentration de Zn est au niveau bas. De plus, les Fig. III.2.3-b et Fig. III.2.3-c ont montré une absence d'interaction entre $X_1 \times X_3$ et $X_2 \times X_3$ sur la bioaccumulation de cadmium.

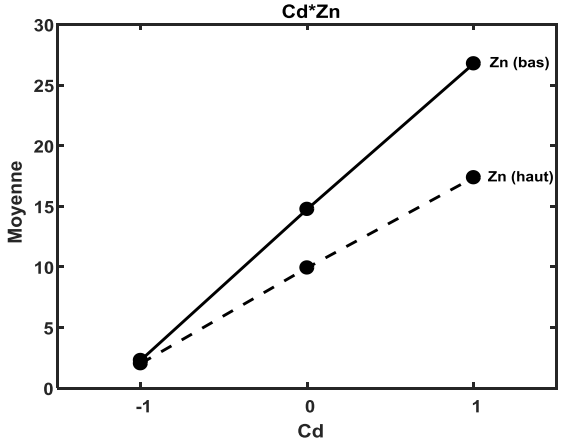
Dans le cas de la bioaccumulation du Zn, les Fig.III.2.4-d, Fig.2.4-e et Fig. III.2.4-f montrent une interaction antagoniste entre X_1 et X_3, une interaction synergique entre X_2 et X_3 et aucun effet d'interaction entre X_1 et X_2. La bioaccumulation du Zn (en µg. g^{-1}poids humide) est maximale (1) lorsque la concentration de Cd et Cu dans le milieu expérimental sont aux niveaux zéro et (2) lorsque les concentrations du Zn et Cd sont aux niveaux hauts.Pour la bioaccumulation du Cu, la Fig.III.2.5-h a montré une interaction antagoniste entre X_1 et X_3. Une interaction synergique entre X_2 et X_3 (Fig. III.2.5-k) et aucun effet d'interaction entre X_1 et X_2 (Fig. III.2.5-g).

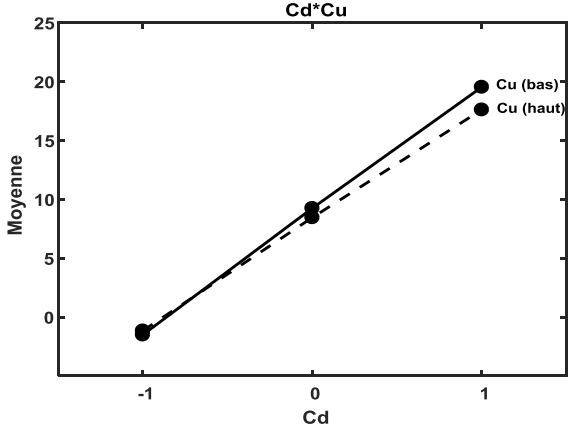

Cd (µg.g-1 ph)
Cd
Zn


Cd (µg.g-1.ph)
Cd
Cu


Cd (µg.g-1 ph)
Zn
Cu

(a) **(b)** **(c)**


Cd*Zn
Zn (bas)
Zn (haut)
Moyenne
Cd


Cd*Cu
Cu (bas)
Cu (haut)
Moyenne
Cd

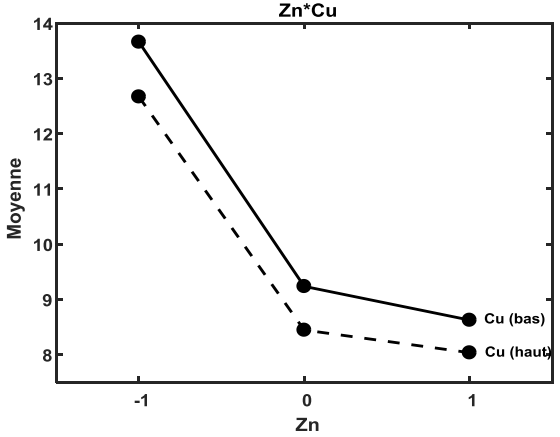
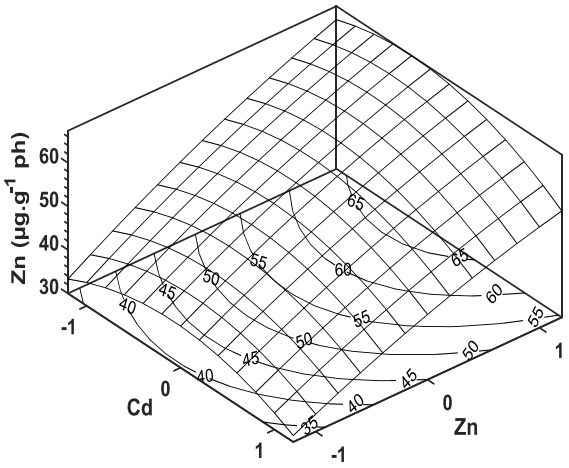
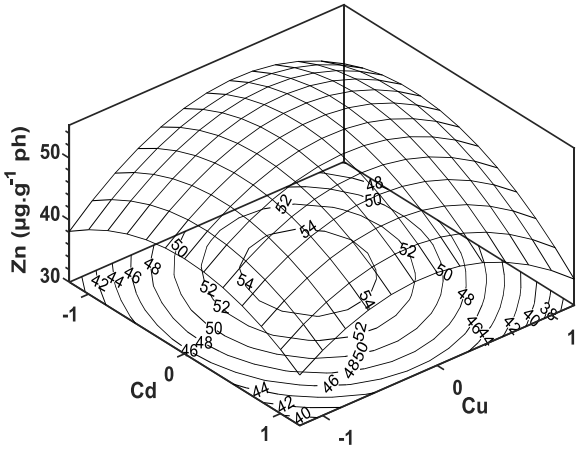
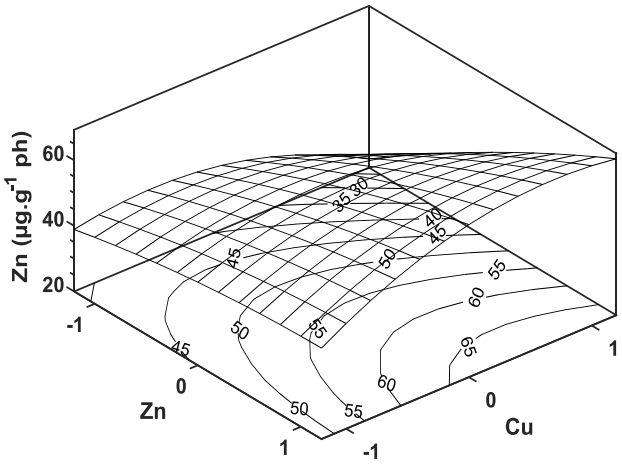

Zn*Cu
Cu (bas)
Cu (haut)
Moyenne
Zn

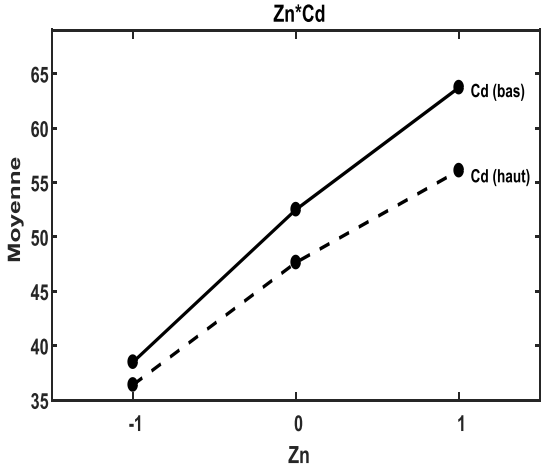
Figure III.2.3. Effet du Cd, Zn et Cu sur la bioaccumulation du Cd (µg.g^{-1} poids humide) ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (a) Cd-Zn, (b) Cd-Cu,(c) Zn-Cu.


Zn (µg.g-1 ph)
Cd
Zn

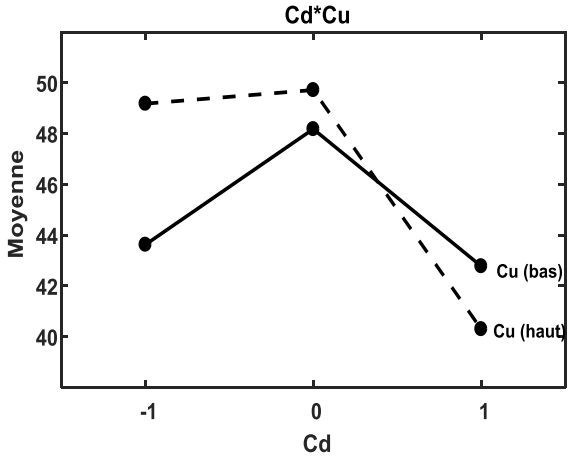

Zn (µg.g-1 ph)
Cd
Cu


Zn (µg.g-1 ph)
Zn
Cu

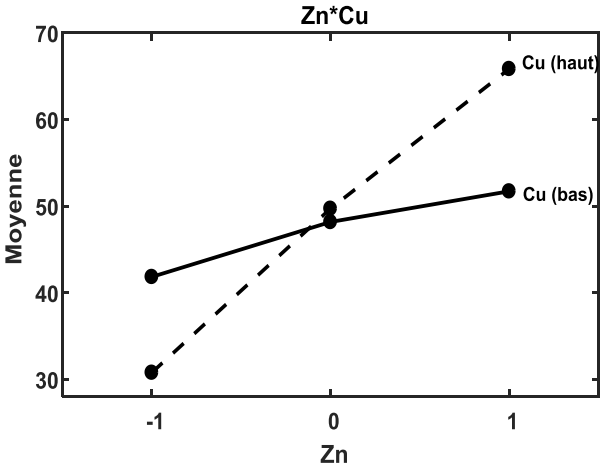
(d)


Zn*Cd
Moyenne
Zn
Cd (bas)
Cd (haut)

(e)


Cd*Cu
Moyenne
Cd
Cu (bas)
Cu (haut)

(f)


Zn*Cu
Moyenne
Zn
Cu (haut)
Cu (bas)

FigureIII.2.4. Effet du Cd, Zn et Cu sur la bioaccumulation du Zn (µg.g^{-1} poids humide) ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et à des diagrammes d'interaction : (d) Cd-Zn, (e) Cd-Cu (f) Zn-Cu.

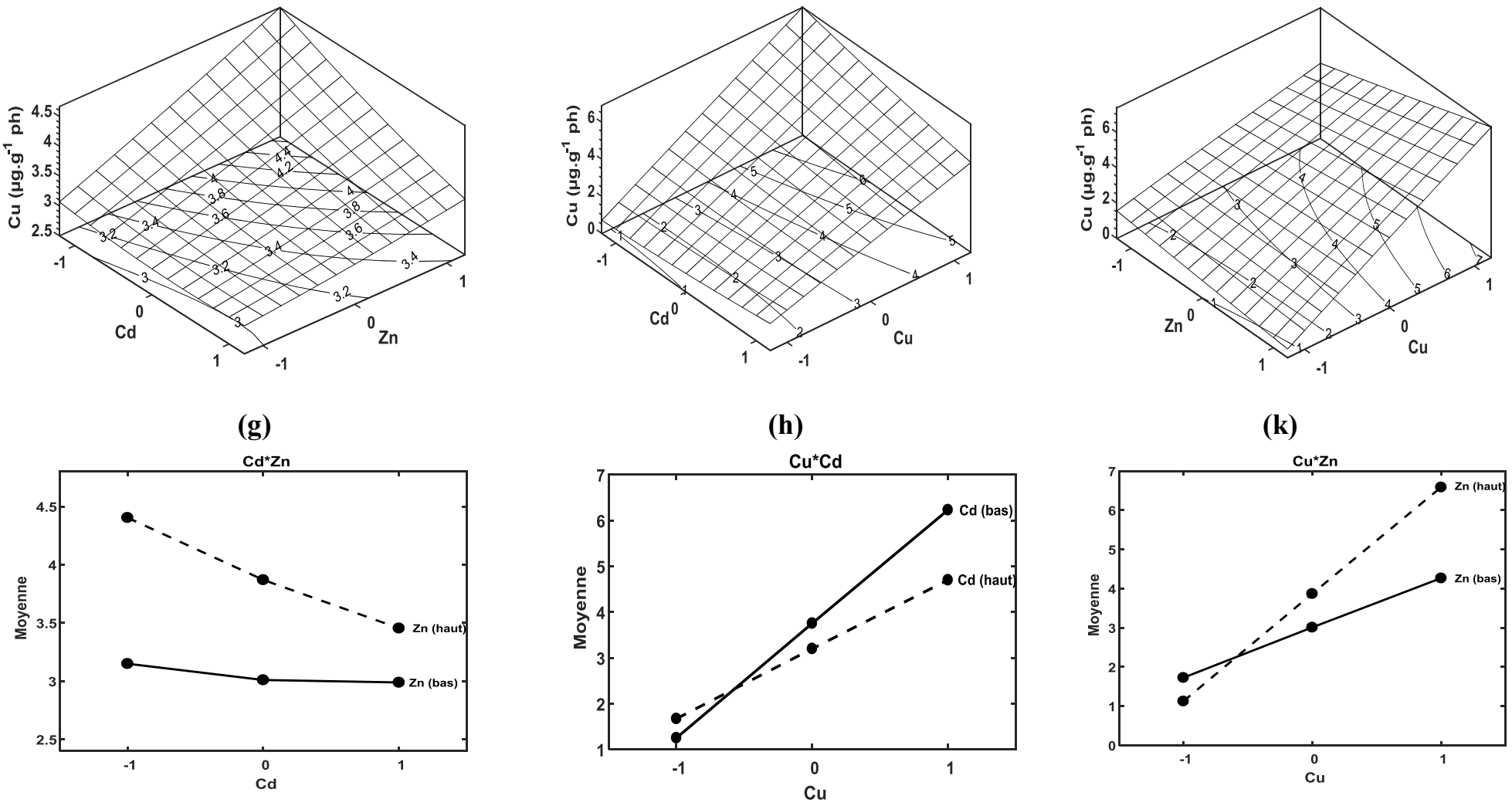


Figure III.2.5. Effet de Cd, Zn et Cu sur la bioaccumulation du Cu (µg.g^{-1} poids humide) ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (g) Cd-Zn, (h) Cd-Cu (k) Zn-Cu.

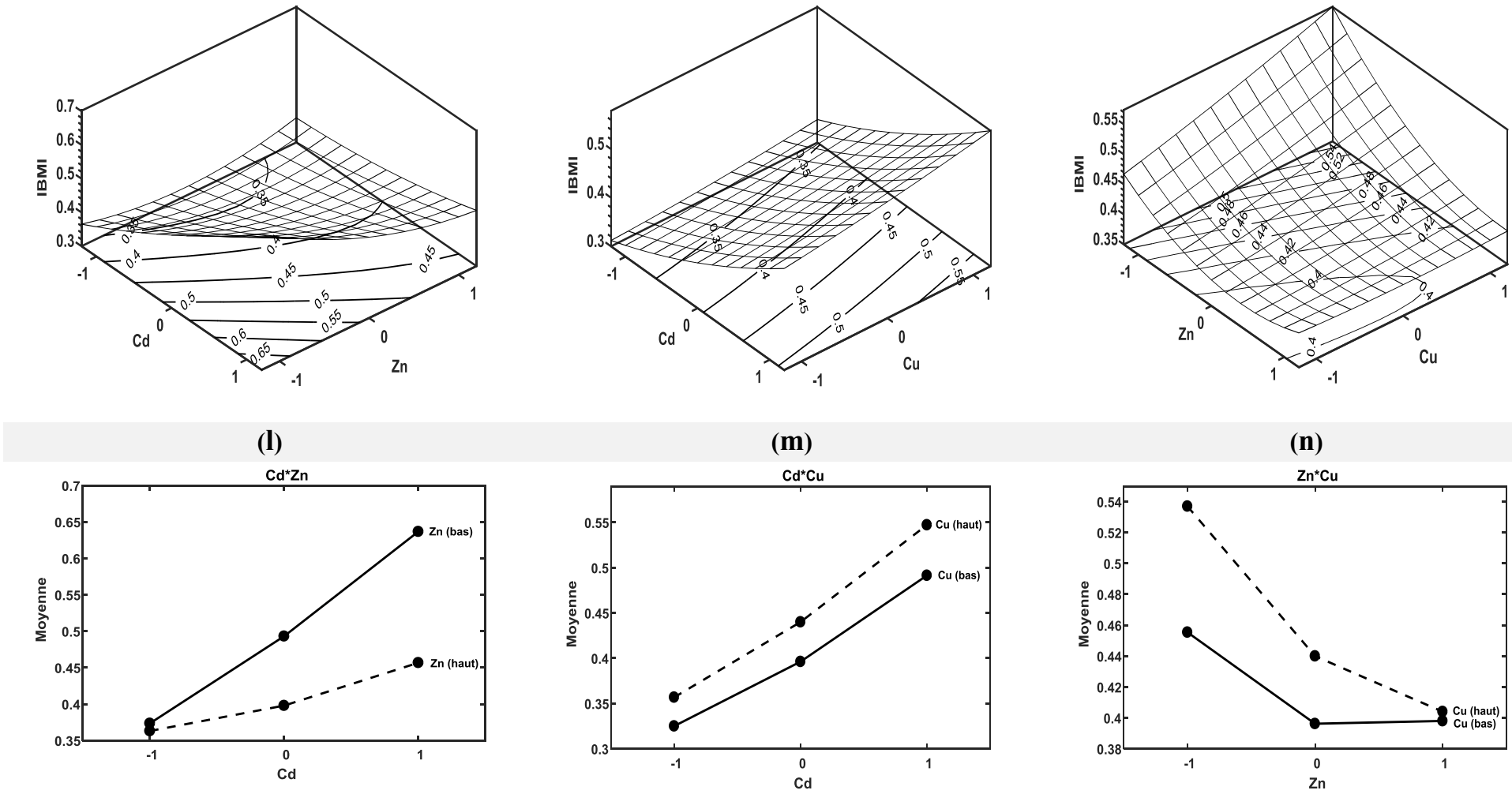


Figure III.2.6. Effet de Cd, Zn et Cu sur l'IBMI ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (l) Cd-Zn, (m) Cd-Cu (n) Zn-Cu.

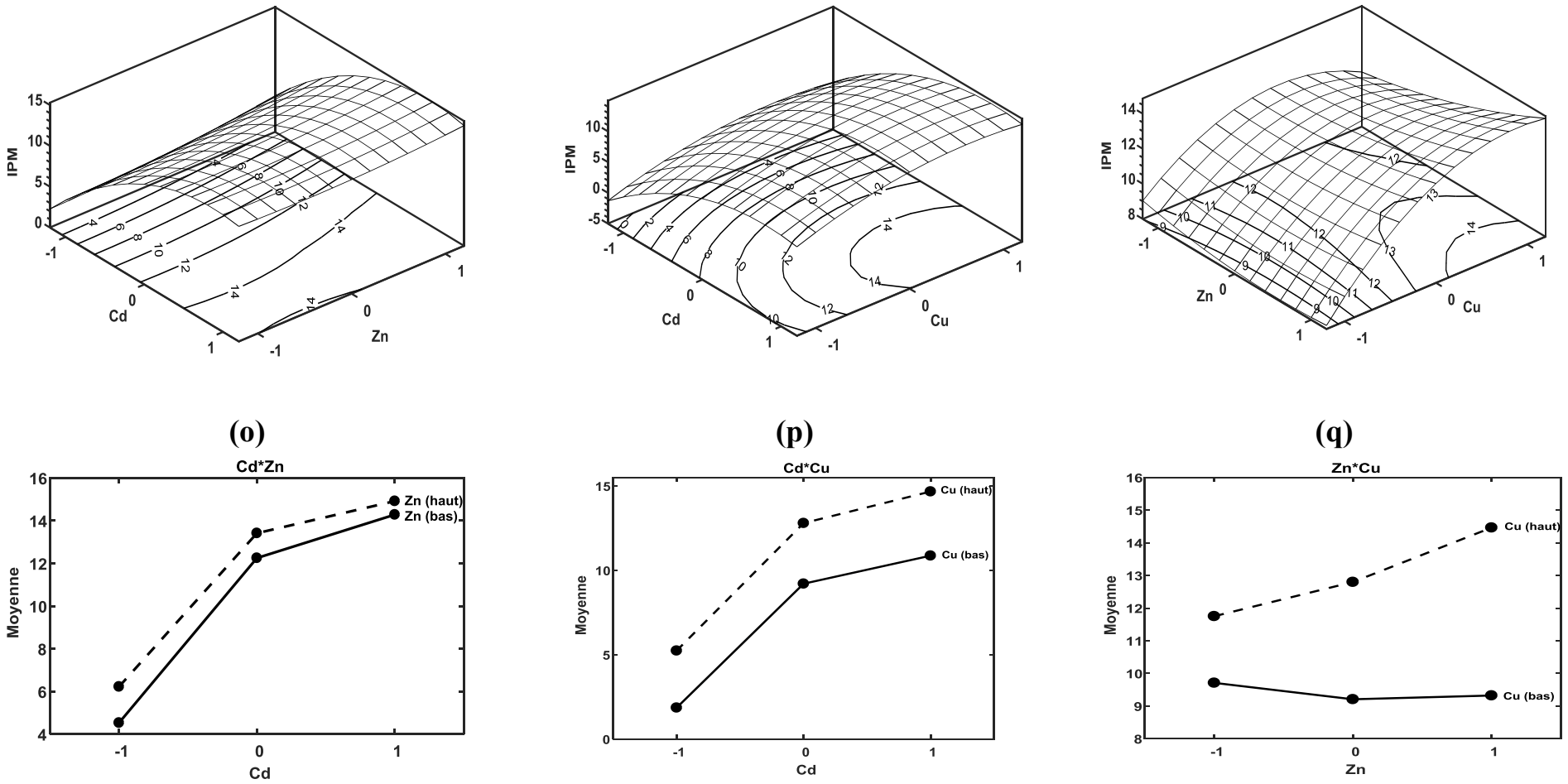


Figure III.2.7. Effet de Cd, Zn et Cu sur l'IPM ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (o) Cd-Zn, (p) Cd-Cu (q) Zn-Cu.

La bioaccumulation du Cu (en µg. g^{-1} poids humide) est maximale (1) lorsque la concentration de Cu dans le milieu expérimental est au niveau haut et la concentration de Cd est au niveau bas et (2) lorsque les concentrations du Zn et Cu sont aux niveaux hauts.Dans le cas de l'IBMI, la Fig.III.2.6-l a montré une interaction antagoniste entre X_1 et X_2 et aucun effet d'interaction entre X_1 et X_3 (Fig. III.2.6-m) et X_2 et X_3 (Fig. III.2.6-n). La charge métallique (IBMI) est maximale lorsque la concentration de Cd dans le milieu expérimental est au niveau haut et la concentration de Zn est au niveau bas.

Pour l'IPM, la Fig.III.2.7-o, la Fig.III.2.7-p et la Fig. III.2.7-q ont montré aucun effet d'interaction entre les facteurs combinés ($X_1 \times X_2$), ($X_1 \times X_3$) et ($X_2 \times X_3$).

Les surfaces de réponses (3D) de la bioaccumulation des métaux traces (Cd, Zn et Cu) et les indices de la bioaccumulation ont montré des pics clairs ou des zones optimales, ce qui suggère que les conditions optimales pour le maximum de la bioaccumulation de Cd, Zn et Cu et les indices de bioaccumulation sont à l'intérieur dans les zones d'études (Fig.III.2.3, Fig. III.2.4, Fig. III.2.5, Fig. III.2.6 et Fig. III.2.7).

Dans ce travail, nous avons utilisé la méthode de désirabilité pour optimiser les paramètres de la bioaccumulation et les indices de la bioaccumulation. Le logiciel Minitab Trial version 20 (Minitab Inc., State College, PA, USA) nous permet d'estimer les valeurs prédites par la valeur de désirabilité (d) composite (globale) variant de 0 à 1 avec des valeurs parfaites lorsque d = 1, et des valeurs acceptables lorsque d > 0,6[176,177,285,286].

Dans notre cas, le but était de maximiser les réponses de la bioaccumulation des métaux traces et les indices (IBMI et IPM). Les résultats de l'optimisation sont présentés dans le tableau III.2.7.Les conditions optimales de la bioaccumulation déterminées sont les suivant une concentration de Cd de 0,22 mg.L^{-1}, une concentration de Zn de 0,18 mg. L^{-1}et une concentration de Cu de 0,01 mg. L^{-1}. Les réponses prévues pour la combinaison optimale sont Y_1 = 12,91 µg. g^{-1}poids humide, Y_2= 59,37 µg. g^{-1}poids humide et Y_3= 5,94 µg.g^{-1}poids humide pour Cd, Zn et Cu, respectivement, avec une désirabilité composite de 0,65.

Tableau III.2.7. Valeurs optimales des paramètres du processus de bioaccumulation, avec les limites supérieures admissibles.

Valeurs optimales des métaux traces	Métaux traces (mg. L^{-1})		
	Cd	Zn	Cu
	0,22	0,18	0,01
Bioaccumulation (µg.g^{-1} poids humide)	12,91	59,37	5,94
Désirabilité composite		0,65	
Teneurs maximales (µg.g^{-1} poids humide)	1	50	20

Pour l'IBMI, les conditions optimales de bioaccumulation déterminées sont les suivant une concentration de Cd de 0,26 mg. L^{-1}, une concentration de Zn de 0 mg. L^{-1}et une concentration de Cu de 0,01 mg. L^{-1}. La réponse optimale pour la combinaison optimale est de 0,68 avec une désirabilité composite de 0,93 (Tableau III.2.8).

Pour l'IPM, les conditions optimales de bioaccumulation déterminées sont les suivant une concentration de Cd de 0,23 mg. L^{-1}, une concentration de Zn de 0,18 mg. L^{-1}et une concentration de Cu de 0,009mg.L^{-1}. La réponse optimale pour la combinaison optimale est de 16,23 avec une désirabilité composite de 0,96 très acceptable (0,98) [285] (Tableau III.2.8).

Tableau III.2.8. Valeurs optimales des indices de bioaccumulation maximale (IBMI et IPM).

	Indices de la bioaccumulation					
	IBMI			IPM		
	Exposition aux métaux (mg.L^{-1})					
	Cd	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu
	0,26	0	0,01	0,23	0,18	0,009
Valeurs optimales	0,68			16,23		
Désirabilité composite	0,93			0,96		

D'après ces résultats on peut constater que la MSRpourrait être utilisé rentablement pour optimiser les paramètres du processus de la bioaccumulation et les indices de bioaccumulation chez les moules par l'utilisation de la combinaison de tests biologiques et les plans d'expériences.

La bioaccumulation des métaux essentiels est donc un processus naturel, exigé par tous les organismes vivants afin de satisfaire à leurs besoins métaboliques [7]. La bioaccumulation est donc le résultat des processus par lesquels le contaminant entre dans l'organisme et des processus de décontamination (détoxification), une combinaison des mécanismes d'excrétion vers l'environnement et de biotransformation endogène [81, 287]. Dans le cas de déséquilibre entre ces processus, le métal peut devenir toxique [7,81,214].

Cependant, la majorité des études de laboratoire sur la bioaccumulation des métaux traces ont été focalisées sur la bioaccumulation individuelle des métaux traces et peu d'études se sont intéressées sur l'évaluation de la bioaccumulation métalliques des mélanges des métaux traces et les interactions toxicologiques (antagonistes, synergiques et sans interaction) causées par le mélange de métaux traces sur la bioaccumulation des métaux traces [7,43,214,251, 253, 277,255,288-290].

En outre, l'accumulation de métaux traces tels que Cd, Cu et Zn par les moules est liée à la liaison de ces ions métalliques à des ligands spécifiques ayant une affinité plus élevée *vis-à-vis* des métaux traces [7,291].

Deux structures intracellulaires sont impliquées dans la séquestration et le stockage des métaux: Métallothionéines (MT) et les granules insolubles (riche en groupements phosphate et sulfure) [7, 66,78]. Les métallothionéines (MT), des protéines de fixation (stockage) des métaux, sont riches en cystéine qui présentent un large éventail d'activités biologiques (polyfonctionnelles), notamment (1) l'homéostasie des métaux essentiels (Zn et Cu), (2) la détoxification des métaux traces non essentiels (Cd), et (3) la défense antioxydante cellulaire (piégeage des radicaux libres) [7,274,292-295].La capacité d'induction de la Metallothionéine est importante dans les tissus actifs dans la prise en charge, le stockage et l'excrétion des métaux [296]. Chez *Mytilus galloprovincialis*, les MT ont été identifiées essentiellement dans les branchies [297]. La liaison des métaux traces à la Metallothionéine augmente la bioaccumulation des métaux traces dans ces organes comme l'hépatopancréas et le rein [78].

Plusieurs études ont montré que les interactions entre le Cd et le Zn dans l'organisme découlent en grande partie de l'affinité des deux métaux pour la MT et de leurs capacités à stimuler sa synthèse dans divers tissus, notamment, dans l'intestin, le foie et le rein [298].

De plus, des expériences réalisées *in vivo* sur des moules *Mytilus galloprovincialis* ou des rats Sprague Dawley ont confirmés que le rang de l'affinité n'est pas totalement respecté entre le métal et les groupes sulfhydryles *in vitro* qui diminue dans la séquence hiérarchique: Hg^{2+}>Cu^{+}, Ag^{+} et Bi^{3+} ≫ Cd^{2+}>Pb^{2+}>Zn^{2+}> Co^{2+}. Il a étéégalement démontré qu'*in vivo*, Cd^{2+}, Cu^{2+} ou Hg^{2+} peuvent déplacer le Zn^{2+} des MT. Cependant, dans la glande digestive des moules, le Cu^{2+} est capable de déplacer le Zn^{2+}, mais pas le Cd^{2+} pour le cadmium-thionéines ou de zinc-thionéines [288, 289, 299,294]. Bebianno et Langston [291] ont rapporté que, lorsque les moules étaient exposées individuellement aux mêmes concentrations de métaux traces (Cd et Cu), ces deux métaux induisaient la Metallothionéine, alors que l'exposition au Zn ne le faisait pas. En revanche, dans l'exposition individuels aux métaux traces (Cd et Cu), le Cd accumule plus que le Cu dans les branchies des moules (*Mytilus galloprovincialis*) [251].

Selon Gundarker [300], les différences dans les taux d'accumulation et de dépuration indiquent qu'elles sont le résultat du traitement et de la régulation interne des métaux. En outre, García-Navarro et al. [251]ont déclaré que la bioaccumulation des métaux traces augmentait significativement dans le groupe exposé au mélange ternaire (Cd-Pb-Cu). Au

contraire, il n'y avait pas de prototype de réponse commun à l'exposition dans les mélanges simples (Cd, Pb et Cu) et binaires (Cd-Pb, Cd-Cu et Pb-Cu).

Komjarova et Blust [290] ont signalé que les interactions entre les métaux traces peuvent affecter la bioaccumulation et la toxicité. En outre, la compétition entre les ions chimiquement similaires (p.e. Cd^{2+} et Zn^{2+}) pour les sites de liaison peut affecter de manière significative la bioaccumulation des ions par les moules [78]. Lorsque le processus d'exposition est simultané, Tao et al. [301] ont suggéré que l'absorption du cuivre et du plomb par les poissons a un effet synergique, ce qui signifie que le Pb semble facilite l'absorption du Cu et vice versa. Hemelraad et al.[302] ont constaté que le Zn inhibe l'absorption du Cd (interaction antagoniste Zn-Cd) dans les branchies des moules d'eau douce et accélère la redistribution du Cd dans les branchies vers les organes internes. En outre, la présence de Cu peut diminuer l'absorption de Cd [290].

Les effets toxiques de l'action du Cd sont causés par des interactions avec des composants essentiels tels que le Zn. Ces interactions peuvent se produire à différentes phases de l'absorption, de la distribution et de l'excrétion du métal, ainsi qu'au stade des fonctions biologiques du Zn [298]. En outre, le Cd et le Zn ont une grande affinité avec les structures biologiques (protéines, enzymes) contenant des groupes -SH (thiol ou sulphydryl) et une configuration électronique similaire sur leurs couches externes. Par conséquent, une compétition entre les ions Zn^{2+} et Cd^{2+} est possible pour la prise en charge [298]. De plus, les résultats de Benayoun et Fowler [303] ne montrent pas que le Zn influence sur la prise en charge du Cd par *Mytilus galloprovincialis*.

Dans ce présent travail, l'interaction toxicologique de type « synergique-antagonisme-sans effet » entre les métaux traces étudiés sur la bioaccumulation peut être interprétée par les effets de compétition aux différentes phases : la prise en charge, l'accumulation, la distribution et l'excrétion du métal avec la présence d'autres métaux. Des résultats similaires rapportés par Stewart [304] qui a signalé un effet antagonisme des métaux traces (Ni, Cu, Pb et Cu) sur l'accumulation de Cd chez la moule d'eau douce *Pyganodon grandis.* Selon Pelletier et al. [7], l'action toxicologique d'un métal, une fois accumulé, découle de son interaction anormale avec une biomolécule essentielle dans le site actif. Giguère et al.[86] ont déclaré que, la présence du Cd dans les ligands de faible poids moléculaire Cd-FPM et les ligands de haut poids moléculaire Cd-HPM suggère que la détoxication était imparfaite, c'est-à-dire que *P. grandis* a été soumise à un stress causé par le Cd même à des concentrations externes en Cd relativement modestes.

Dans notre travail, les conditions optimales de la bioaccumulation du plan d'expérience peuvent être liées au seuil de débordement cellulaire par saturation du mécanisme de détoxication de la MT et leur répartition entre les ligands intracellulaires de haut et faible poids moléculaire (HPM et FPM) (Tableau III.2.7).

Dans ce travail, la relation entre la teneur totale en métaux dans les tissus frais des moules et le niveau d'exposition aux mélanges métalliques a été mise en évidence par les indices de bioaccumulation (IBMI et IPM) (Essai1à essai17, Tableau III.2.1). Les valeurs IBMI des tissus de moules se situaient entre 0,34 et 0,71, ce qui a montré une légère variation (Tableau III.2.1). Des valeurs élevées d'IBMI ont été enregistrées dans les tissus de moules dans l'essai 6 (X_1= +1, X_2= -1, X_3= +1 qui correspondent à Cd = 0,26 mg.L^{-1}, Zn = 0 mg.L^{-1}, Cu = 0,01 mg.L^{-1}, Tableau III.2.1) indiquant une teneur en métal plus élevée, tandis que de faibles valeurs ont été trouvées dans les tissus de moules à l'essai 1 (X_1=X_2=X_3= -1 qui correspond à Cd = Zn = Cu = 0 mg.L^{-1}, Tableau III.2.1) et à l'essai 3 (X_1= -1, X_2= +1, X_3= -1 qui correspond à Cd = 0 mg.L^{-1}, Zn = 0,18 mg.L^{-1}, Cu = 0 mg. L^{-1}, Tableau III.2.1) indiquant une faible teneur en métaux.

Les valeurs des indices de la bioaccumulation (IBMI et IPM) sont utilisées *in situ* et en laboratoire pour estimer la variation de la pollution par les métaux traces en fonction de la teneur en métal (charge métallique) dans les tissus des organismes aquatiques, ce qui permet de différencier les écosystèmes pollués et non pollués [305]. Selon Maes et al. [38], les individus faiblement et fortement pollués ont un IBMI inférieur à 0,22 et supérieur à 0,25, respectivement. Selon Usero et al. [5], les valeurs de l'IPM chez le bivalve *Donax trunculus* (basées sur Cu, Pb, Zn, Ni, Cr et Cd) variaient entre 3,4 à 3,8 pour les régions non polluées et 6,8 à 7,8 pour les régions polluées.

Les valeurs d'IPM des tissus de moules variaient de 1,50 à 16,77 ce qui montre une large gamme de variations (TableauIII.2.1). La valeur la plus faible de l'IPM a été trouvée dans les moules témoins (contrôles, non exposées) comme niveau de base (Essai1: X_1=X_2=X_3=-1 qui correspond à Cd = Zn = Cu = 0 mg. L^{-1}, Tableau III.2.1) indiquant une teneur en métal plus faible. L'IPM le plus élevé a été trouvé dans les moules exposées à des mélanges ternaires de métaux de Cd = 0,26 mg. L^{-1}, Zn = 0,18 mg. L^{-1} et Cu = 0,01 mg.L^{-1} qui correspondent à X_1= X_2= X_3= +1 (Essai8, Table III.2.1), indiquant une teneur en métal plus élevée dans les tissus des moules *Mytilus galloprovincialis*. Les résultats de ce travaille montrent que les deux indices (IBMI et IPM) peuvent différencier les milieux pollués (Essai2 à essai17, Tableau III.2.1) des milieux non pollués (Essai1, Tableau III.2.1).

Le tableau III.2.9, montre que l'IBMI et l'IPM (basés sur Cd, Zn et Cu) peuvent être utilisés comme des outils pour l'évaluation des risques par l'identification des niveaux de charge métallique dans *Mytilus galloprovincialis* dans les conditions de laboratoire. Chaque niveau de charge métallique correspond à un code couleur : (1) faible charge métallique (vert), (2) charge métallique modérée (jaune), (3) charge métallique élevée (orange), (4) charge métallique très élevée (rouge). Par exemple, si les niveaux des indices entre 0,42 et 0,49 et 6,88 et 8,62 pour IBMI et IPM respectivement, le nombre des classes attribués à ces indices est 2 et les niveaux de pollution sont « modérées » et le code colleur jaune (Tableau II.2.9).

Table III.2.9. Intervalles de variation d'IBMI et d'IPM.

Nombre	Codes couleurs	Charge métallique	IBMI	IPM
1	Vert	Faible	[0,34-0,42[	[1,50-4,52]
2	Jaune	Modéré	[0,42-0,49]	[6,88-8,62]
3	Orange	Élevé	]0,49-0,58]	[10,23-13,68]
4	Rouge	Très élevé	]0,58-0,71]	[14,84-16,78]

Conclusion

L'évaluation de l'éxposition des moules « *Mytilus galloprovincialis* » à des concentrations sublétales à court terme pour le cadmium (Cd), le zinc (Zn) et le cuivre (Cu) a été réalisée *via* la bioaccumulation dans les tissus de *Mytilus galloprovincialis* et de la détermination des indices de la bioaccumulation (IBMI et IPM) par l'utilisation de la MSR et en particulier du modèle CCF.

Les résultats obtenus ont montré clairement que la MSR était une des méthodes appropriées pour caractériser et prédire la bioaccumulation des métaux traces dans des conditions de laboratoire. En outre, la bioaccumulation des métaux traces et les indices (IBMI et IPM)dépendent de type, concentration et combinaison des métaux.

Dans des conditions optimales, les valeurs maximales de la bioaccumulation de Cd, Zn et Cu étaient respectivement de 12,91 $\mu g.g^{-1}$poids humide, 59,37 $\mu g.g^{-1}$poids humideet 5,94 $\mu g.g^{-1}$poids humide. En outre, les valeurs de l'IBMI et du l'IPM ont été trouvées égales à 0,68 et 16,23, respectivement. Ces résultats sont toujours valables dans le domainede variation (entre la limite inférieure (niveau bas) et la limite supérieure (niveau haut)) des facteurs (concentrations) étudiés : Cd^{2+} (0-10 % CL_{50}-72h), Zn^{2+} (0 -10 % CL_{50}-72h) et Cu^{2+} (0 -10 % CL_{50}-72h).

Les modèles quadratiques développés ont montré la présence de corrélations significatives entre les valeurs expérimentales et prédites. L'ANOVA a également montré des valeurs élevées de coefficients de détermination, assurant ainsi un ajustement satisfaisant du modèle de régression du second ordre avec les données expérimentales.

L'approche de modélisation de la bioaccumulation des métaux traces (Cd, Zn et Cu) et les indices de la bioaccumulation métalliques (IBMI et IPM) dans les moules en particulier *Mytilus galloprovincialis*est très prometteuse pour la surveillance future des sites côtiers, la classification selon le degré de l'accumulation et l'évaluation des risques sanitaires liés aux métaux traces accumulés.

III.3. L'étude de l'effet du cadmium, du zinc et du cuivre sur la moule méditerranéenne«*Mytilusgalloprovincialis* » par l'utilisation des plans d'expérience

III.3.1. Introduction

La zone côtière algérienne, en particulier les zones industrielles et portuaires, reçoit une grande quantité de métaux traces provenant des activités industrielles, des eaux usées urbaines et de l'agriculture [10,43,306-308]. En raison de leur capacité à la fois de persistance et d'accumulation dans les compartiments abiotiques et biotiques des écosystèmes marins, la pollution par les métaux traces pose de graves problèmes dans ces zones (toxicité, mortalité et disparition de nombreuses espèces comme les mollusques bivalves) [27, 274,309-311].

En effet, les métaux traces catalysent la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO), provoquant un stress oxydatif et, par conséquent, ces ERO pouvant attaquer tous les types de constituants cellulaires et engendrer diverses altérations (dégradation protéique, inactivation enzymatique, lipoperoxydation, adduits à l'ADN, etc.) [7,28, 43,90,312,313]. Pour faire face à ces attaques, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydante qui protègent les constituants cellulaires contre les effets toxiques des ERO : (1) défense antioxydants enzymatique (CAT, CE 1.11.1.6, GST, CE 2.5.1.18, SOD, CE 1.15.1.1) et (2) des antioxydants non enzymatiques (les molécules de nature non enzymatique comme le glutathion réduit ou les vitamines) [7,28,90,312,313].

Sur la base des enzymes impliquées dans la défense oxydative et les antioxydants non enzymatiques contre le stress oxydatif, les mollusques bivalves sont largement utilisés dans le bioessai écotoxicologique ou la biosurveillance de la qualité de la zone côtière marine [7,28, 314-316]. En Algérie, *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna*ont étéexploitées dans ce type de travaux [43,217].

Dans les biotests écotoxicologiques classiques, les organismes vivants sont exposés au nombre limité des doses de xénobiotiques (unaire, multiple/mélanges : binaire et ternaire) pendant une durée prédéterminée. De plus, les relations « dose-réponse » et les interactions écotoxicologiques (antagoniste, synergique et non interaction) entre le mélange des métaux

sur les réponses biochimiques ne sont pas définies en continu dans le domaine de variation (entre la limite inférieure (niveau bas) et la limite supérieure (niveau haut) des doses (facteurs)) au cours d'exposition[7; 28, 317; 318-320].

Récemment, l'approche multi-biomarqueurs et l'indice de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR) ont été utilisés soit sur le terrain (*in situ)* ou soit au niveau de laboratoire pour évaluer les effets des différents contaminants sur le statut oxydatif des organismes aquatiques [36,158,305,315,321-324].

Par ailleurs, à notre connaissance, il n'existe aucune étude publiée dans la modélisation en écotoxicologie sur la combinaison entre l'indice de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR) dans les biots marins en particulier les mollusques bivalves et le plan d'expériences (PE) pour le but de modéliser et optimiser les réponses biochimiques aux polluants métalliques.

Dans ce contexte particulier, il semble très important d'utiliser les techniques statistiques et en particulier la méthodologie de surface de réponse (MSR) pour modéliser et optimiser les réponses biochimiques par l'utilisation les organismes sentinelles dans les bioessais écotoxicologiques. Cette originale application permet d'obtenir le maximum d'informations avec le minimum d'expériences. Aussi, elle est souplesse, précise avec sûreté, rapide et à faible coût [176,177].

Dans ce travail, le plan composite centré à faces centrées (CCF) à trois facteurs a été utilisé pour évaluer et prédire (1) les effets toxiques des variables inducteurs de ERO tels que les métaux traces (éléments essentiels : Zn^{2+}, Cu^{2+}, élément non essentiel/xénobiotiques : Cd^{2+}) sur le biomarqueur de dommage oxydatif (niveaux de MDA), les biomarqueurs de défense antioxydante (activités CAT et GST) et (2) la réponse intégrée des biomarqueurs par l'utilisation les indices de biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2) chez *Mytilus galloprovincialis*. Aussi, les interactions toxicologiques (antagonistes, synergiques et sans/zéro interaction) entre les facteurs (métal-métal) ont été également évaluées et optimisées.

III.3.2. Modélisation/Optimisation des réponses biochimiques

L'approche CCF a été adoptée pour l'étude des effets individuels et des interactions écotoxicologiques des variables sélectionnées (X_1, X_2, X_3) sur les réponses étudiées : les biomarqueurs de défense antioxydante (activités CAT et GST), le biomarqueur de dommage oxydatif (MDA) et les indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2). Ces réponses expérimentales en fonction des variables indépendantes sont données dans le tableau III.3.1.

III.3.2.1. Modèles de la CAT, GST, MDA et les indices de la réponse intégrée (IBR_1 et IBR_2)

Les modèles mathématiques de second degré pour chacune des réponses : CAT (Y_1), GST (Y_2), MDA (Y_3), IBR_1(Y_4) et IBR_2(Y_5) sont donnés respectivement par Eq.III.3.1, Eq.III.3.2, Eq. III.3.3, eq.III.3.4 et Eq.III.3.5. Les coefficients linaires, carrés et d'interactions sont déterminés par la méthode des moindres carrés à partir des résultats des bioessais.

$$Y_1 = 19{,}29 + 6{,}17X_1 + 6{,}48X_2 + 4{,}00X_3 + 4{,}29X_1X_2 + 1{,}81X_1X_3 + 2{,}83\,X_2X_3 + 1{,}00\,X^2{}_1 - 0{,}90\,X^2{}_2 + 2{,}23\,X^2{}_3\,. \quad \text{(III.3.1)}$$

Tableau III.3.1. Réponses des biomarqueurs (CAT, GST et MDA) et les indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2).

Essai	Facteurs			Réponses									
	Niveaux codés			Biomarqueurs de stress oxydatifs						Réponse Intégrée des Biomarqueurs			
				Y_1: CAT ($U.mg^{-1}$)		Y_2 : GST ($nmole.min^{-1}.mg^{-1}$)		Y_3: MDA ($nmol.\ mg^{-1}$)		Y_4:IBR_1		Y_5:IBR_2	
	X_1	X_2	X_3	VR^a	VP^b	VR^a	VP^b	VR^a	VP^b	VR^a	VP^b	VR^a	VP^b
1	-1	-1	-1	12,78	13,92	09,82	12,17	11,89	11,66	03,00	03,08	00,00	00,00
2	+1	-1	-1	14,17	14,05	17,81	15,61	14,49	15,31	04,00	03,98	01,96	02,02
3	-1	+1	-1	13,26	12,64	20,27	16,53	16,79	18,32	04,00	04,28	02,43	02,50
4	+1	+1	-1	29,21	29,94	44,59	46,42	16,37	16,22	07,00	07,18	06,02	05,99
5	-1	-1	+1	13,25	12,61	37,92	37,49	12,06	12,60	05,00	04,98	02,66	02,79
6	+1	-1	+1	19,31	20,02	17,54	20,77	30,28	29,14	07,00	06,88	04,89	04,93
7	-1	+1	+1	22,48	22,68	46,93	48,62	29,19	28,76	08,00	08,18	07,04	07,08
8	+1	+1	+1	48,31	47,26	59,30	58,35	38,91	39,53	12,00	12,08	10,42	10,60
9	+1	0	0	14,23	14,12	37,05	37,15	19,27	17,83	06,00	05,47	04,15	03,99
10	-1	0	0	26,77	26,48	45,69	43,74	25,21	25,04	08,00	07,89	07,06	06,81
11	0	-1	0	13,02	11,90	23,34	20,36	14,84	14,83	04,00	04,07	02,29	02,13
12	0	+1	0	24,16	24,88	40,19	41,33	24,95	23,36	08,00	07,27	06,50	06,26
13	0	0	-1	18,68	17,53	15,46	17,19	13,12	11,13	05,00	04,47	02,17	02,16
14	0	0	+1	24,78	25,53	39,39	35,82	22,87	23,26	08,00	07,87	06,29	05,90
15	0	0	0	19,36	19,29	27,34	32,90	17,37	18,14	05,00	06,09	04,14	04,57
16	0	0	0	18,30	19,29	34,98	32,90	16,12	18,14	06,00	06,09	04,23	04,57
17	0	0	0	19,46	19,29	32,72	32,90	17,74	18,14	06,00	06,09	04,55	04,57

Facteurs	Symbole codé	Niveaux		
		-1	0	+1
Concentration nominale de Cd^{2+}	X_1	0	5% CL_{50}-72h (0,13)	10 % CL_{50}-72h (0,26)
Concentration nominale de Zn^{2+}	X_2	0	5% CL_{50}-72h (0,09)	10 % CL_{50}-72h(0,18)
Concentration nominale de Cu^{2+}	X_3	0	5% CL_{50}-72h (0,005)	10 % CL_{50}-72h (0,01)

[a]Valeur réelle, [b]Valeur prédite.

$$Y_2 = 32{,}90 + 3{,}29X_1 + 10{,}48X_2 + 9{,}31X_3 + 6{,}13X_1X_2 - 5{,}04X_1X_3 + 1{,}69\,X_2X_3 + 7{,}54\,X^2{}_1 - 2{,}05\,X^2{}_2 - 6{,}39\,X^2{}_3 . \quad \text{(III.3.2)}$$

$$Y_3 = 18{,}14 + 3{,}60X_1 + 4{,}26X_2 + 6{,}06X_3 - 1{,}44X_1X_2 + 3{,}22X_1X_3 + 2{,}37X_2X_3 + 3{,}29X^2{}_1 + 0{,}95X^2{}_2 - 0{,}94\,X^2{}_3 . \quad \text{(III.3.3)}$$

$$Y_4 = 6{,}09 + 1{,}20X_1 + 1{,}60X_2 + 1{,}70X_3 + 0{,}50X_1X_2 + 0{,}25X_1X_3 + 0{,}50X_2X_3 + 0{,}57\,X^2{}_1 - 0{,}42\,X^2{}_2 + 0{,}077X^2{}_3 . \quad \text{(III.3.4)}$$

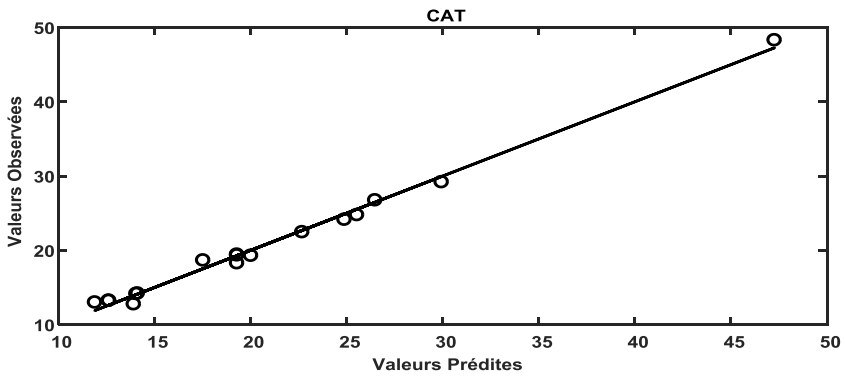
$$Y_5 = 4{,}57 + 1{,}40X_1 + 2{,}06X_2 + 1{,}87X_3 + 0{,}34X_1X_2 + 0{,}07X_1X_3 + 0{,}42X_2X_3 + 0{,}82X^2{}_1 - 0{,}37X^2{}_2 - 0{,}54\,X^2{}_3 . \quad \text{(III.3.5)}$$

III.3.2.2. Évaluation de la qualité des modèles mathématiques

Plusieurs indicateurs sur la qualité des modèles postulés sont utilisés afin d'évaluer leurs résultats et choisir les plus performants pour les prévisions dans le domaine d'étude. Ainsi, pour valider et montrer que les modèles établis pour chacune des réponses expliquent les résultats expérimentaux. Parmi ces outils, il ya l'analyse de la variance (ANOVA), la recherche globale de l'ajustement (R^2 et $R^2_{ajusté}$) du modèle et l'analyse des résidus [176,177].

III.3.2.2.1. Les coefficients de détermination (R^2 et $R^2_{ajusté}$)

À partir des résultats expérimentaux obtenus, les coefficients de déterminations R^2 et $R^2_{ajusté}$ ont été déterminés. Les R^2 de CAT, GST, MDA, IBR_1 et IBR_2 sont respectivement de 99,27, 96,39, 97,88, 96,74 et 99,32 %. Le $R^2_{ajusté}$ pour chaque réponse (CAT, GST, MDA, IBR_1 et IBR_2) est respectivement de 98,32, 91,74, 95,16 ,92,56 et 98,44%. Ces coefficients indiquent ainsi que plus de 95% des variables sont expliquées par le modèle mathématique. Ces résultats indiquent une corrélation hautement significative entre les valeurs observées et prédites (FigureIII.3.1.a et Figures III.3.1.b). Les figures III.3.1.a et figure III.3.1.b montrent une corrélation linaire entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites.



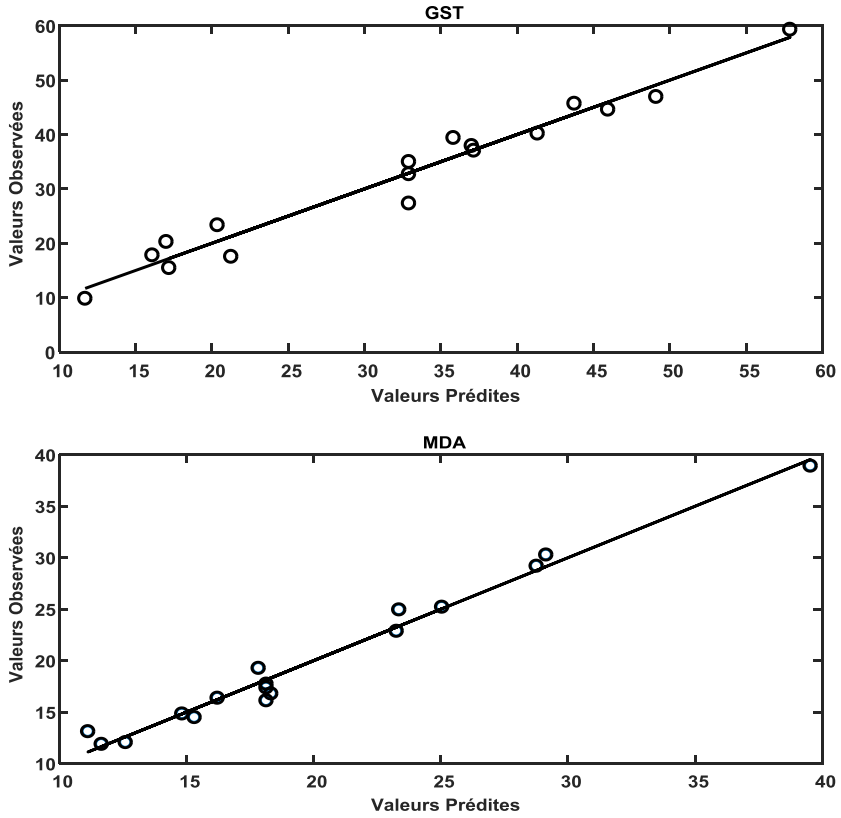


Figure III.3.1.a. Valeurs des réponses observées en fonction des réponses prédites(cas de CAT, GST et MDA).

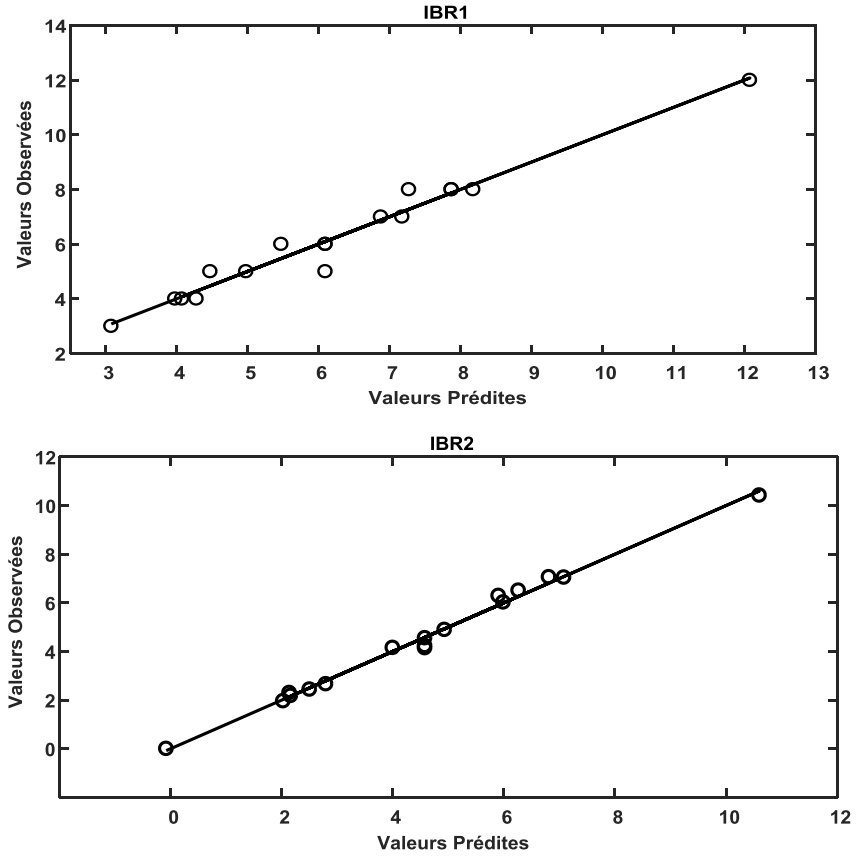
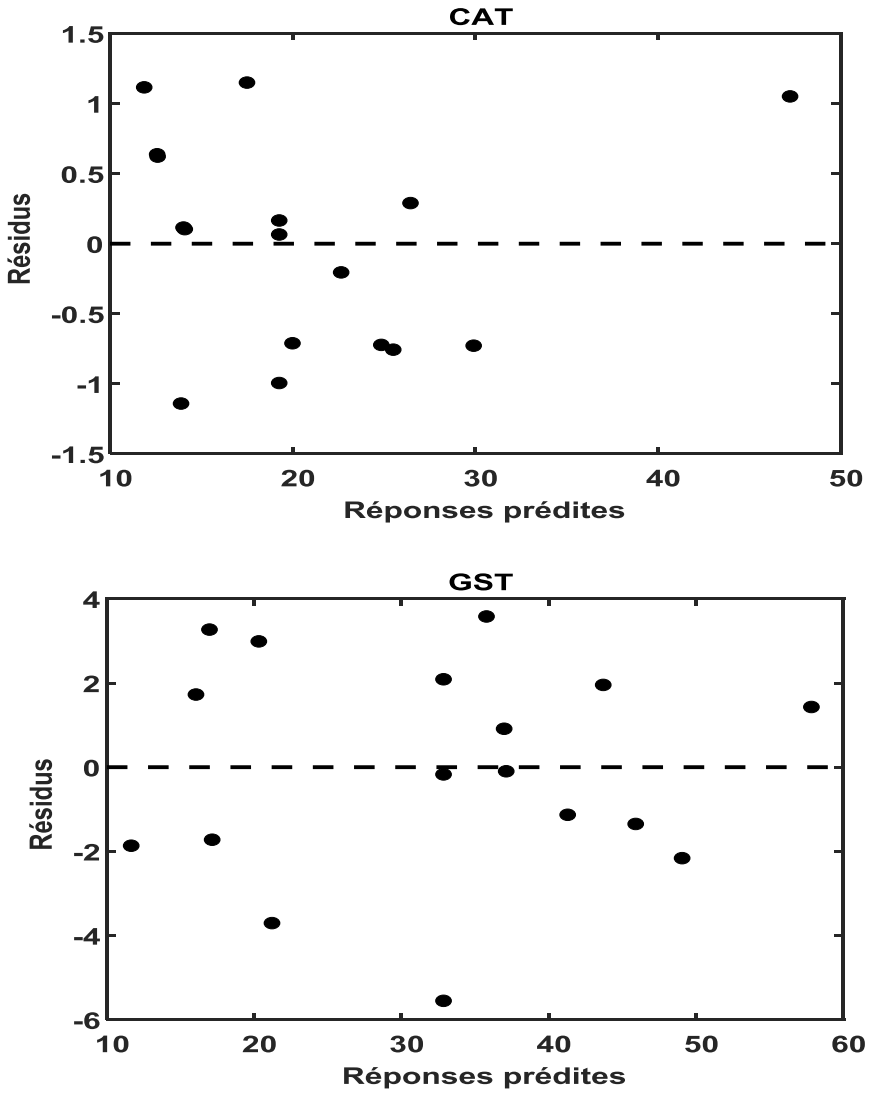


Figure III.3.1.b. Valeurs des réponses observées en fonction des réponses prédites(cas de IBR_1 et IBR_2).

III.3.2.2.2. Analyses des résidus

Les résultats d'analyses des résidus par les graphes qui portent la valeur des résidus en fonction des réponses prédites des biomarqueurs et les indices (IBR_1 et IBR_2) (Figure III.3.2.a et Figure III.3.2.b) montrent que les valeurs des résidus en fonction des réponses prédites sont faibles qui signifient que les valeurs des réponses prédites et mesurées étaient très proches et leur dispersion ne présentent pas une tendance particulière dans la plupart des cas étudiés.

À cet effet, nous pouvons considérer que les résidus sont répartis au hasard. Ceci nousa permis de déduire d'une façon affirmative que les modèles établis expliquent bien les résultats expérimentaux [176,261,263,264].



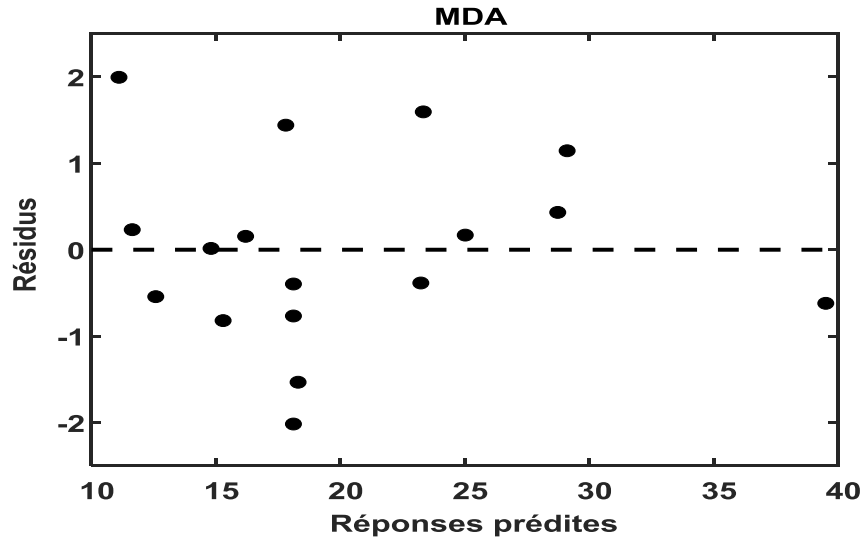


Figure III.3.2.a. Diagramme des résidus pour les biomarqueurs (CAT,GST et MDA).

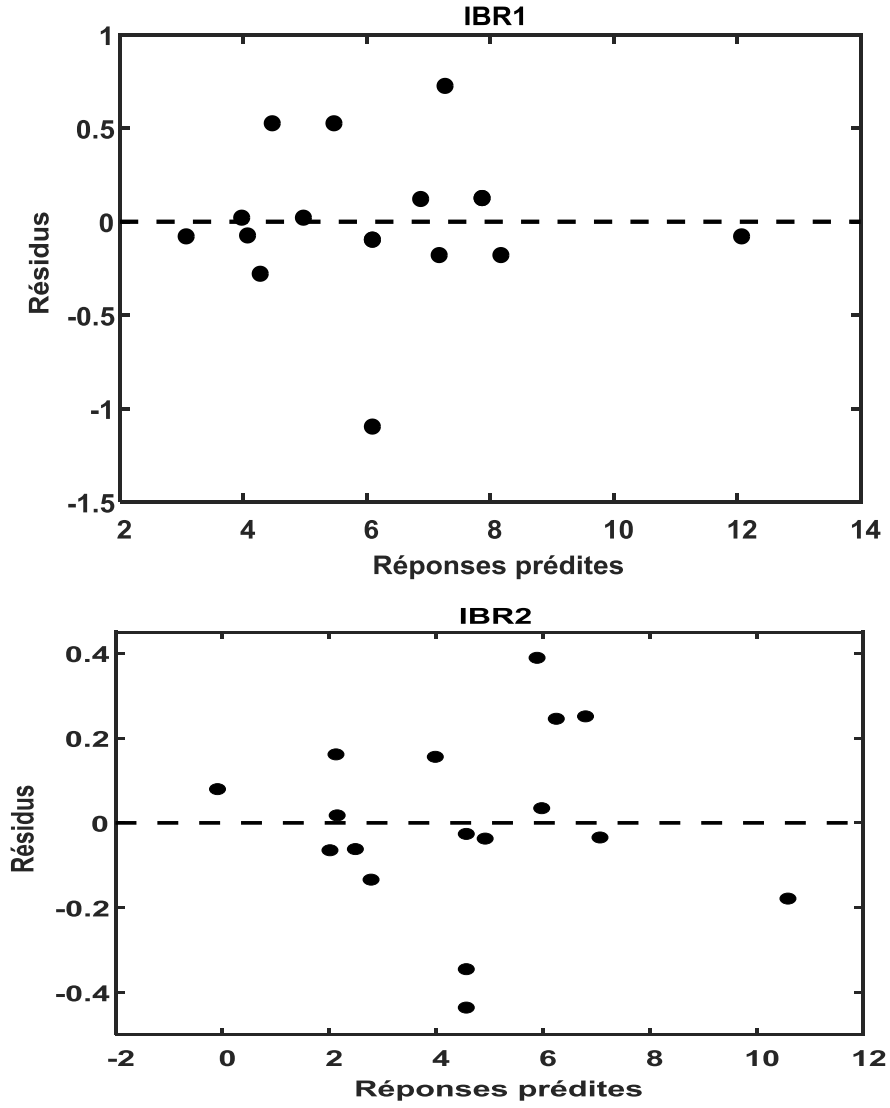


Figure III.3.2.b. Diagramme des résidus pour les indices(IBR_1 et IBR_2).

III.3.2.2.3. Analyse de la variance (ANOVA)

Les résultats d'ANOVA pour les réponses (Y_1 : CAT, Y_2 : GST, Y_3 : MDA, Y_4 : IBR_1 et Y_5 : IBR_2) sont résumés dans les tableaux III.3.2-III.3.6. On remarque pour chaque réponse, CAT, GST, MDA, IBR_1 et IBR_2 que la valeur de F de Fisher (F_{obs} ou F_0) des équations de régression est supérieure au $F_{théorique}$ ($F_{0.05,\ 7,\ 9}$ est égale 3,29), elles sont respectivement de 105,23, 20,75, 35,98,23,12 et112,87. La probabilité (valeur p) associée au F de Fisher est dans les cinq cas inférieurs à 0,05. Ces résultats indiquent que les modèles postulés sont globalement significatifs.

L'analyse des tableauxIII.3.2-III.3.6permet d'observer une valeur de F basse pour les inadéquations de l'ajustement des modèles de biomarqueurs CAT, GST, MDA et les indices de la réponse intégrée des biomarqueurs IBR_1 et IBR_2, elles sont respectivement de 3,99, 0,97, 4,84, 1,11et de 2,64. La valeur de P est supérieure à 0,05, elle est respectivement de 0,21, 0,57, 0,18, 0,53 et de 0,29. Aussi, ces valeurs de F signifiant qu'il y a des probabilités de 21, 57, 18, 53 et 29% pour que les variances d'ajustement soient négligeables devant les variances des erreurs expérimentaux pour les modèles de biomarqueurs CAT, GST, MDA et les indices de la réponse intégrée des biomarqueurs IBR_1 et IBR_2, respectivement. Cette analyse indique que la variance due au manque d'ajustement est non significative montrant que les modèles adoptés pour les biomarqueurs étudiés et les indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2) sont bien ajustés.

Les tableaux III.3.2-III.3.6 représentent l'analyse statistique des coefficients. Nous remarquons dans le cas de CAT que tous les coefficients dans le modèle (Eq. III.3.1) sont significatifs avec une valeur-p inferieurs à 0,05 à l'exception de celui qui correspond au termes Cd×Cd et Zn×Zn.

Dans le cas de GST, tous les coefficients dans le modèle (Eq.III.3.2) sont significatifs avec une valeur-p inférieur à 0.05 à l'exception de celui qui correspond au terme Zn×Zn et Zn×Cu.

Dans le cas de MDA, tous les coefficients dans le modèle (Eq.III.3.3) sont significatifs avec une valeur-p inférieur à 0.05 à l'exception de celui qui correspond au terme Zn×Zn et Cu×Cu.Dans le cas de IBR_1, tous les coefficients dans le modèle (Eq.III.3.4) sont significatifs avec une valeur-p inférieur à 0.05 à l'exception de celui qui correspond au terme Cd×Cd, Zn×Zn, Cu×Cu, Cd×Zn, Cd×Cu et Zn×Cu.Dans le cas de IBR_2, tous les coefficients dans le modèle (Eq.III.3.5) sont significatifs avec une valeur-p inférieur à 0.05 à l'exception de celui qui correspond au terme Zn×Zn et Cd×Cu.

On conclut dans cette partie de la modélisation que les tests statistiques montrent que les modèles établis pour chacune des réponses expliquent bien les résultats expérimentaux. Ces

modèles vont pouvoir être utilisés pour faire des prévisions des réponses dans le domaine d'étude (notre cas d'étude : Activités de la CAT, GST et MDA et leurs indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2)).

Table III.3.2. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse CAT.

Source	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur F	Valeur p
Modèle-CAT	9	1226,46	136,274	105,23	0,00
Linéaires	3	962,86	320,95	247,84	0,00
Cd	1	381,55	381,55	294,63	0,00
Zn	1	421,07	421,07	325,15	0,00
Cu	1	160,24	160,24	123,74	0,00
Carré	3	25,35	8,45	6,52	0,01
Cd×Cd	1	2,73	2,72	2,11	0,19
Zn×Zn	1	2,18	2,17	1,68	0,23
Cu×Cu	1	13,43	13,43	10,37	0,01
Interaction à 2 facteurs	3	238,25	79,41	61,32	0,00
Cd×Zn	1	147,32	147,31	113,76	0,00
Cd×Cu	1	26,46	26,46	20,43	0,00
Zn×Cu	1	64,47	64,46	49,78	0,00
Erreur (Résidus)	7	9,07	1,29		
Inadéquation de l'ajustement	5	8,24	1,64	3,99	0,21
Erreur pure	2	0,83	0,41		
Total	16	1235,53			

Table III.3.3. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse GST.

Source	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur F	Valeur p
Modèle-GST	9	2808,38	312,04	20,75	0,00
Linéaires	3	2075,18	691,73	45,99	0,00
Cd	1	108,50	108,50	7,21	0,03
Zn	1	1099,35	1099,35	73,09	0,00
Cu	1	867,32	867,32	57,66	0,00
Carré	3	205,96	68,65	4,56	0,04
Cd×Cd	1	152,71	152,71	10,15	0,01
Zn×Zn	1	11,32	11,32	0,75	0,41
Cu×Cu	1	109,58	109,58	7,29	0,03
Interaction à 2 facteurs	3	527,24	175,75	11,68	0,00
Cd×Zn	1	301,11	301,11	20,02	0,00
Cd×Cu	1	203,21	203,21	13,51	0,00
Zn×Cu	1	22,92	22,92	1,52	0,25
Erreur (Résidus)	7	105,29	15,04		
Inadéquation de l'ajustement	5	74,48	14,90	0,97	0,57
Erreur pure	2	30,81	15,40		
Total	16	2913,67			

Table III.3.4. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse MDA.

Source	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur F	Valeur p
Modèle-MDA	9	872,84	96,98	35,98	0,00
Linéaires	3	679,77	226,59	84,07	0,00
Cd	1	130,03	130,03	48,24	0,00
Zn	1	181,90	181,90	67,49	0,00
Cu	1	367,84	367,84	136,48	0,00
Carré	3	48,49	16,16	6,00	0,02
Cd×Cd	1	29,14	29,14	10,81	0,01
Zn×Zn	1	2,43	2,43	0,90	0,37
Cu×Cu	1	2,40	2,40	0,89	0,37
Interaction à 2 facteurs	3	144,56	48,18	17,88	0,00
Cd×Zn	1	16,58	16,58	6,15	0,04
Cd×Cu	1	82,94	82,94	30,78	0,00
Zn×Cu	1	45,03	45,03	16,71	0,00
Erreur (Résidus)	7	18,86	2,69		
Inadéquation de l'ajustement	5	17,42	3,48	4,84	0,18
Erreur pure	2	1,44	0,72		
Total	16	891,70			

Table III.3.5. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse IBR_1.

Source	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur F	Valeur p
Modèle-IBR_1	9	74,55	8,28	23,12	0,00
Linéaires	3	68,90	22,96	64,09	0,00
Cd	1	14,40	14,40	40,18	0,00
Zn	1	25,60	25,60	71,44	0,00
Cu	1	28,90	28,90	80,65	0,00
Carré	3	1,15	0,38	1,07	0,42
Cd×Cd	1	0,89	0,89	2,49	0,15
Zn×Zn	1	0,47	0,47	1,33	0,28
Cu×Cu	1	0,01	0,01	0,04	0,83
Interaction à 2 facteurs	3	4,50	1,5	4,19	0,05
Cd×Zn	1	2,00	2,00	5,58	0,05
Cd×Cu	1	0,50	0,50	1,40	0,27
Zn×Cu	1	2,00	2,00	5,58	0,05
Erreur (Résidus)	7	2,50	0,35		
Inadéquation de l'ajustement	5	1,84	0,36	1,11	0,53
Erreur pure	2	0,66	0,33		
Total	16	77,05			

Table III.3.6. Analyse de la variance (ANOVA) pour la réponse IBR_2.

Source	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Valeur F	Valeur p
Modèle-IBR_2	9	101,99	11,33	112,87	0,00
Linéaires	3	97,32	32,43	323,10	0,00
Cd	1	19,77	19,77	196,93	0,00
Zn	1	42,53	42,53	423,64	0,00
Cu	1	35,01	35,01	348,73	0,00
Carré	3	2,26	0,75	7,52	0,01
Cd×Cd	1	1,82	1,82	18,21	0,00
Zn×Zn	1	0,38	0,38	3,80	0,09
Cu×Cu	1	0,79	0,79	7,95	0,02
Interaction à 2 facteurs	3	2,41	0,80	8,00	0,01
Cd×Zn	1	0,95	0,95	9,52	0,01
Cd×Cu	1	0,00	0,00	0,00	0,94
Zn×Cu	1	1,45	1,45	14,47	0,00
Erreur (Résidus)	7	0,70	0,10		
Inadéquation de l'ajustement	5	0,61	0,12	2,64	0,29
Erreur pure	2	0,09	0,04		
Total	16	102,69			

III.3.2.3. Effets des facteurs étudiés sur les réponses biochimiques et IBR

L'effet (ou effet principal) de facteur (x) sur la réponse (y) est défini comme la variation de cette réponse quand ce facteur passe du niveau bas au niveau haut [176,177, 263]. Dans le cas de l'activité de la CAT, une augmentation des facteurs X_1, X_2 et X_3 du niveau bas au niveau haut a entraîné une augmentation de l'activité de la CAT de 12,35 $U.mg^{-1}$ de protéines, 12,97 $U.mg^{-1}$de protéines et 8,00 $U.mg^{-1}$ de protéines,respectivement.

Dans le cas de l'activité GST, une augmentation des facteurs X_1, X_2 et X_3 du niveau bas au niveau haut a entraîné une augmentation de l'activité GST de 6,58 $nmole.min^{-1}$. mg^{-1} de protéine, 20,97 $nmole.min^{-1}$. mg^{-1} de protéine et 18,62 $nmole.min^{-1}$. mg^{-1} de protéine, respectivement.

Dans le cas des niveaux de MDA, une augmentation des facteurs X_1, X_2 et X_3 du niveau bas au niveau haut a entraîné une augmentation de l'activité MDA de 7,21 $nmol.mg^{-1}$ de protéine, 8,53 $nmol.mg^{-1}$ de protéine et 12,13 $nmol.mg^{-1}$ de protéine respectivement.

Dans le cas des niveaux d'IBR_1, une augmentation des facteurs X_1, X_2 et X_3 du niveau bas au niveau haut a entraîné une augmentation de l'IBR_1 de 2,40, 3,20 et 3,40 respectivement.

Dans le cas des niveaux d'IBR_2, une augmentation des facteurs X_1 , X_2 et X_3 du niveau bas au niveau haut a entraîné une augmentation de l'IBR_2 de 2,81, 4,12 et 3,74 respectivement.

Plusieurs métaux et métalloïdes sont essentiels à la vie biologique (p.e. le cuivre (Cu), le cobalt (Co), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le nickel (Ni) et le zinc (Zn)) et leur présence dans le milieu ambiant est essentielle. En effet, le zinc et le cuivre sont indispensables pour des nombreux processus biologiques (métabolisme) des êtres vivants (oligoéléments) ; ils jouent trois rôles : stérique, catalytique et oxydatif/réductif. Contrairement, le cadmium n'a aucun rôle métabolique connu et ne semble pas être biologiquement essentiel (non essentiels) ou bénéfique au métabolisme des êtres vivants en particulier les mollusques bivalves [7,19,28]. Dans le cas de pollution métallique, ces métaux ont des effets divers sur les organismes aquatiques en fonction du métal et de l'organisme considéré. En effet, les données bibliographiques concernant la toxicité létale de ces trois métaux chez les mollusques bivalves montrent que le cuivre exerce une toxicité létale à des concentration relativement faibles par rapport au zinc et le cadmium [82, 233]. Ainsi, les effets délétères se produiraient si les mécanismes de compensation sont débordés ou que les processus de détoxification/compensation entraînent des coûts bioénergétiques secondaires trop élevés, limitant la croissance et la reproduction des organismes. Ces réponses toxicologiques à des niveaux élevés de l'organisation biologique peuvent avoir des conséquences importantes sur la survie des populations au sein des communautés [7].

Les mollusques bivalves sains soumis à des concentrations croissantes de métaux toxiques verra leur état de santé se détériore progressivement [7,43]. En effet, pour des doses de métaux toxiques peu élevées et/ou des temps d'exposition assez courts, l'effet primaire initial du métal sur les fonctions cellulaires induira des mécanismes de détoxication au niveau subcellulaire, (production de métallothionéines, granules/lysosomes) [7,85,86]. Ces mécanismes permettront de compenser l'action des métaux, notamment en limitant leur toxicité. Quand les doses internes et/ou les temps d'exposition augmentent, ces mécanismes de détoxication deviennent insuffisants pour limiter l'action des métaux toxiques. Il y a alors un phénomène de débordement cellulaire et les métaux accumulés dans le cytosol, sous forme dissoute non liée à la métallothionéine et non stockée dans les granules, auront des effets potentiellement toxiques voire mortelles [7,85,86].

L'état de santé des individus exposés évolue alors vers une dégradation irréversible des fonctions physiologiques de l'organisme, ce qui pourrait se traduire par des effets délétères au niveau des individus, puis des populations et des communautés. Parmi ces effets potentiellement toxiques on précise le stress oxydatif [7,28].

La formation incontrôlée d'espèces réactives de l'oxygène aura des conséquences souvent lourdes pour l'organisme. Mais la formation d'espèces réactives n'est pas toujours synonyme

de toxicité. En effet, certaines sont des intermédiaires de processus physiologiques normaux. Ce n'est que lorsque les systèmes de défense sont dépassés et ne suffisent plus à neutraliser la surproduction de ces espèces que la toxicité apparaît. Un stress oxydatif pourra être induit lors de la surproduction d'espèces réactives et/ou par suite de l'inhibition des systèmes antioxydants qui peuvent être inactivés, soit directement, soit par défaut de synthèse. De nombreux contaminants (pesticide, métaux traces…etc.) vont favoriser la formation de ces oxyradicaux, notamment par l'intermédiaire des composés à potentiel redox [7,28,285-287].

Des études récentes ont permis d'établir un lien entre l'exposition à certains métaux traces (Cd, Zn, Cu et autres) et l'induction de stress oxydatif dans différents tissus de mollusques bivalves [225]. Chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, les travaux deVlachogianni et al. [326], ont permis de mettre en évidence une induction des systèmes antioxydants suite à une exposition aiguë au métaux traces. Aussi, une hausse des concentrations de MDA chez les mollusques bivalves après une exposition au métaux traces au laboratoire ou lors d'expériences de transplantation et l'altération des systèmes à action antioxydante (CAT, SOD et GST) a déjà été rapportée par plusieurs auteurs [7,28,165,166].

Dans notre étude, l'exposition aiguë (72h) aux métaux traces (Cd, Zn et Cu) a démontré une induction des systèmes à action antioxydante (CAT et GST) ainsi qu'une activation de la peroxydation des lipides (MDA) comme l'illustre le tableau III.3.1. Ces résultats permettent de penser que les effets des métaux traces sont médiés par l'induction d'un stress oxydatif (induction des enzymes antioxydants). Les espèces réactives, une fois formées, auront tendance à attaquer les lipides polyinsaturés des membranes biologiques en leur arrachant un hydrogène, menant à une peroxydation lipidique et à une fragilisation des membranes cellulaires (dommage oxydative) [7,28]. Errahmani et al.[327]ontobservé que les concentrations en MDA augmentent significativement avec l'augmentation de l'activité de la catalase dans les branchies de *M. galloprovincialis* et *Perna perna*dès le troisièmejour d'exposition au cuivre (Cu) dans des conditions de laboratoire.

Par ailleurs, le degré d'induction des biomarqueurs peut se classer par ordre croissante ou décroissante. Boudjema et al. [43] ont rapporté que l'exposition aigüe des moules (*Perna perna*) aux métaux traces (Cu, Cd et Pb) a révélé une corrélation positive entre l'activité CAT et le gradient de contamination du milieu en métaux. Aussi, le classement du degré d'induction de l'activité CAT peut être illustrée comme suit : CAT (Cu^{2+}) > CAT (Cd^{2+}) > CAT (Pb^{2+}).

Globalement, les travaux de Viarengo et al. [166] montrent que l'exposition aux métaux traces (Cu, Cd et Zn) a entraîné des augmentations importantes des teneurs en MDA dans les

branchies et la glande digestive chez la moule *Mytilus galloprovincialis*. Aussi, Goswami et al. [328] ont révélé une augmentation significative de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), de la glutathion S-transférase (GST) et de la glutathion peroxydase (GPx) chez *Perna viridis* après 21 jours d'exposition au cuivre et au cadmium. Aussi, le classement du degré d'induction de l'activité GST est illustrée comme suit : GST (Cu^{2+}) > GST (Cd^{2+})[328]. De même, Belabed et Soltani [329] ont rapporté une augmentation significative de l'activité GST dans la glande digestive de *Donax trunculus* après 72h d'exposition au Cd dans un test de toxicité aiguë. Aussi, Belhaouari et al. [330] ont rapporté que la contamination par les sulfates métalliques ($CdSO_4$, $ZnSO_4$ et $CuSO_4$) n'a pas causé une augmentation significative de l'activité glutathion-Stransférase du gastéropode marin : *Osilinus turbinatus* pendant96h d'exposition. En revanche, l'activité de la catalase a légèrement augmenté parmi les échantillons contaminés par ces polluants.

Sur la base des effets principaux des facteurs étudiés issus de l'application des plans d'expérience, le degré d'induction de trois biomarqueurs est classé selon l'ordre suivant : (1) : CAT (Zn^{2+}) > CAT (Cd^{2+}) > CAT (Cu^{2+}) ; (2) : GST (Zn^{2+}) > GST (Cu^{2+}) > GST (Cd^{2+}) et (3) MDA (Cu^{2+}) > MDA (Zn^{2+}) > MDA (Cd^{2+}). Aussi, le degré d'induction des IBR est classé selon l'ordre suivant : (1) IBR_1 (Cu^{2+}) > IBR_1 (Zn^{2+}) > IBR_1 (Cd^{2+}), (2) IBR_2 (Zn^{2+}) > IBR_2 (Cu^{2+}) > IBR_2 (Cd^{2+}).

III.3.2.4. Optimisation du processus biologique et identification des interactions métal-métal

Les surfaces de réponses (3D), isoréponses (2D) des biomarqueurs (CAT, GST et MDA) et les indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2) et les diagrammes d'interactions métal-métal ont été générés à partir des modèles de régression pour décrire : (1) les types des interactions toxicologiques entre deux variables indépendantes sur les réponses des biomarqueurs et l'indice de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2) et (2) les paramètres optimaux du processus biologique.

Aujourd'hui, la méthodologie de la surface de réponse (RSM) est l'une des plus importantes méthodes générales utilisées dans l'analyse des effets combinés produits par des mélanges de métaux traces [262,279]. En outre, l'interaction toxicologique se produit lorsque l'effet d'une variable indépendante (X_1, X_2 et X_3) change en fonction du niveau d'une autre variable indépendante [176,177, 280-282].

En plus, dans les graphiques des effets d'interaction (Figs III.3-3-7), les lignes non parallèles sont des indicateurs de l'existence d'interaction entre deux facteurs (synergiques ou antagonistes) et les lignes parallèles (ou presque parallèles) indiquent l'absence (zéro)

d'interactions entre les facteurs [238]. Une interaction est décrite comme synergique lorsquel'exposition à une variable indépendante provoque une augmentation significative de l'effet d'une autre variable. Au contraire, une interaction est décrite comme antagoniste lorsque l'exposition à une variable indépendante entraîne une réduction de l'effet d'une autre variable [176,177,280,284].

Dans le cas de l'activité CAT, la Figure III.3.3(a, b, c) montre des interactions synergiques entre $X_1 \times X_2$, $X_1 \times X_3$ et $X_2 \times X_3$. Les activités de la CAT sont maximales (en U. mg^{-1} de protéine) lorsque les concentrations de Cd×Zn, Cd×Cu et Zn×Cu dans le milieu expérimental sont aux niveaux hauts.

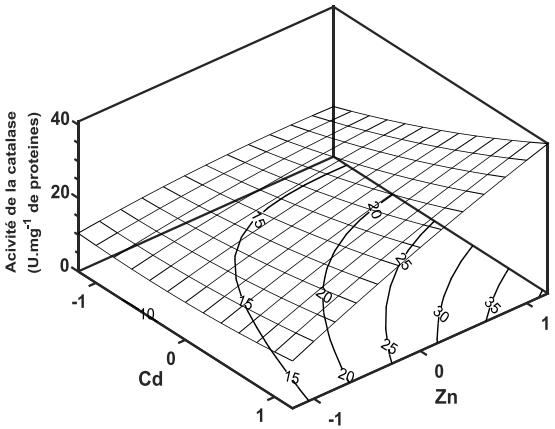
Dans le cas de l'activité GST, lesFiguresIII.3.4 (d, e) montrentune interaction synergique entre $X_1 \times X_2$ et antagoniste entre $X_1 \times X_3$. Les activités de la GST sont maximales (en $nmole.min^{-1}.mg^{-1}$ de protéine) : (1) lorsque les concentrations de Cd et Zn dans le milieu expérimental sont aux niveaux hauts et (2)lorsque la concentration de Cd dans le milieu expérimental est au niveau bas et la concentration de Cu est au niveau haut. De plus, la Figure. III.3.4-f montre une absence d'interaction entre X_2 et X_3 sur l'activité GST.

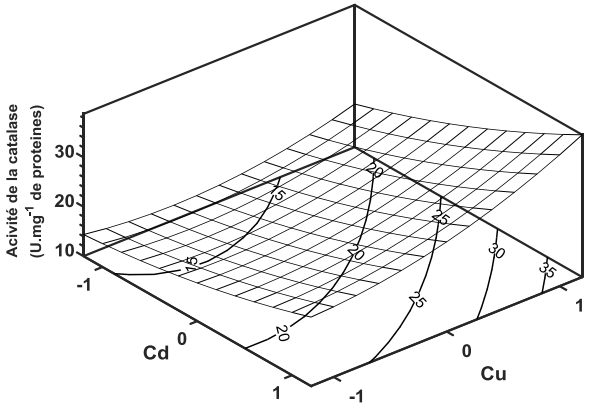
Dans le cas de MDA, les Figure.III.3.5-g, Figure.3.5-h et Figure. III.3.5-k montrent une interaction antagoniste entre X_1 et X_2 et une interaction synergique entre X_1 et X_3, X_2 et X_3. Les concentrations en MDA (en $nmol.mg^{-1}$ protéines) est maximaleslorsque les concentrations du Cd×Zn, Cd×Cu et Zn× Cu sont aux niveaux hauts.

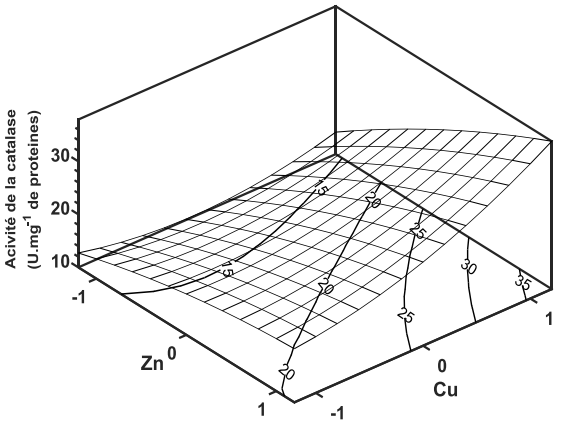
Dans le cas de l'IBR_1, la Figure III.3.6 (l, m, n) ont montré aucun effet d'interaction entre les facteurs combinés ($X_1 \times X_2$), ($X_1 \times X_3$) et ($X_2 \times X_3$).

Dans le cas de IBR_2, les Figure.III.3.7-o et Figure.III.3.7-q montrent des interactions synergiques entre X_1 et X_2 et X_2et X_3. L'IBR_2 est maximale : (1) lorsque la concentration du Cd et du Zn dans le milieu expérimental est au niveau haut et (2) lorsque la concentration duZnet du Cu dans le milieu expérimental est au niveau haut. La Figure.3.7-p a montré aucun effet d'interaction entre X_1 et X_3.

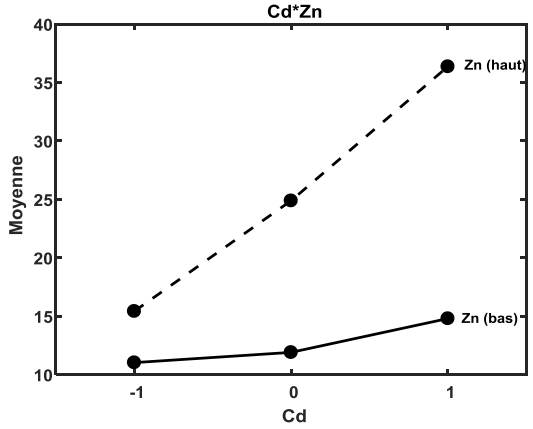
Les surfaces de réponses (3D) des réponses biochimiques (CAT, GST et MDA) et les indices intégrés de réponse des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2) ont montré des zones optimales, ce qui suggère que les conditions optimales pour le maximum des réponses maximales de CAT, GST, MDA et les IBR sont à l'intérieur dans les zones d'études (Figure. III.3.3, Figure.III.3.4, Figure. III.3.5, Figure.III.3.6 et Figure. III.3.7).

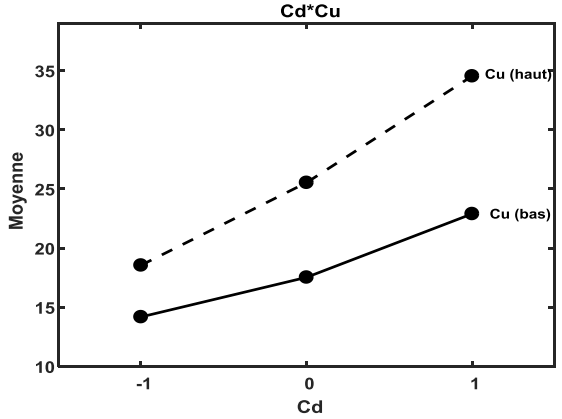

Acivité de la catalase
(U.mg-1 de proteines)
40
20
0
-1
0
1
Cd
-1
0
1
Zn
15
20
25
30
35


Acivité de la catalase
(U.mg-1 de proteines)
30
20
10
-1
0
1
Cd
-1
0
1
Cu
15
20
25
30
35


Acivité de la catalase
(U.mg-1 de proteines)
30
20
10
-1
0
1
Zn
-1
0
1
Cu
15
20
25
30
35

(a) **(b)** **(c)**


Cd*Zn
Moyenne
40
35
30
25
20
15
10
-1
0
1
Cd
Zn (haut)
Zn (bas)


Cd*Cu
Moyenne
35
30
25
20
15
10
-1
0
1
Cd
Cu (haut)
Cu (bas)

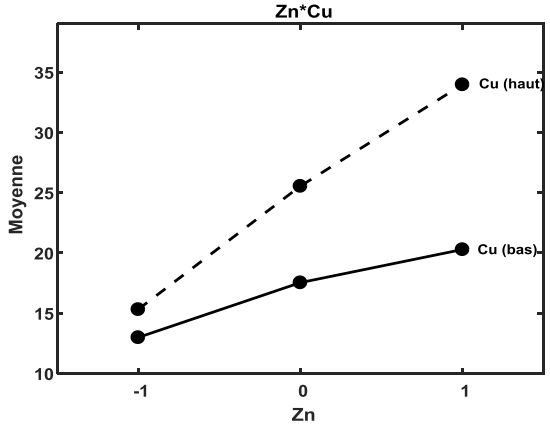
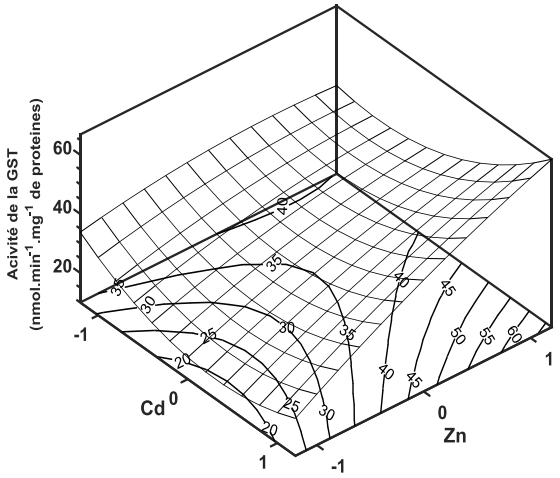
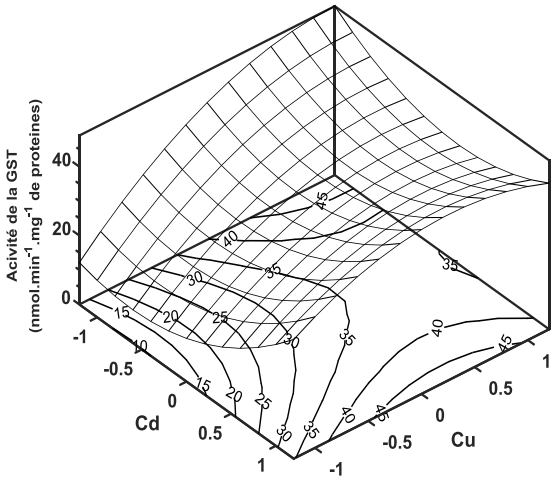
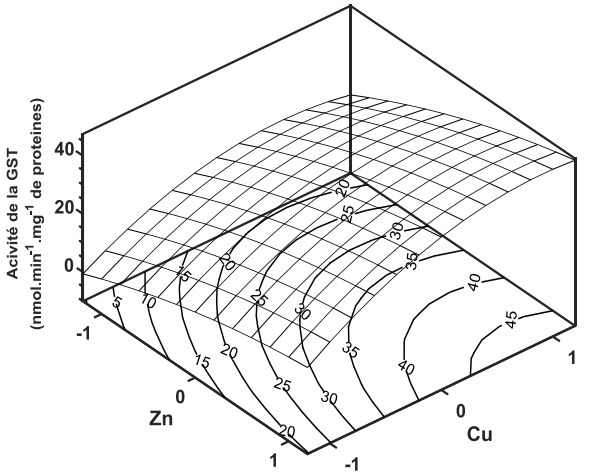

Zn*Cu
Moyenne
35
30
25
20
15
10
-1
0
1
Zn
Cu (haut)
Cu (bas)

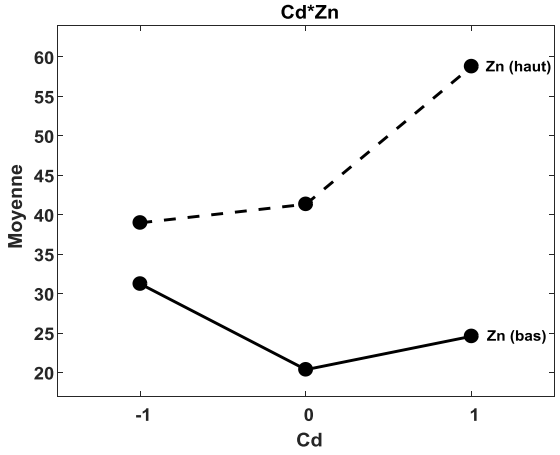
Figure III.3.3. Effet de Cd, Zn et Cu sur l'activité CAT (U.mg^{-1} de protéine) ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (a) Cd-Zn, (b) Cd-Cu (c) Zn-Cu.



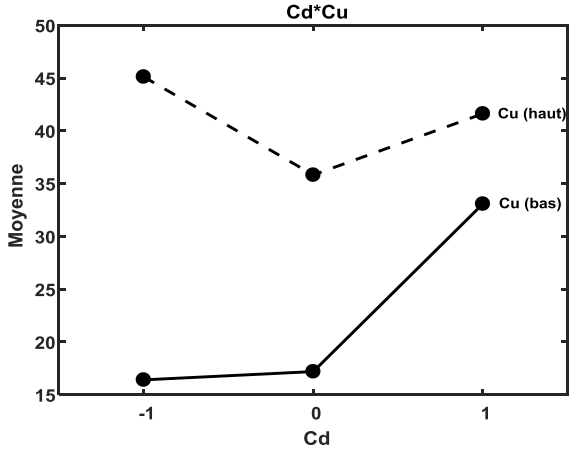




(d)



(e)



(f)

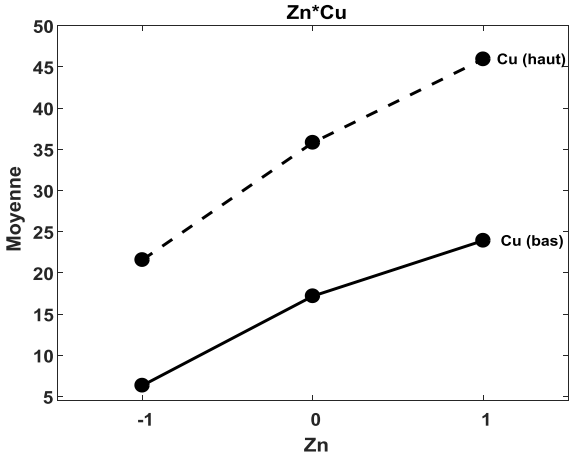


Figure III.3.4. Effet de Cd, Zn et Cu sur l'activité GST (nmole.min^{-1}.mg^{-1}de protéine) ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (d) Cd-Zn, (e) Cd-Cu (f) Zn-Cu.

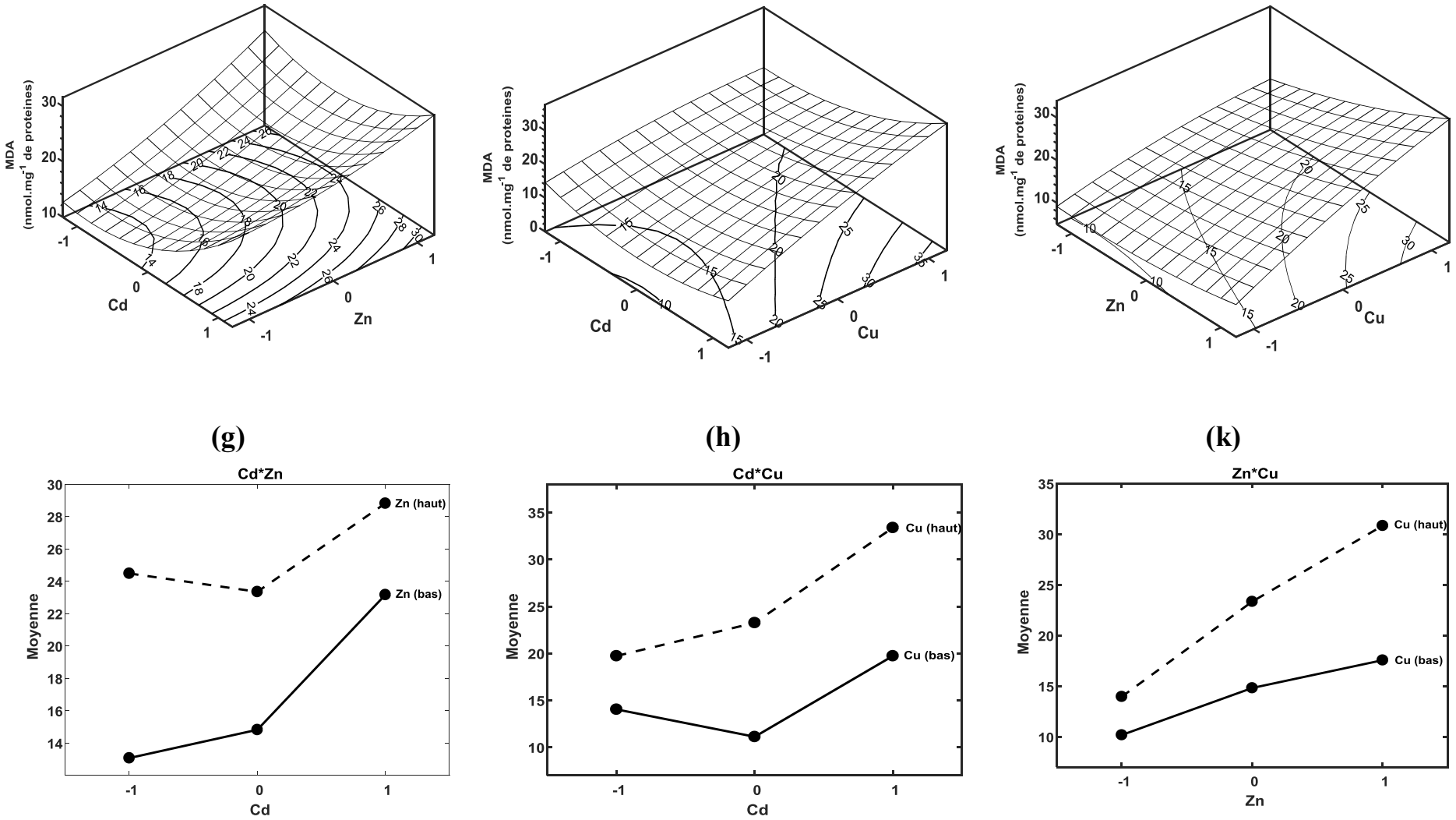


Figure III.3.5. Effet de Cd, Zn et Cu sur MDA (nmole.mg^{-1}de protéine) ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (g) Cd-Zn, (h) Cd-Cu (k) Zn-Cu.

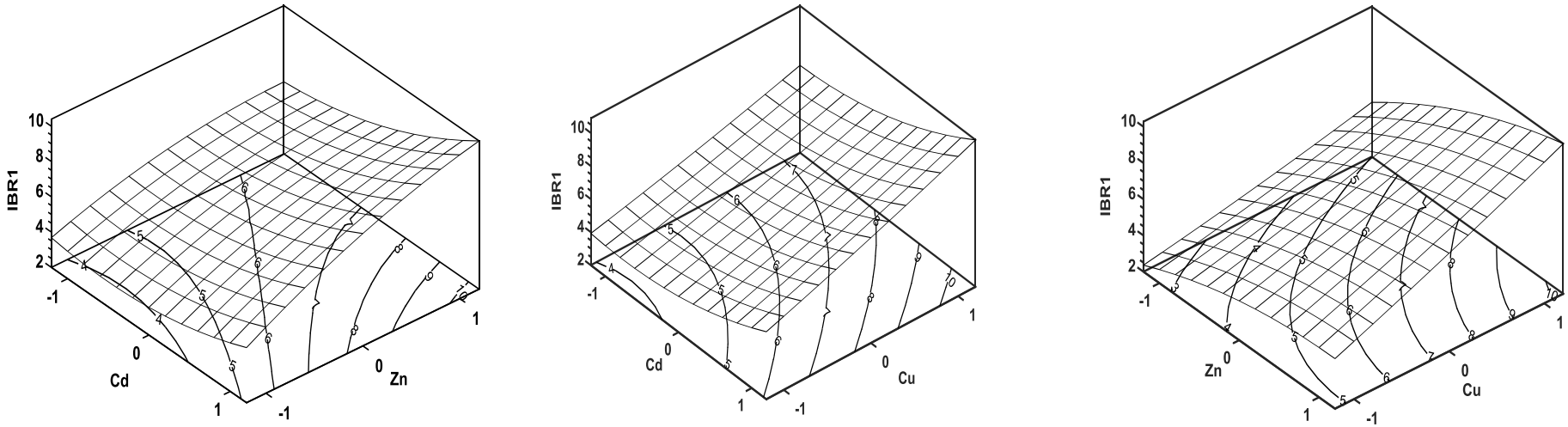


Figure III.3.6. Effet de Cd, Zn et Cu sur l'IBR_1 ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (l) Cd-Zn, (m) Cd-Cu (n) Zn-Cu.

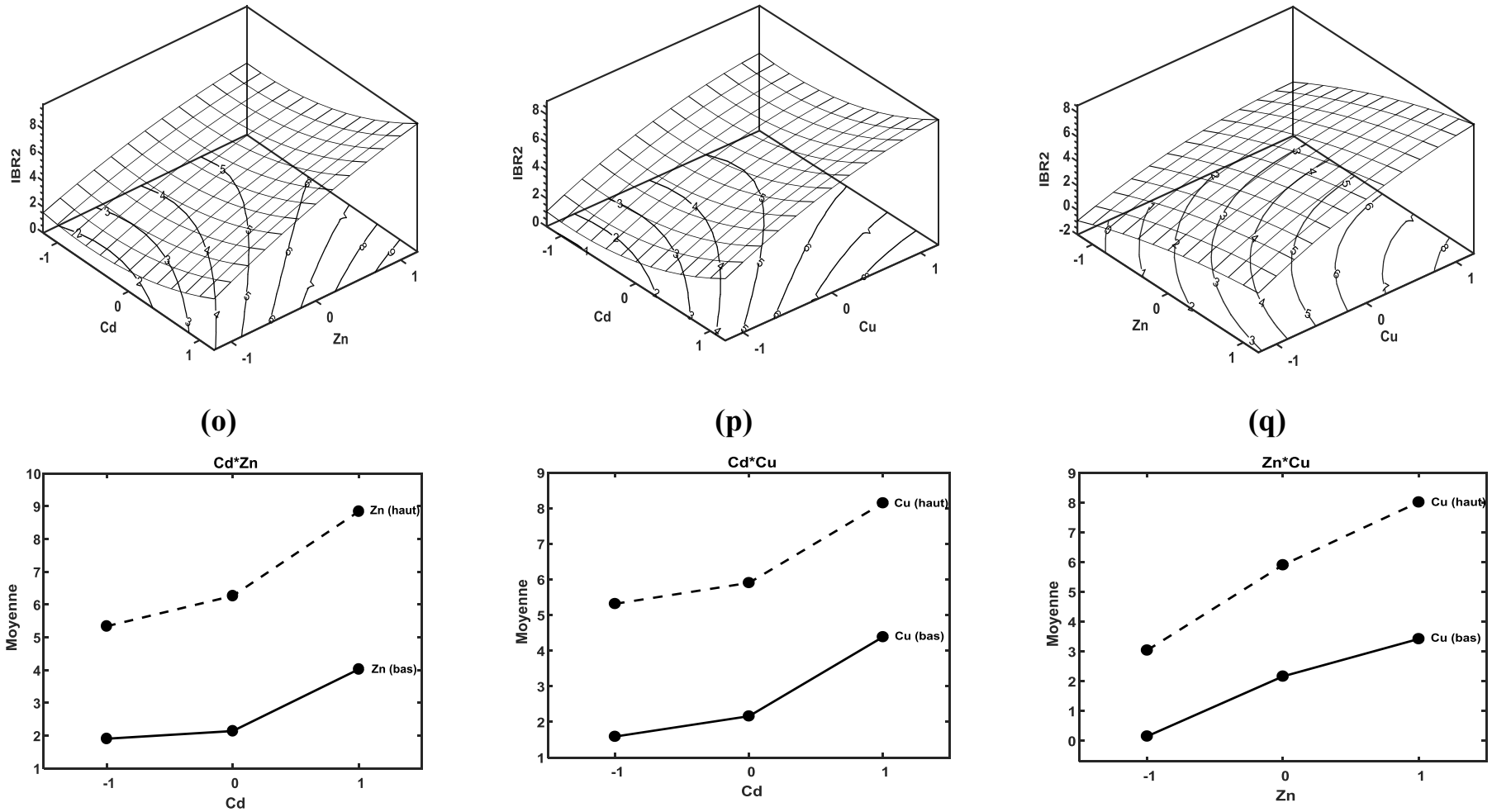


Figure III.3.7. Effet de Cd, Zn et Cu sur l'IBR_2 ; graphiques de surface 3D associés à des courbes de contour 2D et des diagrammes d'interaction : (o) Cd-Zn, (p) Cd-Cu (q) Zn-Cu.

Dans ce travail, nous avons utilisé la méthode de désirabilité pour optimiser les paramètres des réponses biochimiques (CAT, GST et MDA) et les indices intégrés de réponse des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2). Le logiciel Minitab Trial version 20 (Minitab Inc., State College, PA, USA) nous a permis d'estimer les valeurs prédites par la valeur de désirabilité (d) composite (globale) du système multi-réponse variant de 0 à 1 avec des valeurs parfaitement acceptables (excellent) lorsque D = 1, des valeurs acceptables (désirées) lorsque D > 0,6 et zéro (0) indique qu'une ou plusieurs réponses se situent en dehors des limites acceptables [176,177,285,286].

En effet, la désirabilité individuelle et la désirabilité composite déterminent dans quelle mesure une combinaison de variables satisfait aux objectifs définis pour les réponses (maximum, minimum, recherchée). La désirabilité individuelle (d) évalue dans quelle mesure les facteurs optimisent une réponse unique (p.e. IBR), tandis que la désirabilité composite (D) évalue dans quelle mesure les facteurs optimisent un ensemble de réponses (multi-réponse) d'une manière globale (p.e. CAT, GST et MDA) [176,177,284-286].

Dans notre cas, le but était d'évaluer l'effet des facteurs (Cd, Zn et Cu) sur la batterie des biomarqueurs du stress oxydatif et la réponse des IBR (IBR_1 et IBR_2) et de savoir le maximum des réponses biochimiques (CAT, GST et MDA) et les indices intégrés de réponse des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2) afin de lier l'état de pollution par rapport l'induction maximale. Les résultats de l'optimisation sont présentés dans les tableaux III.3.7 et III.3.8.

Les conditions optimales des réponses biochimiques (CAT, GST et MDA) déterminées sont les suivantes : une concentration de Cd de 0,26 $mg.L^{-1}$, une concentration de Zn de 0,18 $mg.\ L^{-1}$et une concentration de Cu de 0,01 $mg.\ L^{-1}$, les réponses prévues pour la combinaison optimale sont : Y_1 (CAT)= 47,26 $U.mg^{-1}$ de protéine, Y_2 (GST)= 57,88 $nmole.min^{-1}.mg^{-1}$ de protéineet Y_3 (MDA)=39,53 $nmole.mg^{-1}$ de protéineavec une désirabilité composite très acceptable (0,98) [285] (Tableau III.3.7).

Tableau III.3.7. Valeurs optimales des biomarqueurs (CAT, GST et MDA).

Valeurs optimales d'exposition aux métaux	Cd ($mg.L^{-1}$)	Zn ($mg.L^{-1}$)	Cu ($mg.L^{-1}$)
	0,26	0,18	0,01
Valeurs optimales des biomarqueurs	CAT ($U.mg^{-1}$)	GST ($nmole.min^{-1}.mg^{-1}$)	MDA ($nmole.mg^{-1}$)
	47,26	57,88	39,53
Désirabilité composite		0,98	

Pour l'IBR_1, les conditions optimales sont les suivantes une concentration de Cd de 0,26 mg. L^{-1}, une concentration de Zn de 0,18 mg. L^{-1}et une concentration de Cu de 0,01 mg. L^{-1}. La réponse IBR_1 optimale pour la combinaison optimale est de 12,08avec une désirabilité composite(1) très acceptable (Tableau III.3.8).

Pour l'IBR_2, les conditions optimales déterminées sont les suivantes une concentration de Cd de 0,26 mg. L^{-1}, une concentration de Zn de 0,18 mg. L^{-1}et une concentration de Cu de 0,01mg.L^{-1}. La réponse d'IBR_2 optimale pour la combinaison optimale est de 10,60avec une désirabilité individuelle (1) très acceptable (Tableau III.3.8).

Tableau III.3.8. Valeurs optimales des indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2)

	Indices de la réponse intégrée des biomarqueurs					
	IBR_1			IBR_2		
	Exposition aux métaux (mg.L^{-1})					
	Cd	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu
	0,26	0,18	0,01	0,26	0,18	0,01
Valeurs optimales	12,08			10,60		
Désirabilité composite	1			1		

Les organismes vivants dans les écosystèmes aquatiques sont fréquemment exposés à des mélanges de métaux traces [331 ,332]. La présence simultanée de divers métaux traces dans le milieu aquatique peut avoir des interactions synergiques, antagonistes ou sans interactions sur la prise en charge, la bioaccumulation et sur le statut oxydatif des moules [7,28, 43,78,83]. En outre, les différents métaux traces présents dans le mélange peuvent avoir un effet synergique, ce qui entraîne des effets toxiques nettement plus prononcés et plus diversifiés que lors d'une exposition individuelle [251,333].Peu de travaux ont signalé les interactions entre métaux. Goswami et al. [328] ont rapporté que l'effet synergique du mélange binaire (Cd-Cu) sur les enzymes antioxydantes: superoxyde dismutase (SOD), glutathion S-transférase (GST) et activité de la glutathion peroxydase (GPx) chez la moule verte (*Perna viridis*) pendant 21 jours d'exposition. Aussi, Boudjema et al. [43] ont rapporté que l'effet synergique du mélange ternaire (Cd-Cu-Pb) sur l'activité CAT chez la moule brune (*Perna perna*) pendant trois jours d'exposition. Par ailleurs, St. Dimitrova et al. [334] ont rapporté l'effet synergique du zinc et du plomb sur les enzymes antioxydantes : le superoxyde dismutase et la catalase chez la carpe (*Cyprinus carpio*) pendant 1 jour d'exposition.

Les résultats de cette étude, démontrent l'effet synergique, antagoniste et nul de l'interaction métal-métal sur les enzymes antioxydantes, la peroxydation lipidique et les IBR

chez les moules *Mytilus galloprovincialis*. Giguère et al. [86] ont signalé qu'il existe des relations de type exposition → bioaccumulation → Effets (p.e. stress oxydatif) chez des bivalves exposés au Cd dans leur milieu naturel ou dans les biotests de laboratoire. Aussi, ils déclarent que, à de faibles concentrations d'exposition chronique, la présence de Cd dans les fractions de faible poids moléculaire et de poids moléculaire élevé, indique que la détoxification du métal était incomplète chez *P. garandis* qui a été soumise à un stress lié au Cd.

Dans ce travail, l'interaction toxicologique entre les métaux traces sur les réponses biochimiques et les IBR peut être interprétée par les effets de compétition entre les métaux aux différentes phases : la prise en charge, l'accumulation et l'interaction anormale avec une biomolécule essentielle [7,78].

En effet, selon Mohan et al. [335], deux métaux ont une forte affinité pour les sites de liaison des protéines, ce qui pourrait expliquer leur toxicité accrue lorsqu'ils sont présents ensemble dans l'environnement. En outre, la compétition entre des ions chimiquement similaires pour les sites de liaison peut affecter de manière significative la bioaccumulation des ions par les moules.

Les résultats de Benayoun et Fowler [303] montrent que le Zn n'influence pas sur l'absorption du Cd par *Mytilus galloprovincialis*. Au contraire, Hemelraad et al. [302] ont trouvé que le Zn inhibe l'absorption du Cd (interaction antagoniste Zn-Cd) dans les branchies des moules d'eau douce et accélère la redistribution du Cd des branchies vers les organes internes. En outre, la présence de Cu peut diminuer l'absorption de Cd. Hemelraad et al. [302] ont démontré qu'il y a une interaction antagoniste Zn-Cd. En effet, le Zn inhibe l'absorption du Cd dans les branchies et accélère la redistribution du Cd des branchies vers les organes internes des moules. Ils ont émis l'hypothèse que le Zn entre en compétition avec le Cd pour les sites de liaison dans les branchies. En outre, Stewart [304] a rapporté qu'un effet antagoniste des métaux traces (Ni, Cu, Pb et Cu) sur l'accumulation de Cd dans la moule d'eau douce *Pyganodon grandis.*

En outre, les valeurs de l'indice de réponse intégrée des biomarqueurs (IBR) dans les moules telles que *Mytilus galloprovincialis* sont utilisées pour évaluer la variation temporelle de la qualité environnementale dans les systèmes aquatiques [305,325]. Ces indices qui distinguent les écosystèmes temporairement pollués des écosystèmes non pollués, sur la base des réponses des biomarqueurs [305,322]. L'indice des biomarqueurs, un outil facile à utiliser pour trouver

le degré global de (1) l'effet de la pollution sur les organismes dans le milieu naturelle [305,322] et (2) l'effet des produits chimiques sur des organismes en laboratoire [336].

À cet effet, les modèles choisis permettent d'identifier les types d'interactions « synergique – antagonistes – sans effet » sur les réponses des biomarqueurs étudiés et leurs indices. Ils permettent également d'extraire cette information d'une façon simple et visuelle sans aller aux calculs numériques et d'interpréter les résultats obtenus.

Dans notre cas d'étude, la relation entre les réponses du stress oxydatif des moules et le niveau d'exposition aux mélanges métalliques a été mise en évidence par les indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2). L'analyse de cluster de l'IBR_1 et de l'IBR_2 (basée sur trois biomarqueurs) (Tableau III.3.9) a été réalisée avec le logiciel IBM SPSS Statistics 25 (2018, version d'essai) et présentée dans la figure III.3.8 en bars superposés et en forme géométrique « radars » (Figure III.3.9). Ces représentations facilitent la comparaison intergroupe (Essais:1-17) des IBR et leurs réponses biomarqueurs.

Les résultats montrent que les valeurs IBR_1 dans les tissus de moules se situaient entre 3 et 12, ce qui a montré une large gamme de variations (Tableau III.3.1 et la Figure III.3.8). Des valeurs élevées d'IBR_1 ont été enregistrées dans les tissus de moules dans l'essai 8 (X_1= +1, X_2=+1, X_3= +1 qui correspondent à Cd = 0,26 mg. L^{-1}, Zn = 0,18mg. L^{-1}, Cu = 0.01 mg. L^{-1}) indiquant une réponse intégrée des biomarqueurs plus élevée, tandis que des faibles valeurs ont été trouvées dans les tissus de moules témoins (contrôles, non exposées) indiquant des faibles valeurs de la réponse intégrée des biomarqueurs (Tableau III. 3.1, Figure III.3.8).

Les valeurs d'IBR_2 des tissus de moules variaient de 0 à 10,42 ce qui montre une large gamme de variations (Tableau III. 3.1, Figure III.3.9). La valeur la plus faible d'IBR_2 a été trouvée dans les moules témoins (contrôles, non exposées) comme niveau de base (X_1=X_2=X_3=-1 qui correspond à Cd = Zn = Cu = 0 mg. L^{-1}, Tableau III.3.1, Figure III.3.9) indiquant une valeur de la réponse intégrée des biomarqueurs plus faible. L'IBR_2 le plus élevé a été trouvé dans les moules exposées à des mélanges ternaires de métaux de Cd = 0,26 mg. L^{-1}, Zn = 0,18 mg. L^{-1} et Cu = 0,01 mg.L^{-1} qui correspondent à (X_1=X_2=X_3= +1), indiquant une valeur de la réponse intégrée des biomarqueurs plus élevée dans les tissus des moules *Mytilus galloprovincialis* (Tableau III.3.1, Figure III.3.9).

Les résultats de ce travail montrent que les deux indices (IBR_1 et IBR_2) peuvent différencier les milieux pollués des milieux non pollués (Essai 1-Essai 17, Tableau III.3.1, Figure III.3.8 et Figure III.3.9).

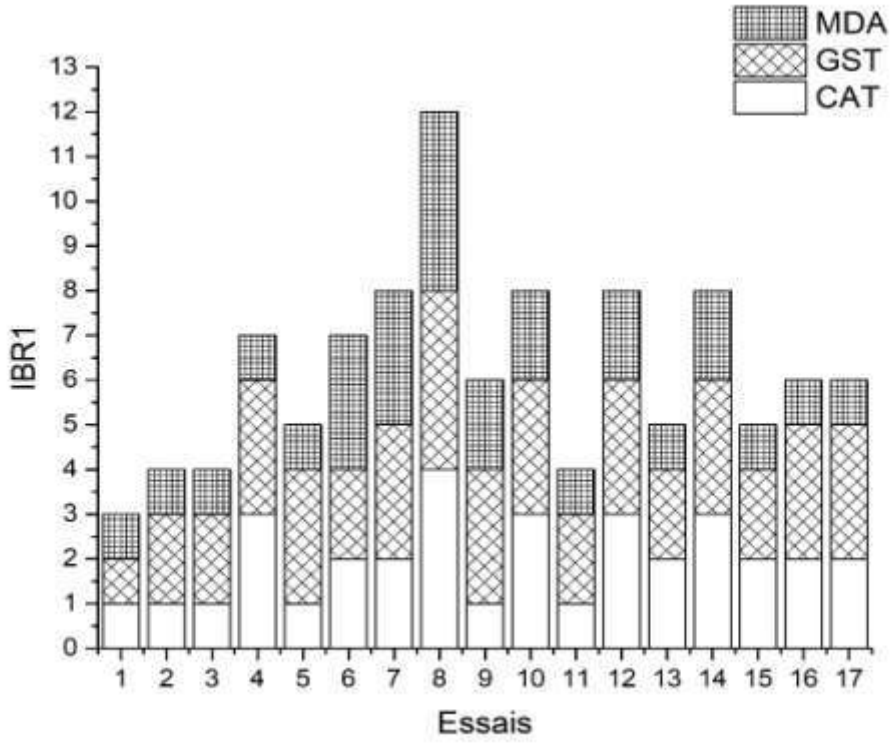
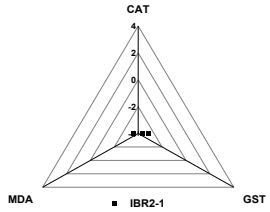


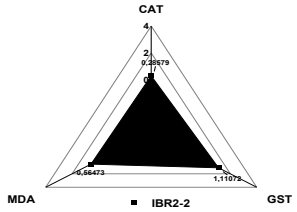
Figure III.3.8. Réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1).

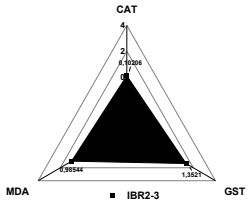
Ces indices IBR peuvent être utilisés comme un outil utilisable pour l'évaluation des risques pour identifier les différentes réponses (effets) de l'exposition à des mélanges de métaux traces à des concentrations sublétales dans les conditions de laboratoire chez *Mytilus galloprovincialis.* Chaque niveau de réponse (effet) correspondant à un code couleur : (1) faible réponse (vert), (2) réponse modérée (jaune), (3) réponse élevée (orange), (4) réponsetrès élevée (rouge). Par exemple, si les niveaux des IBR entre 5 et 6et 1,96 et 4,55 pour la IBR_1 et IBR_2 respectivement, le nombre des classes attribués à ces indices est 2 et les niveaux de pollution sont « modérées » et le code colleur jaune (Tableau III.3.9).

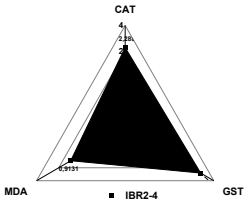
Tableau III.3.9. Intervalles de variations pour les indices IBR_1 et IBR_2.

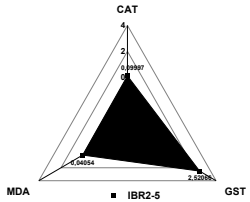
Nombre	Réponses	Couleur code	IBR_1	IBR_2
1	Faible	Vert	[3-4]	≥ 0
2	Modérée	Jaune	[5-6]	[1,96-4,55]
3	Élevé	Orange	[7-8]	[4,89-7,06]
4	Très élevé	Rouge	$\leq$12	$\leq$10,42

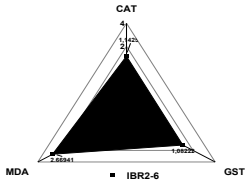

CAT
MDA
GST
IBR2-1

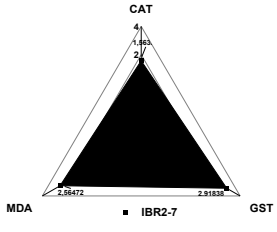

CAT
0,56473
1,11072
MDA
GST
IBR2-2

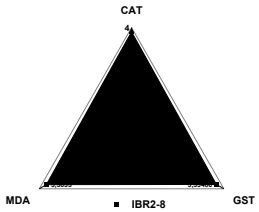

CAT
0,98544
1,3021
MDA
GST
IBR2-3

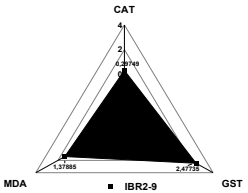

CAT
0,9131
MDA
GST
IBR2-4

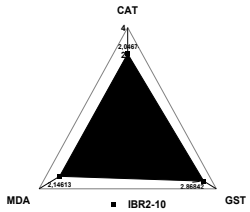

CAT
0,04054
2,92085
MDA
GST
IBR2-5

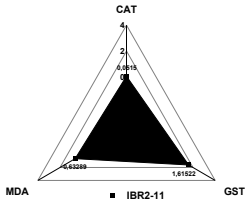

CAT
2,66941
MDA
GST
IBR2-6

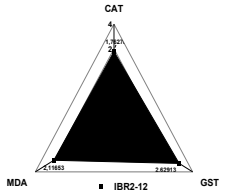

CAT
2,58472
2,91838
MDA
GST
IBR2-7

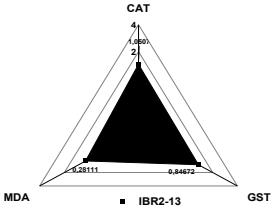

CAT
MDA
GST
IBR2-8

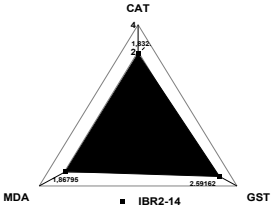

CAT
1,37885
2,47725
MDA
GST
IBR2-9

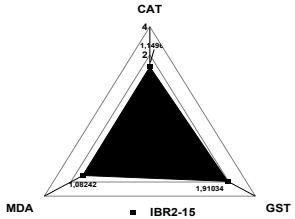

CAT
2,14613
MDA
GST
IBR2-10

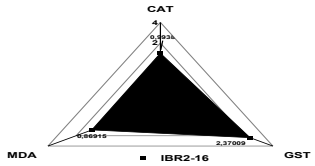

CAT
0,63289
1,61522
MDA
GST
IBR2-11


CAT
2,11653
2,62913
MDA
GST
IBR2-12


CAT
0,28111
0,84672
MDA
GST
IBR2-13


CAT
1,86795
2,59162
MDA
GST
IBR2-14


CAT
1,08242
1,91034
MDA
GST
IBR2-15


CAT
0,66915
2,37005
MDA
GST
IBR2-16

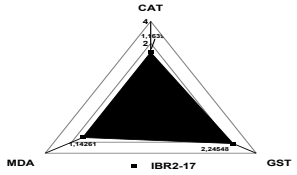

CAT
1,14261
2,24548
MDA
GST
IBR2-17

Figure III.3.9. Réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_2).

Conclusion

L'éxposition des moules « *Mytilus galloprovincialis* » à des concentrations sublétales à court terme pour le cadmium (Cd), le zinc (Zn) et le cuivre (Cu) a été réalisée en évaluant la batterie de biomarqueurs (CAT, GST et MDA) dans les tissus de *Mytilus galloprovincialis* et de la détermination des indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1et IBR_2) par l'utilisation de la méthodologie de la surface de réponse et en particulier du modèle CCF.

Les résultats obtenus ont montré clairement que le MSR est l'une des méthodes appropriées pour caractériser et prédire les réponses des biomarqueurs dans des conditions de laboratoire. En outre, les réponses des biomarqueurs et les indices de la réponse intégrée des biomarqueurs IBR_1 et IBR_2dépendent de type, concentration et combinaison des métaux.

Dans des conditions optimales, les valeurs maximales des biomarqueurs CAT, GST et MDA étaient respectivement de 47,26U.mg^{-1} de protéines, 57,88nmole.min^{-1}.mg^{-1} de protéines, 39,53nmole.mg^{-1} de protéines. En outre, les valeurs de l'IBR_1 et du l'IBR_2 ont été trouvées égales à 12,08 et 10,60 respectivement. Ces résultats sont toujours valables dans le domaine de variation (entre la limite inférieure (niveau bas) et la limite supérieure (niveau haut)) des facteurs (concentrations) étudiés : Cd^{2+} (0-10 % CL_{50}-72h), Zn^{2+} (0 -10 % CL_{50}-72h) et Cu^{2+} (0 -10 % CL_{50}-72h).

Les modèles quadratiques développés ont montré la présence de corrélations significatives entre les valeurs expérimentales et prédites. L'ANOVA a également montré des valeurs élevées de coefficients de détermination, assurant ainsi un ajustement satisfaisant du modèle de régression du second ordre avec les données expérimentales.

L'approche de modélisation des biomarqueurs (CAT, GST et MDA) et indices de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2) dans la moule *Mytilus galloprovincialis*est très prometteuse pour la surveillance future des sites côtiers, la classification et l'évaluation des risques liés aux métaux traces. À titre d'exemple, nous pourrons prédire les réponses antioxydantes par l'utilisation de ces modèles validés par les outils statistiques en distinguant entre les différents milieux selon leurs états de pollution.

Les deux indices (IBR_1 et IBR_2) peuvent différencier entre deux sites sur l'état de pollution sachant que l'IBR_1 donne des comparaisons avec un niveau d'exactitude élevé.

Conclusion Générale

Le présent travail se situe dans un cadre écotoxicologique qui constitue une contribution àl'étude de l'utilisation de la moule méditerranéenne*Mytilusgalloprovincialis* comme bioindicateur de la pollution métallique et de la pollution en générale.

L'objectif du présent travail était de modéliser et d'optimiser par le plan d'expérience (1), la bioaccumulation chez la moule *Mytilusgalloprovincialisvis-à-vis* d'un mélange tertiaire de cadmium, de zinc et de cuivre lors d'expositions à des concentrations sublétaleset (2), l'effet de ce mélange sur le statu oxydatif dans la moule mesuré par les trois biomarqueurs, la CAT, la GST et le MDA.

Notre travail a été réalisé en deux parties complémentaires. La première partie a été consacrée à l'étude de la toxicité létale en 72h(CL_{50}-72h) afin d'apprécier les niveaux de concentrations sublétales à utiliser dans la modélisation.La deuxième partie a été dédiée à l'évaluation de la bioaccumulation des éléments en traces métalliques (Cd, Zn et Cu) et leurs indices de bioaccumulation (IBMI et IPM) liés aux effets d'interaction métal-métal (synergique, antagonisme et sans effet) et l'évaluation de l'effet combiné cadmium-zinc-cuivre sur les propriétés écotoxicologiques de la moule (défonce et dommage oxydatif) à travers le dosage des activités des biomarqueurs étudiés.

La synthèse des principaux résultats obtenus nous a permis de conclure sur les points suivants :

- Les trois métaux étudiés ont des effets létaux à court terme à travers les CL_{50}-72h enregistrées chez *Mytilus galloprovincialis* (2,60, 1,86 et 0,10 mg. L^{-1} pour le Cd, Zn et Cu, respectivement). Donc, le classement de la sensibilité *vis-à-vis* ces métaux est la suivante: Cd<Zn<Cu.Ces différences entre métaux indiquent l'existence de mécanismes de toxicité différents.
- À l'exception de deux autres métaux, le Cu exerce une toxicité létale à très faibles concentrations à court terme, ce qui peut engendrer des toxicités des moules dans les milieux récepteurs car la norme Algérienne fixée pour les rejets des effluents industriels fixée est supérieure à la CL_{50}.
- Le mélange ternaire de 10% de la CL_{50}-72hdéterminé par le plan d'expérience n'est pas létale ce qui permettra de réaliser des bioessaies d'écotoxicité sur la moule.
- Les résultats expérimentaux indiquent le pouvoir de ce mollusque à bioaccumuler considérablement le cadmium, zinc et cuivre présents dans le milieu permettant le

classement de la bioaccumulation d'après l'application de plan d'expérience *vis-à-vis* des métaux Cu<Cd<Zn.

- Les résultats obtenus ont montré clairement que le MSR est l'une des méthodes appropriées pour caractériser et prédire les réponses des biomarqueurs dans des conditions de laboratoire. En outre, les réponses des biomarqueurs et les indices de la réponse intégrée des biomarqueurs l'IBR_1 et l'IBR_2dépendent de type, concentration et combinaison des métaux.

- L'exposition aiguë (72h) aux métaux traces (Cd, Zn et Cu) a démontré une induction des systèmes à action antioxydante (CAT et GST) ainsi qu'une activation de la peroxydation des lipides (MDA) ce qui a donné le classement de degré d'induction des biomarqueurs *vis-à-vis* des métaux sur la base des effets principaux des facteurs étudiés issus de l'application des plans d'expérience, le degré d'induction de trois biomarqueurs est classé selon l'ordre suivant : (1) : CAT (Zn^{2+}) > CAT (Cd^{2+}) > CAT (Cu^{2+}) ; (2) : GST (Zn^{2+}) > GST (Cu^{2+}) > GST (Cd^{2+}) et (3) MDA (Cu^{2+}) > MDA (Zn^{2+}) > MDA (Cd^{2+}). Aussi, le degré d'induction des IBR est classé selon l'ordre suivant : (1) IBR_1 (Cu^{2+}) > IBR_1 (Zn^{2+}) > IBR_1 (Cd^{2+}), (2) IBR_2 (Zn^{2+}) > IBR_2 (Cu^{2+}) > IBR_2 (Cd^{2+}).
- Chaque réponse (bioaccumulation ou biochimique) a pu être modélisée dans un polynôme de second degré par l'utilisation de PE en se basant sur les résultats des bioessais d'écotoxicité du laboratoire.
- Les modèles postulés de second degré pour chaque réponse, validés par ANOVA, sont globalement significatifs. L'analyse de la variance due au manque d'ajustement pour chaque réponse étudiée est non significative, montrant que les modèles adoptés pour les réponses étudiés (bioaccumulation, biochimique) et les indices de la bioaccumulation (IPM et IBMI) et de la réponse intégrée des biomarqueurs (IBR_1 et IBR_2) sont bien ajustés.
- Les coefficients de détermination (R^2 et $R^2_{ajusté}$) sont proches à 1 ; indiquant une forte corrélation entre les valeurs observées et prédites.
- L'étude a révélé que toutes les réponses étudiés (bioaccumulation, biochimique ou les indices) sont dépendantes de l'espèce métallique et de sa concentration (effet individuel) dans le milieu expérimental aussi de la présence d'autre espèce métalliques (binaire ou ternaire: effet d'interaction).

- L'utilisation de plan d'expérience facilite l'identification des interactions toxicologiques métal-métal sur les réponses étudiés (bioaccumulation, biochimique ou les indices).
- Les interactions toxicologiques métal-métal se sont révélées non linéaires, ce qui signifie une interaction supra-additive (synergique), infra-additive (antagoniste) ou sans effet sur les réponses biochimiques ou la bioaccumulation.
- L'optimisation des données expérimentales a été utilisée pour déterminer les conditions optimales pour la bioaccumulation des ETM et pour les réponses des marqueurs biochimiques.
- Ces résultats sont toujours valables dans le domaine de variation (entre la limite inférieure (niveau bas) et la limite supérieure (niveau haut)) des facteurs (concentrations) étudiés : Cd^{2+}(0-10 % CL_{50}-72h), Zn^{2+} (0-10 % CL_{50}-72h) et Cu^{2+} (0-10 % CL_{50}-72h).
- L'analyse de cluster des réponses étudiés (bioaccumulation, biochimique ou les indices) permet de les transformer aux niveaux des charges métalliques ou des réponses (effets) correspondant à des codes couleurs utilisables pour différencier les milieux expérimentaux pollués et non pollués dans des conditions de laboratoire.

Il est à noter que l'approche innovante et originale proposée à travers cette présente étude confirme qu'une combinaison entre le concept de bioaccumulation et le plan d'expérience ainsi que le concept de biomarqueurs et le plan d'expérience permettra d'évaluer et prédire l'état de pollution et la salubrité des moules.

Les résultats acquis dans cette thèse permettent d'envisager de nouvelles perspectives pour des études futures:

- Élargir l'études des bioessaies par le plan d'expérience (bioaccumulation et biomarqueurs) sur la contamination de l'eau de mer à l'échelle du laboratoire par d'autre métaux traces présents dans les effluents industriels comme le Mercure (Hg), Plomb (Pb), Manganèse (Mn)…etc. selon les journaux officiels de la république algérienne n° 26(2006) et n° 30 (2013).
- La contamination de l'eau de mer à l'échelle du laboratoire par les radioéléments d'origine naturelle issue des chaines de désintégration (^{238}U ,^{232}Th ,^{210}Pb,^{214}Pb, ^{226}Ra et ^{214}Bi)et d'origine artificiel (^{137}Cs).

- L'utilisation d'autres biomarqueurs du stress oxydant ou biomarqueurs de la neurotoxicité comme: l'activité superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GPx); l'acétylcholinestérase (AChE) et l'évaluation de la stabilité de la membrane lysosomale. Et l'augmentation de la batterie des biomarqueurs (>3).

- Modélisation des réponses de la bioaccumulation ou des biomarqueurs en fonction des conditions physico-chimiques du milieu expérimental.

- Augmenter le nombre de variables (ETM) et d'additionner à ces mélanges métalliques des polluants organiques (p.e. HAP et pesticide), biologiques (biotoxines), médicaments (antibiotiques), souvent retrouvés dans le milieu marin.

- Étudier la décontamination des moules après le traitement par les ETM et aussi trouver un moyen approprié pour récupérer les ETMbioaccumulés dans les moules.

- Utiliser d'autre espèces bioindicatrices animales ou végétales existent en Algerie: Les huitres, palourde, pétoncles, poisson, oursins, macro-algues vertes et brunes. Etc.

- Application de cette approche de modélisation dans le milieu naturel pour le biomonitoring.

- Une étude comparative entre la bioaccumulation et la biosorption des polluants présents dans les différents écosystèmes aquatiques dans l'objectif d'explorer la capacité d'accumulation et la capacité d'adsorption chez le même être vivant. Après avoir accumulé d'un niveau létale ces moules seront utilisées (coquilles) comme support adsorbant.

Références bibliographiques

1. Chaabane, W., Baccat Chaabane, A. (2009). Débris marins, plastique et microplastiques sur les côtes tunisiennes : les impacts possibles et les defis, Bureau de la fondation Heinrich-Böll-Stiftung-Tunisie, Tunisie, 52 pages.

2. Stankovic, S., Jovic, M., Stankovic, A.R., Katsikas, L. (2012). Heavy metals in seafood mussels. risks for human health. In: Lichtfouse E., Schwarzbauer J., Robert D. (eds) Environmental chemistry for a sustainable world. Environmental chemistry for a sustainable world. Springer, Dordrecht, 410 pages.

3. Bosch, A.C., O'Neill, B., Sigge, G.O., Kerwath, S.E., Hoffman, L.C. (2016). Heavy metals in marine fish meat and consumer health: a review. *Journal of the science of food and agriculture*, 96(1),32-48.

4. Newman, S., Watkins, E., Farmer, A., Brink, P., Schweitzer, J.P. (2015). The economics of marine litter. In: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (eds) Marine Anthropogenic Litter. Springer, Cham., 457 pages.

5. Usero, J., Morillo, J., Gracia, I. (2005). Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain. *Chemosphere*, 59(8), 1175-1181.

6. Quéguiner, B. **(**2009). Biogéochimie côtière. Centre d'océanologie de Marseille, Aix-Marseille Université, France, 49 pages.

7. Pelletier, E., Campbell, P.G.C., Denizeau, F. (2004). Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement.Presses de l'université du Québec, 504 pages.

8. Shahidul Islam, M., Tanaka, M. (2004). Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine PollutionBulletin*, 48(7-8),624-649.

9. Roméo, M., Gnassia-Barelli, M. (1995). Metal distribution in different tissues and in subcellular fractions of the Mediterranean *Clam Ruditapes* decussatus treated with cadmium, copper or zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 111(3), 457-463.

10. Grimes, S. (2012). Compte rendu du séminaire conjoint Algerie-Japon sur la pollution marine due aux activités sur la terre. ONDD, JICA et MATE, Algerie, 108pages.

11. Mitsuo, Y., Moali, M., Houas, O., Lakhdari, M., Nechaoui, L., Guerrida, Dj., Chatal, A., Oussalem, S., Makour, F., Khelifi, F., Laleg, A. (2005). Environmental pollution in oued El-Harrach area, Alger - A preliminary report on Mercury and heavy metals contaminations, Compte-Rendu du Séminaire sur « Pollution et protection de l'environnement en Algérie », ONEDD et JICA, Alger,19-37 pages.

12. Benhaddya, M.L., Halis, Y., Hamdi-Aïssa, B. (2020). Assessment of heavy metals pollution in surface and groundwater systems in Oued Righ region (Algeria) using pollution indices and multivariate statistical techniques.*African Journal of Aquatic Science*, 45 (3), 269-284.

13. Talbi, H., Kachi, S., Evaluation of heavy metal contamination in sediments of the seybouse River, Guelma-Annaba, Algeria. *Journal of water and land development*, 40 (1), 81-86.

14. Benrabah, S., Bousnoubra, H., Kherici1, N., Cote, M., (2013). Caractérisation de la qualité des eaux de l'oued Kebir Ouest (Nord Est Algérien).*Synthèse : Revue des Sciences et de la Technologie*, 26(2013), 26-39.

15. Belhadj, M., Ghezzar, M.R., Abdelmalek, F., Ben Ahmed, A.A, Ouddane, B., Addou, A. (2006). Assessment of the sediment contamination by heavy metals of the Cheliff River, Algeria.*Fresenius Environmental Bulletin*, 15(3), 1-8.

16. Kies, F., (2015). Assessment of surface water chemistry and algal biodiversity in the Bay of Mostaganem and the: Cheliff estuary North-western Algeria. *Sustainability, Agri*, *Food and Environmental Research*, 3(1), 1-16.

17. Tayeb, A., Chellali, M.R., Hamou, A., Debbah, S. (2015). Impact of urban and industrial effluents on the coastal marine environment in Oran, Algeria. *Marine Pollution Bulletin,* 98(1-2), 281-8.

18. Zenati, B., Inal. A., Kourdali, S., Mesbaiah, F.Z., Meknachi, A., Bachouche, S. (2021). Characterization and dynamics of the pollutant load discharge carried by the Mazafran River (N Algeria) on the coastal environment. In: Ksibi M. et al. (eds) Recent Advances in Environmental Science from the Euro-Mediterranean and Surrounding Regions (2nd Edition). EMCEI 2019. Environmental Science and Engineering. Springer, Cham.

19. Megateli, S., Semsari, S., Couderchet, M. (2010). Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper, and zinc) by *Lemna gibba*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (6), 1774-1780.

20. Ouali, N., Belabed, E.B., AF, Zeghdoudi, F., Rachedi, M. (2018). Assessment of metallic contamination in sediment and mullet fish (*Mugil cephalus* Linnaeus, 1758) tissues from the East Algerian coast. *Journal of water and land development*, 38 (7-9).

21. Shulkin, V.M., Presley, B.J., Kavun, V.I. (2003). Metal concentrations in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediments. *Environment International*, 29 (4), 493-502.

22. El-Alfy, M.A., Hasballah, A.F., Abd El-Hamid, H.T., El-Zein, A.M. (2019). Toxicity assessment of heavy metals and organochlorine pesticides in freshwater and marine environments, Rosetta area, Egypt using multiple approaches. *Sustainable Environment Research*, 29(19), 1-12.

23. Rabaoui, L., El-Zrelli, R., Ben Mansour, M., Balti, R., Mansour, L., Tlig-Zouari, S., Guerfel, M. (2015). On the relationship between the diversity and structure of benthic macro invertebrate communities and sediment enrichment with heavy metals in Gabes Gulf, Tunisia. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 95(2), 233-245.

24. Ayadi, N., Zghal, I., Aloulou, F., Bouzid, J. (2016). Impacts of several pollutants on the distribution of recent benthic foraminifera: the southern coast of Gulf of Gabes, Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(7), 6414-6429.

25. Amiard-Triquet,C., Jeantet, A.Y., Berthet,B.(1993). Metal transfer in marine food chains: bioaccumulation and toxicity. *Acta Biol Hung*.,44(4),387-409.

26. Sani, A., Idris, K.M., Abdullahi, B.A., Darma, A.I. (2022). Bioaccumulation and health risks of some heavy metals in *Oreochromis niloticus*, sediment and water of Challawa River, Kano, Northwestern Nigeria. *Environmental Advances*,7(1), 100-172.

27. Ali, H., Khan, E., Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation.*Journal of Chemistry*, 1-14.

28. Abele, D., Vazquez-Medina, J.P., Zenteno-Savın, T. (2013).Oxidative stress in aquatic ecosystems.John Wiley and Sons Ltd, United Kingdom, 548pages.

29. Livingstone, D.R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*,42(8), 656-666.

30. Tlili, S.(2012). Approche multi-marqueurs pour l'évaluation de l'état de santé du golfe de Tunis : étude des réponses biochimiques, physiologiques et cytologiques des mollusques bivalves exposés aux effluents des oueds . Thése de doctorat de l'université de Monastir, Tunisie, 249 pages.

31. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard-Triquet, C., Ramade, F.(1998). Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier- Tec & Doc (Editions), France, 316 pages.

32. Marchand, M., (2009). Activites de surveillance au sein du programme « dynamique, evaluation et surveillance des ecosystemes cotiers.IFREMER, Frnace, 26pages.

33. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F.(1997). Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux, Ed Masson, Paris, (1997),419 pages.

34. Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C. (2008). Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier-Tec & Doc, France,375 pages.

35. Amiard J.C., Caquet T. et Lagadic L., "Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement", In : "Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement", Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C et Ramade F. (Eds.), Lavoisier- Tec & Doc, France, 316 pages.

36. Beliaeff, B., Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental toxicology chemistry,* 21, 1316-22.

37. Chèvre, N., Gagné, F., Blaise, C. (2003). Development of a biomarker-based index for assessing the ecotoxic potential of aquatic sites. *Biomarkers*,8(3-4),287-98.

38. Maes, G.E., Raeymaekers, J.A.M., Pampoulie, C., Seynaeve, A., Goemans, G., Belpaire, C., Volckaert, F.A.M.(2005). The catadromous European eel *Anguilla anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. *Aquat. Toxicol*.,73, 99-114.

39. Ratier, A. (2019). Modélisation toxico-cinétique de la bioaccumulation de composés organiques persistants par des invertébrés benthiques d'eau douce. Thése de doctorat de l'université de Lyon, France, 325 pages.

40. Yen Le, T.T., Nachev, M, Grabner, D., Garcia, M.R., Balsa-Canto, E., Hendriks, A.J., Peijnenburg, W.J.G.M., Sures, B.(2021). Modelling chronic toxicokinetics and toxicodynamics of copper in mussels considering ionoregulatory homeostasis and oxidative stress. *Environmental Pollution*, 287,117-645.

41. Andral, B., (2003). Le réseau Intégrateurs Biologiques (RINBIO) en Méditerranée : Évaluation de la contamination chimique basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules. IFREMER, France, 13pages.

42. Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Leonard, D.R.P. (2004). An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*,552(1-2),247-268.

43. Boudjema, K., Kourdali, S., Bounakous, N., Meknachi, A., Badis, A. (2014). Catalase activity in brown mussels (*Perna perna*) under acute cadmium, lead, and copper exposure and depuration tests. *Journal of Marine Biology*, 2014,1-9.

44. Calamari, D., Naeve, H, (1994). Revue de la pollution dans l'environnement aquatique africain, document technique du Comité des pêches continentales pour l'Afrique (CPCA). FAO, Rome, 25,129 pages.

45. Pandiyan, J., Mahboob, S., Govindarajan, M., Al-Ghanim, K.A., Ahmed, Z., Al-Mulhm, N., Jagadheesan, R., Krishnappa, K. (2021). An assessment of level of heavy metals pollution in the water, sediment and aquatic organisms: A perspective of tackling environmental threats for food security. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(2), 1218-1225.

46. Alnashiri, H.M. (2022). A brief review on heavy metal bioaccumulation studies from Red Sea. *Adsorption Science & Technology*,2022,8.

47. Farooq, M.A., Ali, B., Gill, R.A., Islam, F., Cui, P., Zhou, W. (2016). Chapter 2 - Breeding Oil Crops for Sustainable Production: Heavy Metal Tolerance, in: Gupta, S.K. (Ed.), Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production. Academic Press, San Diego, 19-31pages.

48. Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M. (2018). Plants under metal and metalloid stress responses, tolerance and remediation. Springer, Singapore ,720 pages.

49. Bourrelier, P.-H., Berthelin, J., Pédro, G., Institut de, F., Académie des, S.(1998). Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion : [organisé par l'Académie des sciences, 11 mai 1998]. Tec & Doc, Paris; Londres; New York. 438pages.

50. Chester, R.(1990). Trace elements in the oceans, in: Chester, R. (Ed.), Marine Geochemistry. Springer Netherlands, Dordrecht, 346-421pages.

51. Csuero, M. (2018). Environmental sampling and analysis: lab manual. CRC Press, Boca Raton, 400 Pages.

52. Miquel, G.(2001). Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, Rapport d'information n°261, Paris. France,365pages.

53. Gouzy, A., Ducos, G. (2008). La connaissance des éléments traces métalliques : un défi pour la gestion de l'environnement.INERIS, France, 6-10 pages.

54. Wood, J.M.(1976). Les métaux toxiques dans l'environnement . *La Recherche*, 70, 711-719.

55. Gaillardet, J., Viers, J., Dupré, B.(2003). Treatise on geochemistry. Elsevier, New York, 499 pages.

56. Lafabrie, C.(2010). Utilisation de *Posidonia oceanica (L.)* comme bio-indicateur de la contamination métallique. Thèse de doctorat, Université de Corse, France, 158 pages.

57. Megateli,S.(2010). Étude de la toxicité de trois métaux lourds (cuivre, cadmium et zinc) et d'un fongicide (Diméthomorphe) sur une plante aquatique : perspectives d'utilisation en phytoremediation.Thése de doctorat,Université de Blida 1,144 pages.

58. Agence du Bassin du Rhône (ABR) .(1990).Greenpeace,projet mer méditerranée (Aout 1998).

59. Zirino, A., Yamamoto, S.(1972). A pH-Dependent model for the chemical speciation of copper, zinc, cadmium, and lead in seawater. *Limnology and Oceanography*,17, 661-671.

60. Florence, T.M., Batley, G.(1980). Chemical speciation in natural waters. CRC Critical reviews in analytical chemistry 9, 219-296.

61. Buffle,J. (1980). Complexation reactions in aquatic systems. An analytical approach Ellis Horwood Pub., Chichester, 700 pages.

62. Tessier, A.,Turner D.R. (1995). Metal speciation and bioavailability in aquatic systems,John Wiley, New York.696 pages.

63. Morel, M.L.L. (1983). Principales of aquatic chemistry. John Wiley and Sons, New York, 446 pages.

64. Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., Santore, R.C.(2009). Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environmental toxicology and chemistry*, 20, 2383-2396.

65. Hayzoun, H. (2014). Caractérisation et quantification de la charge polluante anthropique et industrielle dans le bassin du Sebou.Thése de doctorat. Université de Toulon, Université Sidi Mohamed ben Abdellah (Fès, Maroc),176pages.

66. Urien, N.(2015). Modélisation de la bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le genre Gammarus : influence des facteurs environnementaux et de l'histoire de vie des organismes.Thése de doctorat,Université Lyon1- Claude Bernard,France, 261 pages.

67. Pelletier,E., Campbell, P.G.C.(2008).L'écotoxicologie aquatique-comparaison entre les micropolluants organiques et les métaux:constats actuels et défis pour l'avenir.*Revue des sciences de l'eau*, 21(2),173-197.

68. Grégoire,P., Abriak,N-E, Zri,A. (2008) . Bioccumulation dans les tissus des espèces marines fréquentant les sites d'immersion.*Déchets Sciences et Techniques*, 51(3), 8pages.

69. Ribeyre, F. , Boudou, A. (1980).Transfer of methylmercury in an experimental freshwater trophic chain-temperature effects.*Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*,1(4), 259-268.

70. Goldberg, E,D. (1975). The mussel watch: a first step in global marine monitoring. *marine pollution Bulletin*, 6, 111-114.

71. Talebz, M.Z., Boutiba, (2007). La moule *Mytilus galloprovincialis*: bioindicatrice de pollution marine-cas duportd'oran. *Sciences et Technologie C*, 25,59-64.

72. Roméo, M., Gnassia-barelli, M., Carré, C.J.W.R.(1987). Trace metals: Cd, Cu, Pb and Zn in gelatinous macroplankton from the Northwestern Mediterranean.*Water Research*, 21(10), 1287-1292.

73. Merzouki, M., Talib, N., Sif, J, (2009). Indice de condition et teneurs de quelques métaux (Cu, Cd, Zn et Hg) dans les organes de la moule *Mytilus galloprovincialis* de la côte d'El Jadida (Maroc) en mai et juin 2004 .*Bulletin de l'institut scientifique, Rabat, section sciences de la vie*,31 (1), 21-26.

74. Abderrahmani,KH., Boulahdid,M., Bendou,N., Guenachi,B.,Rouane Hacene,O., Masino,F., Montevecchi,G.(2021). Partitioning of trace elements in the tissues of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sampled from industrial sites along the Algerian coast.*Marine Pollution Bulletin*,173, Part A, 1-12.

75. Touahria, H.G., Boutiba,Z., Benguedda,W., Shaposhnikov,S.(2016).Active biomonitoring of mussels *Mytilus galloprovincialis* with integrated use of micronucleus assay and physiological indices to assess harbor pollution. *Marine Pollution Bulletin,*110(1), 52-64.

76. Boudou, A. (2004). Mécanismes de bioaccumulation des métaux-traces chez les organismes aquatiques.Contamination et décontamination des mollusques bivalves - IFREMER- Nantes,17 pages.

77. Adami, G., Barbieri, P., Fabiani, M., Piselli, S., Predonzani, S., Reisenhofer, E. (2002). Levels of cadmium and zinc in hepatopancreas of reared *Mytilusgalloprovincialis* from the Gulf of Trieste (Italy). *Chemosphere*, 48(7), 671-677.

78. Azizi, G., M, Akodad., Baghour, M., Mostafa, L., Moumen, A.(2018). The use of *Mytilus spp*. mussels as bioindicators of heavy metal pollution in the coastal environment. A review. *Journal of Materials and Environmental Science* , 9(4),1170-1181.

79. Bourgeault, A. (2010). Bioaccumulation par *Dreissena polymorpha*: quel reflet de la contamination chimique du milieu ? Expérimentation-Observation-Modélisation.Thése de doctorat, Université Pierre et Marie Curie VI - Paris,France, 251 pages.

80. Casas, S.(2005). Modelisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la Moule*, Mytilus galloprovincialis*, en milieu mediterraneen. Thése de doctorat, Universite du sud Toulon var, Toulon, France, 363 pages.

81. Casas, S., Bacher, C. (2006). Modelling trace metal (Hg and Pb) bioaccumulation in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, applied to environmental monitoring. *J. Sea Res*., 56, 168-181.

82. Mouabad, A.(1991). Toxicité comportementale et physiologique (filtration, respiration) des métaux lourds (Cu, Zn, Hg, Cd et Pb) chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* pallas : proposition d'un protocole d'essai pour l'évaluation de la toxicité par la réponse comportementale de *Dreissena*. Thése de doctorat, Université de Metz,France,274 pages.

83. George, S.G., Viarengo, A. (1985). A model for heavy metal homeostasis and detoxication in mussel. In: "Marine pollution and physiology. Recent advances". Vernberg, F.J., Thurnerg, F.P., Calabrese, A., Vernberg, W.B. (eds). University of South Carolina Press, Columbia, 125-143 pages.

84. Malins, D.C. (1994). Metal regulation in aquatic animals: mecanisms of uptake, accumulation, and release. CRC Press, London ,34 pages.

85. Giguère, A.(2003). Accumulation et répartition subcellulaire des métaux (Cd, Cu, Zn, Ni) chez deux organismes aquatiques exposés à un gradient métallique en milieu naturel: liens avec le stress oxydant.Thése de doctorat, Université du Québec, Canada,282 pages.

86. GiguèreCouillard ,Y., Campbell, P.G.C., Perceval, O., Hare L., Pinel-Alloul, B., Pellerin, J.(2003). Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient .*Aquatic Toxicology,* 64, 185-200.

87. Winge, D., Krasno, J., Colucci, A.(1973). Cadmium accumulation in rat liver correlation between bound metal and pathology. In: "Trace element metabolism in animals", Hoekstra, Static, Ganther and Metz eds., . Univ. Park Press, Baltimore, 500-502 pages.

88. Johansson, C., Cain, D.J., Luoma, S.N.(1986). Variability in the fractionation of Cu, Ag, and Zn among cytosolic proteins in the bivalve Macoma balthica. *Marine Ecology Progress Series*, 28(1-2), 87-97.

89. Regoli, F.(2000). Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 50(4), 351-361.

90. Lushchak, V.I.(2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13-30.

91. Peralta-Videa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G., Gardea-Torresdey, J.(2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(8-9), 1665-1677.

92. Lam,P.K.S.(2009).Use of biomarkers in environmental monitoring.*Ocean & Coastal Management*,52(7), 348-354.

93. Li, X.(2009) . Glutathione and glutathione-s-transferase in detoxification mechanisms, General applied and systems toxicology, John Wiley and Sons, Ltd.,Londond, 1-13 pages.

94. Shumyantseva,V.V., Makhova, A.A., Bulko,T.V., Kuzikov, A.V., Shich, E.V., Kukes,V., Archakov,A,I. (2015). Electrocatalytic cycle of P450 cytochromes: the protective and stimulating roles of antioxidants.*RSC Advances*, 5, 71306-71313.

95. Azdi, M.(2006). Utilisation de la moule africaine *Perna perna* Born (1780) pour l'évaluation de la contamination des côtes marocaines par les hydrocarbures : analyse de paramètres chimiques et biologiques. These doctorat , Universite Ibnou Zohr, Maroc,179 pages.

96. Kerambrun, É. (2011). Évaluation des effets biologiques des contaminants chimiques sur les juvéniles de poissons marins : approche multibiomarqueur en conditions expérimentales et *in situ*. Thése de doctorat, Université du Littoral Côte d'Opale. France,358 pages.

97. Wallace, W., Luoma, S.(2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series*, 257(125-137),1-13.

98. Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg,M.(2014). Handbook on the toxicology of metals. Academic press, London,1544 pages.

99. Paquin, P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., Campbell, P.G.C., Delos, C.G., Di Toro, D.M., Dwyer, R.L., Galvez, F., Gensemer, R.W., Goss, G.G., Hogstrand, C., Janssen, C.R., McGeer, J.C., Naddy, R.B., Playle, R.C., Santore, R.C., Schneider, U., Stubblefield, W.A., Wood, C.M., Wu, K.B.(2002). The biotic ligand

model: a historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*,133, 3-35.

100. Truhaut, R.(1977). Ecotoxicology : Objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1(2), 151-173.

101. Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E.(2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*,13(2), 57-149.

102. Peakall, D.B.(1994). The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* ,3, 157-160.

103. Rodrlguez-Ariza, A., Martlnez-Lara, E., Pascual, P., Pedrajas, J., Abril, N., Dorado, G., Toribio, F., Bárcena, J., Peinado, J., Pueyo, C., López-Barea, J.(1993). Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Science of The Total Environment,*134(1),109-116.

104. Farré, M., Rodriguez-Mozaz, S., Alda, M.L., Barceló, D., Hansen, PD. (2009). Biosensors for environmental monitoring at global scale and the EU Level. In: Barceló D., Hansen PD. (eds) Biosensors for environmental monitoring of aquatic systems. The Handbook of Environmental Chemistry, Springer, Berlin, Heidelberg, 1-32 pages.

105. Amara, A.(2013). Évaluation de la toxicité de pesticides sur quatre niveaux trophiques marins : microalgues, échinoderme, bivalves et poisson. Thése de doctorat de l'université de Tunis El Manar, Tunisie, 249 pages.

106. Ramade,F.(2007).Introduction à l'écotoxicologie: Fondement et applications. Éditions TEC & DOC,Paris, France,618pages.

107. Triffault-Bouchet G.(2004). Effets sur les écosystèmes aquatiques lentiques des émissions de polluants provenant de différents modes de valorisation/élimination de déchets - Application à des mâchefers d'uiom et à des boues de dragage de canaux. Thése de doctorat de de Savoie et LSE de l'ENTPE, France, 249 pages.

108. Moëzzia, F., Javanshira, A., Eagderia, S., Poorbaghera, H., Sallakib, M. (2013). Evaluation of bivalve clearance rate (CR) as a physiological indicator of heavy metal toxicity in freshwater mussel, *Anodonta cygnea* (Linea, 1876). *Scientific Journal of Animal Science*, 2(4), 89-94.

109. Aubert,A.A., Bernard,J.G.(2004). Mesure intégrée du risque dans les organisations, Presses de l'université de Montréal,Canada, 524pages.

110. Finney,D.J.(1971).Probit analysis.Third edition, Cambridge University Press,UK,333pages.

111. Centre de technologie environnementale (CTE).(2005). Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité. Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Ottawa-Ontario, Canada,306pages.

112. Abbott, W.S.(1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.,* 18, 265-267.

113. L'organisation de coopération et de développement économiques(OCDE) .(2008). Guidelines for the testing of chemicals,Canda,27 pages.

114. Hayes,W.(2008).Principles and methods of toxicology.Fifth Edition,CRC Press. Boca Raton,USA.,2270pages.

115. Mc Carthy, J.F. and Shugart, L.R. (1990). Biological Markers of Environmental Contamination. In: Mc Carthy, J.F. and Shugart, L.R., Eds., Biomarkers of Environmental Contamination, Lewis Publishers, Boca Raton,USA., 3-14pages.

116. De Lafontaine,Y., Gagné,F., Blaise,C., Costan,G., Gagnon,P., Chanb,H.M.(2000). *Aquatic Toxicology*,50(1-2) , 51-71.

117. Curpan, A.S.,Impellitteri, F., Plavan,G.,Ciobica,A.,Faggio, A.(2022). Review: *Mytilus galloprovincialis*: An essential, low-cost model organism for the impact of xenobiotics on oxidative stress and public health.*Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*,256,1-18.

118. Garrec, V.H.(2002). Biosurveillance végetale de la qualite de l'air : concepts, methodes et application. Tec & Doc, Paris,France,116 pages.

119. Krishnakumar, P. K.,Qurban, M.A., Sasikumar, G. (2018). Biomonitoring of trace metals in the coastal waters using bivalve molluscs. In: Trace elements - human health and environment. IntechOpen, 153-176 pages.

120. Maanan, M.(2007). Biomonitoring of heavy metals using *Mytilus galloprovincialis* in Safi coastal waters, Morocco. *Environmental Toxicology,* 22, 525-531.

121. Raspor, B., Dragun, Z., Erk, M.(2005). Examining the suitability of mussel digestive gland to serve as a biomonitoring target organ. *Arh Hig Rada Toksikol*, 56(2), 141-149.

122. Vlahogianni, T.H., Valavanidis, A.(2007). Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant defence enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Chemistry and Ecology*, 23(5), 361-371.

123. Yap, C.K., Ismail, A., Omar, H., Tan, S.G. (2004). Toxicities and tolerances of Cd, Cu, Pb and Zn in a primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*Perna viridis*). *Environ. Int*., 29, 1097-1104.

124. Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J.M. (2013). A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science and Pollution Research* ,20, 2721-2725.

125. Louiz, I., Ben Hassine, O.K., Palluel, O., Ben-Attia, M., Aït-Aïssa, S.(2016). Spatial and temporal variation of biochemical biomarkers in Gobius niger (Gobiidae) from a

southern Mediterranean lagoon (Bizerta lagoon, Tunisia): Influence of biotic and abiotic factors,*Marine Pollution Bulletin*, 107(1), 305-314.

126. Kourdali, S.,Boudjema, K., Meknachi, A.,Bounakous, N., Jaouadi, B., Mechri, S., Badis, A. (2022). An ecotoxicological approach for assessing marine pollution: Comparative study of multi-responses of marine mussels, *Mytilus galloprovincialis* and *Perna perna*, exposed to pollutant heavy metals (copper and lead). *Regional Studies in Marine Science*,87-94.

127. Rajkumar, J.S.I., R., Milton., J.(2011). Biochemical changes induced by cadmium, copper, lead and zinc exposure to *Perna viridis* under long term toxicity test. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*,2(3),50-59.

128. Prakash, N.T., Rao, K.S.J., 1995. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 146, 107-113.

129. Mejdoub, Z.,Fahde, A., ,lotifi,M., M., Kabine.(2017).Oxidative stress responses of the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to emissary's pollution in coastal areas of Casablanca. *Ocean and Coastal Management,*136, 95-103.

130. Ramade, F.(1977). Ecotoxicologie, Masson, France, 205 pages.

131. Beldi, H., Gimbert,F., Maas,S., Scheifler,R., Soltani,N.(2006). Seasonal variations of Cd, Cu, Pb and Zn in the edible mollusc *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba, Algeria. *African Journal of Agricultural Research*,1(4), 85-90

132. Sifi, K., Chouahd, S., Soltani, N. (2007). Biosurveillance de l'environnement par la mesure de biomarqueurs chez *donax trunculus* dans le golfe d'Annaba (Algérie). *Mésogée* , 63 , 11-18.

133. Kourdali,S., Badis, A., Boucherit,A.(2014). Degradation of direct yellow 9 by electro-Fenton: Process study and optimization and, monitoring of treated water toxicity using catalase.*Ecotoxicology and Environmental Safety*, 110, 110-120.

134. Boudjema, K., Kourdali, S., Bounakous, N.,Meknachi, A.,Badis, A.(2015). Tilising caging techniques to investigate catalase response, accumulated fecal bacteria and heavy metals in *Perna perna* (Linnaeus, 1758) for active biomonitoring coastal waters: A study applied in the bay of Bou-Ismail (Algeria). *Advances in Environmental Biology*, 8(824),215-224.

135. Boudjema, K., Meknachi, A., Kourdali, S., Bounakous, N., Badis, A.(2016). Effect of sublethal concentrations of heavy metals (cadmium, lead, and copper) on the soluble nitrogen and phosphorus excretion of marine brown mussel (*Perna perna*) (Linnaeus, 1758) (Mollusca; Bivalvia). *Int. J. Fish. Aquat. Stud.,* 4, 455-462.

136. Benali,I., Boutiba,Z.,Grandjean,D., Alencastro,L.F.,Rouane-Hacene,O., Chèvre, N.(2017).Spatial distribution and biological effects of trace metals (Cu, Zn, Pb, Cd) and

organic micropollutants (PCBs, PAHs) in mussels *Mytilus galloprovincialis* along the Algerian west coast. *Marine Pollution Bulletin*, 115(1-2), 539-550.

137. Meknachi, A., Djellali, M., Badis, A.(2020). Ecotoxicity assessment of industrial wastewater: evolution of catalase activity as a biomarker of oxidative stress in the mussels *Mytilus galloprovincialis* and *Perna perna* . *Agrobiologia*,10(1), 1770-1786.

138. Sidali,K., Bounakous, N., Meknachi, A., Zenati, B., Inal, A.(2020).Preliminary study of catalase enzyme activity and protein concentrations in themediterranean and african mussels, *Mytilus galloprovincialis* and *Perna perna*, cohabiting on the same natural coastal site (Figuier, Boumerdes, Algeria). *Ocean Science Journal,* 55,521-536.

139. Guendouzi, Y., Soualili, D.L., Boulahdid,M., Eddalia,N., Boudjenoun,M., Noureddine.A.(2021).The Mussel *Mytilus galloprovincialis*: Nutritional quality and bioindicator of availability of radionuclides in the marine environment (Algerian Basin). Recent Advances in Environmental Science from the Euro-Mediterranean and Surrounding Regions (2nd Edition) , 665-670 pages.

140. Guendouzi,Y.,Boulahdid,M.,Rouane Hacene, O., Inal,A.,Boudjellal, B., Fowler,S.W.(2021). Contamination level and ecological risk assessment of particulate trace metals in Southwestern Mediterranean Sea. *Regional Studies in Marine Science*, 46, 24.

141. Boudjema,K.,Badis, A.,Moulai-Mostefa, N. (2021). Study of heavy metal bioaccumulation in *Mytilus galloprovincialis* (Lamark 1819) from heavy metal mixture using the CCF design. *Environmental Technology & Innovation*,25 , 16.

142. Aebi, H.(1984). Catalase in vitro.*Methods in Enzymology,*105,121-126.

143. Claiborne, A.(1985). Catalase activity. In: Greenwald, R.A., ed., CRC Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton,USA., 283-284 .

144. Kehrer, J.P., Robertson, J.D., Smith, C.V.(2010). Free radicals and reactive oxygen species, in: McQueen, C.A. (ed.), Comprehensive toxicology (Second Edition). Elsevier, Oxford,UK., 277-307 pages.

145. Lesser, M.P.(2006). Oxidative stress in marine environments. *Biochemistry and Physiological Ecology*, 68, 253-278.

146. Abhijith, B.D., Ramesh, M., Poopal, R.K.(2016). Responses of metabolic and antioxidant enzymatic activities in gill, liver and plasma of *Catla catla* during methyl parathion exposure. *The Journal of Basic and Applied Zoology*,77, 31-40.

147. Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P.(1997). Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves,Unio tumidus,as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 38, 122-131.

148. 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 Acta*, 24(3), 263-271.

149. Khessiba, A., Roméo, M., Aïssa, P.(2005). Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environmental Pollution*, 133(2), 275-281.

150. Pellerin-Massicott, J.(1994). Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 3, 101-111.

151. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B.(1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of biological chemistry,* 249(22), 7130-7139.

152. Pajaud,J.(2013). Rôle modulateur de la Glutathion Transférase Pi dans la prolifération et la mort des cellules normales et transformées. Thése de doctorat de l'université de Rennes, France, 202 pages.

153. Townsend, D.M., Tew, K.D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* ,22, 7369-7375.

154. Rao, A.V., Shaha, C.(2000). Role of glutathione S-transferases in oxidative stress–induced male germ cell apoptosis. *Free radical biology and medicine*, 29(10), 1015-1027.

155. Röth, E., Marczin, N., Balatonyi, B., Ghosh, S., Kovács, V., Alotti, N., Borsiczky, B., Gasz, B.(2011). Effect of a glutathione S-transferase inhibitor on oxidative stress and ischemia-reperfusion-induced apoptotic signalling of cultured cardiomyocytes. *Experimental and clinical cardiology,* 16(3), 92-96.

156. Aniya, Y, Anders, M.W.(1989). Activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase by reduced oxygen species. *The Journal of biological chemistry*, 264(4), 1998-2002.

157. Berhane, K., Widersten, M., Engström, A., Kozarich, J.W., Mannervik, B.(1994). Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91(4), 1480-1484.

158. Damiens,G., His,E., Gnassia-Barelli,M., Quiniou,F., Romeo,M.(2004). Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 138 (2) 121-128.

159. Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., Devier, M.H., Geffard, O., Gricourt, L., Augagneur, S., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Lebailly, P., Cachot, J.(2006). Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquatic Toxicology*, 79(1), 65-77.

160. Aust, S.D., Morehouse, L.A., Thomas, C.E.(1985). Role of metals in oxygen radical reactions. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine,* 1(1), 3-25.

161. Fadhlaoui, M., Couture, P.(2016). Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology*, 180, 45-55.

162. Ben Saad, H., Kammoun,I., Zeghal, Kh.M., Ben Amara,I., Magné,C., Hakim,A. (2017). Effects of selenium on tebuconazole-induced nephrotoxicity in adult rats. *Journal international de médicale de Sfax*, 27(17), 35-42.

163. Gaweł, S., Wardas, M., Niedworok, E., Wardas, P.(2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie*, 57(9-10), 453-455.

164. Alves de Almeida, E., Celso Dias Bainy, A., Paula de Melo Loureiro, A., Regina Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Fujita Barbosa, L., Carrião Machado Garcia, C., Manso Prado, F., Eliza Ronsein, G., Alexandre Sigolo, C., Barbosa Brochini, C., Maria Gracioso Martins, A., Helena Gennari de Medeiros, M., Di Mascio, P.(2007). Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative biochemistry and physiology. Part A,Molecular & integrative physiology*, 146(4), 588-600.

165. Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P.(2000). Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus,* in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(2),106-121.

166. Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N., Orunesu, M.(1990). Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* lam. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 97(1), 37-42.

167. Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R.(1991). Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100(1-2), 187-190.

168. Arasu, S.M., Reddy, P.S.(1995). Changes in lipid peroxidation in the gill and muscle of the marine bivalve (*Perna Viridis*) during exposure to cadmium and copper. *Chemistry and Ecology*, 11, 105-112.

169. Mas-Bargues, C., Escrivá, C., Dromant, M., Borrás, C., Viña, J.(2021). Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. Archives of Biochemistry and Biophysics. *Archives of Biochemistry and Biophysics,*709, 108-941.

170. Landrum, P.F., Lydy, M.J., Lee, H.(1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry,*11, 1709-1725.

171. Grech, A., Brochot,C.,Dorne, J.L.,Quignot, N.,Bois, F.Y., Beaudouin,R.(2017). Toxicokinetic models and related tools in environmental risk assessment of chemicals. *Science of the total environment,*578,1-15.

172. Luoma, S.N., Rainbow,P.S. (2005). Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying principle. *Environmental science and technology*, 39, 1921-1931.

173. Wang, W.X., Tan.Q.G.(2019). Applications of dynamic models in predicting the bioaccumulation, transport and toxicity of trace metals in aquatic organisms. *Environmental Pollution*,252:1561-1573.

174. Lee, J.H., Richards, R.G., Birch, G.F. (2016). A novel coupled biokinetic-equilibrium model to capture oyster metal bioaccumulation in a contaminated estuary (*Sydney estuary*, Australia). *Environmental Modelling and Software*, 82,152-166.

175. Norstrom, R. J., Mckinnon, A.E., Defreitas. A.S.W. (1976). A bioenergetics-based model for pollutant accumulation by fish. Simulation of PCB and Methylmercury residue levels in Ottawa River yellow perch (*Perca flavescens*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada,*33(2), 248-267.

176. Goupy, J., Creighton, L.(2006). Introduction aux plans d'expériences. Dunod, Paris, France, 336 pages.

177. Goupy,J. (2006). Plans d'expériences pour surfaces de réponses. Dunod, Paris, France, 414 pages.

178. Krause,F.L. (2007). The future of product development: proceedings of the 17th CIRP Design conference. Springer, New York, USA.,733 pages.

179. Vasquez, L.O. (2008). Fuel cell research trends. Nova Science Pub Inc; UK., 486 pages.

180. Charles, J.P., Aillerie, M., Petit, P., Hannane, F., El Mossaoui, H.(2015). Warning of accidental shadowing of a PV generator in operation analyzed with the DoE method, *Solar Energy*, 122, 455-463.

181. Lubet, P.(1973). Exposésynoptique des données biologiques sur la moule: *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) (Atlantique et Méditerranée). Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, N° 88. Rome, 49pages.

182. Bachelot, M., Casellas, C., Sibaghe, M.-U.E.d.(2010). Mussels (*Mytilus*) contamination in marine environment by pharmaceutical substances and care products. Rapport Ifremer. Ifremer, Plouzane (France), 234pages.

183. Bowen,H.J.M.(1966). Trace elements in biochemistry. Academic Press, New York,USA., 241 pages.

184. Berthet, B.(2008). Les espèces sentinelles. In: Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, Amiard, Jean-Claude and Amiard-Triquet, Claude (Eds.), Lavoisier, Paris,France. 121-125 pages.

185. Bigot, A. (2009). Identification et étude de l'expression de gènes de détoxication chez les bivalves d'eau douce *Unio tumidus* et *Corbicula fluminea* : approches en laboratoire et en milieu naturel. Université Paul Verlaine - Metz, France, 191 pages.

186. Mc Donald,J.H.,Seed,R., Koehn,R.K.(1991). Allozymesandmorphometric charactersofthreespeciesof *Mytilus* in theNorthernandSouthern Hemispheres.*Marine Biology*, 111,323-333.

187. Grassé, P.(1960). Mollusques lamellibranches in traité en zoologie. Masson et Cie. Paris. 1906-2133.

188. Barnab, G.(1991). Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture. Lavoisier, Tec and Doc, Paris,France,520 pages.

189. Denis, L., Alliot, E., Grzebyk, D.(1999). Clearance rate responses of Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to variations in the flow, water temperature, food quality and quantity. *Aquatic living resources*, 12, 279-288.

190. Salerno, J., Gillis, P.L., Bennett, C.J., Sibley, P.K., Prosser, R.S.(2018). Investigation of clearance rate as an endpoint in toxicity testing with freshwater mussels (*Unionidae*), *Ecotoxicology and Environmental Safety* , 163, 165-171.

191. Naimo, T.J.(1995). A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology*, 4, 341-362.

192. Bayne, B.L. (1989). Measuring the biological effects of pollution: the Mussel Watch approach. *Water science and technology*, 21(10-11), 1089-1100.

193. Lubet, P. (1959). Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les *Mytilidés* et les *Pectinidés*. Thèse 3ème cycle, Paris, 159 pages.

194. Morchid, A.(1987). La reproduction des moules *Mytilus galloprovincialis* Lmk. en élevage dans le Golfe de Fos: aspects biologiques, biochimiques et bioénergétiques, Thesedoctorat. Université Aix-Marseille 2, France, 116pages.

195. Dardignac, M.(1995). Cycles de reproduction naturelle des moules : GdT sur la reproduction des mollusques bivalves d'aquaculture marine (Nantes). In, GdT sur la reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France. Rapport Ifremer, Nantes, France.183page.

196. Bhaby, S., Belhsen, O., Errhif, A.(2013). *Mytilus galloprovincialis*; gametogenesis of a colony of mussels in a fish breeding environment (alboran sea, m'diq, morocco). *Journal of Fisheries and Aquaculture,*4(2), 110-114.

197. Djediat,C.(1993) . Etude histophysiologie et ultrastructurale de la gonade femelle de *Mytilus galloprovincialis* (Lmk,) Mollusque, bivalve lamellibranche, estimation de la

maturité sexuelle et de la structure des populations, Thèse de Magister de l'USTHB., 85pages.

198. Rouabhi, Y.L., Grosjean, P., Boutiba, Z., Rouane Hacene, O., Richir, J. (2019). Reproductive cycle and follicle cleaning process of *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia) from a polluted coastal site in Algeria. *Invertebrate reproduction and development*,63(4), 255-267.

199. Benmakrelouf, S. (2014). Vers l'identification des profils des joueurs à travers l'analyse des données du jeu basée sur le modèle de régression et le regroupement, Mémoire de l'université de université du Québec, Canada, 144 pages.

200. Tufféry, S.(2010). Data mining et statistique décisionnelle: l'intelligence des données. TECHNIP, Paris,France.705 pages.

201. Forgy, E. (1965). Cluster analysis of multivariate data : Efficiency vs. interpretability of classifications. *Biometrics*, 21, 768-780.

202. McQueen, J. (1967). Some methods for classification and analysis of multivariate observations. Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability, 1, 281-297 pages.

203. Bergounioux,M.(2015). Introduction au traitement mathématique des images - méthodes déterministes, Springer , Dordrecht London,UK., 255pages.

204. Nakache, J.P., Confais, J.(2005). Approche pragmatique de la classification: arbres hiérarchiques,Edition Technip,Paris,France,257pages.

205. Norbert Bertrand, S. (2021).Étude comparative et choix optimal du nombre de classes en classification et réseaux de neurones : application en science des données.Mémoire de l'Université du Québec à Trois-Rivières,Canada, 66 pages.

206. Abualigaha,L.M., Khadera,A.T., Hanandeh,E.S.(2017). A hybrid strategy for krill herd algorithm withharmony search algorithm to improve the data Clustering.. *Intelligent Decision Technologies* , 1.1-12.

207. Jin, X., Han, J. (2011) K-Means Clustering. In: Sammut C., Webb G.I. (eds) Encyclopedia of machine learning. Springer, Boston, USA., 563-564 pages.

208. Barrick, A., Châtel,A., Marion,J-M., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Mouneyrac,C. (2016). Anovel methodology for the determination of biomarker baseline levels in the marine polychaete *Hediste diversicolor.Mar Pollut Bull.,*108(1-2), 275-80.

209. Aminot,A., Chaussepied,M.(1983). Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Centre national pour l'exploitation des océans (Cnexo).France,395pages.

210. Chiffoleau, J.F., Auger, D, Chartier, E., Grouhel, A.(2004). Dosage de certains métaux traces (Ag, Cd, Cr, Ni, Pb, V, Zn) dans les organismes marins par adsorption atomique. IFREMER. France, 36 pages.

211. Davenport,J., Manley,A.(1978).The detection of heightened sea-water copper concentrations by the mussel: *Mytilus edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom,*58(4),843 - 850 .

212. Rodgers, J.H., Cherry, D.S., Graney, R.L., Dickso, K.L., Cairns,Jr.(1980). Comparaison of heavy metal interactions in acute and artificial stream bioassay techniques for the asiatic clam (*Corbicula fluminea*). In:" aquatic toxicology", ASTM STP 707.Eaton, J.G., Parrish,P.R.,Hendrick,A.C.(eds).ASTM,Philadelphia,USA., 266-280.

213. Waller,D.L., Rach,J.J., Cope, W.G., Marking,L.L.(1993). Toxicity of Candidate Molluscicides to Zebra Mussels *(Dreissena polymorpha)* and Selected Nontarget Organisms. *J. Great Lakes Res.,* 19(4),695-702.

214. Castaldo, G., Pillet, M., Slootmaekers, B., Bervoets, L., Town, R.M., Blust, R., De Boeck, G.(2020). Investigating the effects of a sub-lethal metal mixture of Cu, Zn and Cd on bioaccumulation and ionoregulation in common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquat. Toxicol.,* 218, 105-363.

215. Hannane, F., Elmossaoui, H., Nguyen, TV., Petit, P., Aillerie, M., Charles, J.P.(2013). Forecasting the PV panel operating conditions using the Design of Experiments method. Terra Green 13 International Conference 2013 - Advancements in Renewable Energy and Clean Environment, *Energy Procedia*,1-11.

216. Skoog, D.A., West, D.M., Holler,F.J.(1997).Chimie analytique.(eds)De Boeck Supérieur.Paris .France,966 pages.

217. Rouane-Hacene, O., Boutiba, Z., Belhaouari, B., Guibbolini-Sabatier, M.E., Francour, P., Risso-de Faverney, C.(2015). Seasonal assessment of biological indices, bioaccumulation and bioavailability of heavy metals in mussels *Mytilus galloprovincialis* from Algerian west coast, applied to environmental monitoring. *Oceanologia,* 57, 362-374.

218. Benali, I., Boutiba, Z., Merabet, A., Chèvre, N. (2015).Integrated use of biomarkers and condition indices in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for monitoring pollution and development of biomarker index to assess the potential toxic of coastal sites. *Marine Pollution Bulletin*, 95,385-394.

219. Abbassi, M., Charioui,I., Banaoui,A., Nadir, M., Agnaou, M., Mahmoud, M., Bah,H., Hikmat, A., Laalaoui1, A., Kaaya,A.(2018). Utilisation de l'approche multimarqueurs pour l'évaluation de l'état de santé du littoral de Sidi Ifni (Maroc) : Indice de la Réponse Intégrée des Biomarqueurs (IBR).*Smetex Journal,*1(1), 18- 25.

220. Bocquené,G.,Galgani,F.(2004).Les marqueurs biologiques des effets de polluants : l'acétylcholinestérase.IFREMER,France,23pages.

221. Elazzaoui,A., Moukrim,A., Lefrere,L.(2019). A Multibiomarker approach to assess the health state of coastal ecosystem receiving desalination plants in Agadir bay, Morocco. *The Scientific World Journal*, 2019, 1-9.

222. Lowry, O.H., Rosebrough, N.A., Farr, L., Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry,*193(1),265-275.

223. Brown,P.B., Clark, R.M., Labarre,D.J., Ross, S.R.(1983). A comparaison of methods for protein analysis of humain milk. *Fed.Proc*.,42,13-30.

224. Durand, G., Beaudeux, J.L.(2008). Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives. (eds) Lavoisier,France,601 pages.

225. Baudin, B.(2013). Méthodes de mesure des activités enzymatiques. Université Paris-Sud,Paris,France,923pages.

226. Kamel,N.(2014). Effets combinés des facteurs environnementaux et des polluants chimiques chez la moule *Mytilus galloprovincialis* : harmonisation des biomarqueurs d'exposition suivant lesrecommandations OSPAR et MEDPOL.Thése de doctorat de l'université de Nantes, France, 216 pages.

227. Chalghmi,H.(2015). Etude de la pollution marine par les hydrocarbureset caractérisation de leurs effets biochimiques et moléculaires sur la palourde de *Ruditapes sp*. Thése de doctorat de l'université de Bordeaux, 2015,France. 216 pages.

228. Habig, W.H., Jakoby, W. B.(1981). Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods in Enzymology,*77, 398-405.

229. Uchiyama, M., Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86(1), 271-278.

230. Mouabad, A., Pihan J.C. (1992). The pumping behaviour response of *Dreissenia polymorpha* to pollutants : a method for toxicity screening. *In* : The zebra mussel *Dreissenia polymorpha*: ecology, biological monitoring and first applications in the water quality management, by Neumann D., Jenner H.A., eds. Gustav Fischer Verlag, New York, USA.,147-154.

231. Conseil National de Recherches du Canada (CNRC) (1985). « The role of biochemical indicators in the assessment of aquatic ecosystem health – their development and validation », Conseil national de recherches du Canada, Ottawa, Publication 24371, 119 pages.

232. Ramakritinan, C.M., Chandurvelan, R., Kumaraguru, A.K.(2012). Acute toxicity of metals: Cu, Pb, Cd, Hg and Zn on marine molluscs, *Cerithedia cingulata* G., *Modiolus philippinarum H. Indian J. Geo Mar*. Sci., 41, 141-145.

233. Bruaux, P., Gillet, J. (1961). Comparaison de l'activité de divers molluscicides en laboratoire. *Bulletin of the World Health Organization*, 25 (4-5), 519 - 523.

234. Rondelaud, P., Hourdin, P., Vignoles,P., Dreyfuss1 G.(2005). Le contrôle intégré de *Galba truncatula* (Mollusca, Lymnaeidae) dans des cressonnières naturelles sur sols acides. *Annales Scientifiques du Limousin*, 16-9.

235. Chan, H.M.(1988). Accumulation and tolerance to cadmium, copper, lead and zinc by the green mussel *Perna viridis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser*., 48, 295-303.

236. Eisler, R.(1977). Acute toxicities of selected heavy metals to the softshell Clam, *Mya arenaria.Bull. Environ. Contam. Toxicol*., 17, 137-145.

237. Mustafa, K.(2014). Elimination of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) metals from tissues of a freshwater fish Tilapia zilli. *Turk. J. Zool.,* 4, 429-436.

238. Vosloo, D., Sara, J., Vosloo, A.(2012). Acute responses of brown mussel (*Perna perna*) exposed to sub-lethal copper levels: Integration of physiological and cellular responses. *Aquat. Toxicol.,* 106-107, 1-8.

239. Ait Fdil, M., Mouabad, A., Outzourhit, A., Benhra, A., Maarouf, A., Pihan, J.C. (2006). Valve movement response of the mussel Mytilus galloprovincialis to metals (Cu, Hg, Cd and Zn) and phosphate industry effluents from Moroccan Atlantic coast. *Ecotoxicol.,* 15, 477-486.

240. Sze, P.W.C., Lee, S.Y.(1995). The potential role of mucus in the depuration of copper from the mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann). *Mar. Pollut. Bull*., 31, 390-393.

241. Marcus Zamora, L., King, C.K., Payne, S.J., Virtue, P.(2015). Sensitivity and response time of three common Antarctic marine copepods to metal exposure. *Chemosphere*, 120, 267-272.

242. Viarengo, A., (1989). Heavy metals in marine invertebrates : mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci*., 1, 295-317.

243. Krishnakumar, P.K., Damodaran, R., Nambisan, P.N.K.(1987). Acute toxicity of selected heavy metals to green mussel *Perna viridis*. *Indian J. Geo Mar. Sci.,*16, 263-264.

244. EI-Komi, M.M., Tayel Fathy, T., 1996. Acute toxicity of four heavy metals to Sphaeroma walkeri and Ciroiana bovina (Crustacea:Isopoda). *Pak. J. Mar. Sci*., 5, 15-23.

245. Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire (JORADP). (2006). Décret exécutif n°06-141 du 20 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 19 avril 2006 définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels. Journal officiel de la republique Algerienne, 26,27pages.

246. Zaldívar, J.-M.(2008). A general bioaccumulation DEB model for mussels, fist ed.Office for official publications of the european communities, JSR Scientific and Technical Reports, Luxembourg,35 pages.

247. Lacroix, C., Richard, G., Seguineau, C., Guyomarch, J., Moraga, D., Auffret, M.(2015). Active and passive biomonitoring suggest metabolic adaptation in blue mussels (*Mytilus*

spp.) chronically exposed to a moderate contamination in Brest harbor (France). *Aqua. Toxicol.,*162, 126-137.

248. Ronci, L., Meccoli, L., Iannilli, V., Menegoni, P., De Matthaeis, E., Setini, A.(2016). Comparison between active and passive biomonitoring strategies for the assessment of genotoxicity and metal bioaccumulation in echinogammarus veneris (*Crustacea: Amphipoda*). *Ital. J. Zool*., 83, 162-172.

249. Salvat-Leal, I., Verdiell, D., Parrondo, P., Barcala, E., Romero, D.(2020). Assessing lead and cadmium pollution at the mouth of the river Segura (SE Spain) using the invasive blue crab (*Callinectes sapidus Rathbun*, 1896, *Crustacea, Decapoda*, *Portunidae*) as a bioindicator organism. *Reg.Stud. Mar. Sci.,*40, 101521.

250. Markert, B.A., Breure, A.M. et Zechmeister, H.G. (2003). Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. Bioindicators and biomonitors: principles, concepts and applications, B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeiter, editors. (Oxford : Elsevier Science Limited), USA., 3-39 pages.

251. García-Navarro, J.A., Franco, L., Romero, D.(2017). Differences in the accumulation and tissue distribution of Pb, Cd, and Cu in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to single, binary, and ternary metal mixtures. *Environ. Sci. Pollut. Res.,* 24, 6599-6610.

252. Prato, E., Biandolino, F., Scardicchio, C.(2006). Test for acute toxicity of copper, cadmium, and mercury in five marine species. *Turk. J. Zool*., 30.1-6.

253. Mersch, J., Morhain, E., Mouvet, C.(1993). Laboratory accumulation and depuration of copper and cadmium in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* and the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Chemosphere*, 27, 1475-1485.

254. Abderrahmani, K., Boulahdid, M., Bendou, N., Aissani, A.(2020). Seasonal distribution of cadmium, lead, nickel, and magnesium in several tissues of mussels from the Algerian coasts. *Environ. Sci. Pollut. Res*., 27, 22547-22567.

255. Zaghloul, A., Saber, M., Gadow, S., Awad, F.(2020). Biological indicators for pollution detection in terrestrial and aquatic ecosystems. *Bull. Natl. Res. Cent.*, 44, 1-127.

256. Barath Kumar, S., Padhi, R.K., Satpathy, K.K.(2019). Trace metal distribution in crab organs and human health risk assessment on consumption of crabs collected from coastal water of south east coast of India. *Mar.Pollut.Bull.,* 141, 273-282.

257. Genç, T.O., Yilmaz, F. (2017). Metal accumulations in water, sediment, crab (*Callinectes sapidus*) and two fish species (*Mugil cephalus and Anguilla anguilla*) from the köyceğiz lagoon system-turkey: an index analysis approach. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 99, 173-181.

258. Sereshti, H., Entezari Heravi, Y., Samadi, S.(2012). Optimized ultrasound-assisted emulsification microextraction for simultaneous trace multielement determination of heavy metals in real water samples by ICP-OES. *Talanta*, 97, 235-241.

259. Triola,M., Triola,M.(2012). Biostatistique pour les sciences de la vie et de la sante, édition revue et corrigee. Pearson France,France,448 pages.

260. Chibane,H. (2013). Contribution à l'optimisation multi-objectif des paramètres de coupe en usinage et apport de l'analyse vibratoire : application aux matériaux métalliques et composites.Thése de doctorat de l'université de François Rabelais De Tours, France,176 pages.

261. Myers, R.H., Anderson-Cook, C.M., Montgomery, D.C.(2009). Response surface methodology process and product optimization using designed experiments, first ed.Wiley, Hoboken, New Jersey,USA.705 pages.

262. Demim, S., Drouiche, N., Aouabed, A., Semsari, S.(2013). CCD study on the ecophysiological effects of heavy metals on *Lemna gibba*. *Ecol. Eng.,* 57, 302-313.

263. Anderson, M.J., Whitcomb, Patrick J.(2007). DOE simplified: practical tools for effective experimentation. CRC Press, New York.USA., 268 pages.

264. Dodg,Y.(2004). Statistique: Dictionnaire encyclopédique. Springer, Paris, France. 591 pages.

265. Anderson,D.R.,Sweeney, D.J., Camm, J.D., Williams, T.A., Cochran,J.J.(2015). Statistiques pour l'économie et la gestion,De Boeck Supérieur,France,921pages.

266. Stéphane,T.(2012).Data Mining et statistique décisionnelle: L'intelligence des données.Technip, Paris, France. 724 pages.

267. Morgenthaler, S.(2013). Introduction à la statistique. Presses polytechniques et universitaires romandes. France, 362 pages.

268. Demim,S.(2014).Action des ETM sur une plante aquatique,*Lemna gibba*: Physiologie et phytoremediation. Thése de doctorat de l'université de Blida1, Algerie, 136pages.

269. Yetilmezsoy, K., Demirel, S., Vanderbei, R.J.(2009). Response surface modeling of Pb (II) removal from aqueous solution by *Pistacia vera* L.: Box-Behnken experimental design. *J. Hazard. Mater.,* 171, 551-562.

270. Katsnelson, B.A., Minigaliyeva, I.A., Panov, V.G., Privalova, L.I., Varaksin, A.N., Gurvich, V.B., Sutunkova, M.P., Shur, V.Y., Shishkina, E.V., Valamina, I.E., Makeyev, O.H.(2015). Some patterns of metallic nanoparticles combined subchronic toxicity as exemplified by a combination of nickel and manganese oxide nanoparticles. *Food Chem. Toxicol.,* 86, 351-364.

271. Kermet-Said, H., Moulai-Mostefa, N. (2015). Optimization of turbidity and COD removal from pharmaceutical wastewater by electrocoagulation. Isotherm modeling and cost analysis. *Pol. J. Environ. Stud.,* 24, 1049-1061.

272. Rosioru, D.M., Oros, A., Lazar, L.(2016). Assessment of the heavy metals contamination in bivalve *Mytilus galloprovincialis* using accumulation factors . *J. Environ. Prot. Ecol.,*17, 874-884.

273. Jovic, M., Onjia, A., Stankovic, S.(2012). Toxic metal health risk by mussel consumption. *Environ. Chem. Lett.*, 10, 69-77.

274. Jakimska ,A., Krzysztof P.K.S, Namieśnik,J.(2011). Bioaccumulation of metals in tissues of marine animals, part I: the role and impact of heavy metals on organisms. *Pol. J. Environ. Stud*., 20, 1117-1125.

275. Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire(JORADP)., 2011. Arrêté interministériel du 30 Moharram 1432 correspondant au 5 janvier 2011 fixant les seuils limites de présence de contaminants chimiques, microbiologiques et toxicologiques dans les produits de la pêche et de l'aquaculture. Journal officiel de la republique Algerienne 25,23pages.

276. Turkish Food Codex, 2008. Turkish food codex communique on determining the maximum levels of certain contaminants in foodstuffs. In: The Official Gazette, 17, 268-279pages.

277. Freitas, R., Salamanca, L., Velez, C., Wrona, F.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E.(2016). Multiple stressors in estuarine waters: Effects of arsenic and salinity on *Ruditapes philippinarum*. *Sci. Total Environ*., 541, 1106-1114.

278. Abdelfattah, M., Jean-Claude, P.(2007). Le test comportemental de *Dreissena polymorpha*: un outil biologique de prévision et d'évaluation de la toxicité en milieu d'eau douce. *Hydroécol. Appl.,* 5, 97-109.

279. Varaksin, A.N., Panov, V.G., Katsnelson, B.A., Minigalieva, I.A.(2018). Using various nonlinear response surfaces for mathematical description of the type of combined toxicity. *Dose-Response: an Int. J.,*1-10.

280. Rahman, A.S.(2019). Effects of nanofibers on properties of geopolymer composites, in: Pacheco-Torgal, F., Diamanti, M.V., Nazari, A., Granqvist, C.G., Pruna, A., Amirkhanian, S. (Eds.), Nanotechnology in Eco-efficient Construction (Second Edition). Woodhead Publishing, UK.,123-140.

281. Moeller, D.W.(2021). Environmental health, third ed. Harvard University Press, London.UK.,624 pages.

282. Antony, J. (2014). Understanding key interactions in processes, in: Antony, J. (Ed.), Design of experiments for engineers and scientists (2nd Edition). Elsevier, Oxford,UK., 19-32 pages.

283. Hoerl, R.W., Snee, R.D.(2020). Statistical thinking improving business performance.Third ed. CRC. New York,USA., 640 pages.

284. Montgomery, D.C.(2013). Design and analysis of experiments. Eighth ed.Wiley, Hoboken, New Jersey,USA.,757 pages.

285. Marinković,V.(2021). Some Applications of a Novel desirability function in simultaneous optimization of multiple responses, *FME Transactions*,49, 534-548.

286. Zaddem,M.(2014).Application de la méthode des surfaces de réponse pour l'optimisation du blanchiment du son de blé par du peroxyde d'hydrogène et son incorporation dans une farine de pain .Mémoire de l'université de Québec,Canada.110 pages.

287. Ribeyre, F., Boudou, A. (1989). Trophic chains and experimental ecosystems: study of bioaccumulation and transfer processes. Aquatic ecotoxicology: fundamental concepts and methodologies. A. Boudou et F. Ribeyre, CRC Press, Boca Raton, USA., 3-46.

288. Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O.(2015). Metallothioneins and related chelators.RSC publishing,. Cambridge, United Kingdom, 409 pages.

289. Vašák, M.(1991). Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins, *Methods Enzymol.*, 205, 452-458.

290. Komjarova, I., Blust, R.(2009). Multimetal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn uptake from water in the zebrafish *Danio rerio*. *Environ. Sci. Technol*., 43, 7225-7229.

291. Bebianno, M.J., Langston, W.J.(1999). Metallothionein induction in mussels exposed to a metal mixture, in: Klaassen, C.D. (Ed.), Metallothionein IV. Birkhäuser Basel, Basel, 187-194 pages.

292. Kontas, A., Alyuruk, H., Bilgin, M., Uluturhan, E., Ünlüoğlu, A., Darilmaz, E., Altay, O.(2021). Metal bioaccumulation and potential health risk assessment in different tissues of three commercial fish species (*Merluccius merluccius, Mullus barbatus*, and *Pagellus erythrinus*) from Edremit Bay (Aegean Sea), *Turkey. Biol. Trace Elem. Res*., 1,1-13.

293. Rocha, T.L., Gomes, T., Mestre, N.C., Cardoso, C., Bebianno, M.J.(2015). Tissue specific responses to cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis. Aquat. Toxicol.,* 169, 10-18.

294. Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J.(1999). Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. physiol.*, 277, 1612-1619.

295. Mourgaud, Y., Martinez, E., Geffard, A., Andral, B., Stanisiere, J.Y., 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.

296. Mkandawire, E., Mierek-Adamska, A., Stürzenbaum, S.R., Choongo, K., Yabe, J., Mwase, M., Saasa, N., Blindauer, C.A.(2017). Metallothionein from wild populations of the african catfish *Clarias gariepinus*: from sequence, protein expression and metal binding properties to transcriptional biomarker of metal pollution. *Int. J. Mol. Sci.*, 18,1-10.

297. Salvatore, F., Mauceri, A., Giannetto, A., Maisano, M., Bianchi, N., Parrino, V.(2008). Expression of metallothionein mRNAs by *insitu* hybridization in the gills of *Mytilusgalloprovincialis*, from natural polluted environments. *Aquat. toxicol.*, 88, 62-68.

298. Brzóska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J.(2001). Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food and Chem. Toxicol.,* 39, 967-980.

299. Funk, A.E., Day, F.A., Brady, F.O.(1987). Displacement of zinc and copper from copper-induced metallothionein by cadmium and by mercury: In vivo and ex vivo studies. *Comp. Biochem. Physiol. C: Part C: Comp. Pharmacol.,* 86, 1-6.

300. Gundarker, C.(1999). Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the zebra mussel *Dreissenapolymorpha* pallas.*Chemosphere,* 38, 3339-3356.

301. Tao, S., Liang, T., Cao, J., Dawson, R.W., Liu, C.(1999). Synergistic effect of copper and lead uptake by fish. *Ecotoxicol. Environ*. *Saf.,* 44, 190-195.

302. Hemelraad, J., Kleinveld, H.A., de Roos, A.M., Holwerda, D.A., Zandee, D.I.(1987). Cadmium kinetics in freshwater Clams. III. Effects of zinc on uptake and distribution of cadmium in *Anodonta cygnea*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*., 16, 95-101.

303. Benayoun, G., Fowler, S.W. (1974) Experimental studies on cadmium flux through marine biota. ln: IAEA-SM 175/10 (ed) Comparative studies of food and environmental contaminatio., International Atomic Energy Agency, Vienne, Austria.

304. Stewart, A.(2011). Accumulation of Cd by a freshwater mussel (*Pyganodon grandis*) is reduced in the presence of Cu, Zn, Pb, and Ni. Can. *J. Fish. Aquat. Sci.,* 56, 467-478.

305. Dong, X., Shao, H., Liu, N., Chang, J., He, S., Qin, S. (2022). Enhancing polysulfone nanocomposite membrane heavy-metal-removal performance using an amine-functionalized separation layer with 3D nanonetworks,*Chemical Engineering Journal*, 446(4), 137-362.

306. Benfares, R., Seridi, H., Belkacem, Y., Inal, A. (2015) . Heavy Metal Bioaccumulation in brown Algae *Cystoseira compressa* in Algerian Coasts, Mediterranean Sea. *Environmental Processes*, 2,429-439.

307. Bachouche, S., Houma, F., Gomiero , A., Rabah, B.(2017). Distribution and environmental risk assessment of heavy metal in surface sediments and red mullet (*Mullus barbatus*) from Algiers and BouIsmail Bay (Algeria). *Environ. Model. Assess.,*22,473-490.

308. Inal, A., Mostefa, B., Bernard, A., Olivier, R. (2018). Levels and ecological risk assessment of heavy metals in surface sediments of fishing grounds along Algerian coast. *Marine Pollution Bulletin*, 136,322-333.

309. Jitar, O., Teodosiu,C.,Oros,A.,Plavan,G.,Nicoara,M.(2015).Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms from the Romanian sector of the Black Sea.*NewBiotechnology,*32(3),369-378.

310. Gheorghe, S., Stoica, C., Vasile, G.G., Nita-Lazar, M., Stanescu , E., Lucaciu, I.E. (2017). Metals toxic effects, aquatic ecosystems: modulators of water quality, in : Hlanganani, T., IntechOpen (Eds.), water quality, London,UK., 60-89 pages.

311. Huang, H., Li, Y., Zheng, X., Zuanyi, W., Zhenhua, W., Xiaopeng, C. (2022). Nutritional value and bioaccumulation of heavy metals in nine commercial fish species from Dachen Fishing Ground, East China Sea. *Sci Rep.,* 12, 6927.

312. Manduzio, H., Beatrice, R., Durand, FCG., Leboulenger, F. (2005). The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebrate Survival Journal* , 2 , 91-104.

313. Lackner, R. (1998). Oxidative stress in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (eds) Fish Ecotoxicology. EXS, vol 86. Birkhäuser, Basel.

314. Khessiba,A., Hoarau, P., Gnassia-Barelli, M., Aïssa, P., Roméo, M. (2001).Biochemical response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Bizerta (Tunisia) to chemical pollutant exposure. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 40, 222-229.

315. Nogueira, L., Garcia, D., Trevisan, R., Sanches, ALM., da Silva Acosta, D., Dafre, AL., Oliveira, TYK., de Almeida, EA. (2015). Biochemical responses in mussels *Perna perna* exposed to diesel B5. *Chemosphere*, 134, 210-216.

316. Ozkan, D., Dagdeviren, M., Katalay, S., Guner, A., Yavaşoğlu, NÜK. (2017) . Multi-Biomarker responses after exposure to pollution in the mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis L.*) in the Aegean coast of Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* 98, 46-52.

317. Fernández, MD., Babín, M., Tarazona. JV. (2010). Application of bioassays for the ecotoxicity assessment of contaminated soils. *Methods in molecular biology* (*Clifton, N.J.*), 599, 235-262.

318. Denoyelle, M., Geslin, E., Jorissen, FJ., Cazes, L., Galgani, F. (2012). Innovative use of foraminifera in ecotoxicology: A marine chronic bioassay for testing potential toxicity of drilling muds. *Ecological Indicators,* 12,17-25.

319. Ferrari, BJD., Geffard, O., Chaumot, A. (2013). *In Situ* Bioassays in ecotoxicology, in: Férard JF, Blaise C (ed), Encyclopedia of aquatic ecotoxicology. Springer Netherlands, Dordrecht, 635-642 pages.

320. Schmidt, S., Kühnel, D., Kokalj, A.(2019). Toxicity tests and bioassays for aquatic ecotoxicology of engineered nanomaterials. CRC Press, New York,USA., 40 pages.

321. Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguez, L., Pain-Devin, S. (2014). The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environ Sci Pollut Res Environmental Science and Pollution Research.,* 21, 2448-2454.

322. Bland, LM., Watermeyer, KE., Keith, DA., Nicholson, E., Regan, TJ., Shannon, LJ. (2018). Assessing risks to marine ecosystems with indicators, ecosystem models and experts. *Biological Conservation* , 227,19-28.

323. Paul, T., Kumar, S., Shukla, SP., Pal, P., Kumar, K., Poojary, N., Biswal, A., Mishra, A. (2020) . A multi-biomarker approach using integrated biomarker response to assess the effect of pH on triclosan toxicity in *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878).*Environmental Pollution* , 260,1-9.

324. Ferreira, CP., Piazza, TB., Souza, P., Lima, D., Mattos, JJ., Saldaña-Serrano, M., Piazza, RS., Jorge, MB., Bianchini, A., Taniguchi, S., Sasaki, ST., Montone, RC., Bícego, MC., Bainy, ACD., Lüchmann, KH. (2021). Integrated biomarker responses in oysters *Crassostrea gasar* as an approach for assessing aquatic pollution of a Brazilian estuary. *Marine Environmental Research*,165, 105252.

325. Kouali,H., Chaouti, A., Achtak, H., Elkalay,K., Dahbi,A.(2022).Trace metal contents in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Atlantic coastal areas in northwestern Morocco: Levels of contamination and assessment of potential risks to human health.*Marine Pollution Bulletin*, 179, 113-680.

326. Vlachogianni, T., Valavanidis, A.(2007). Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant defence enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Chemistry and Ecology*, 23,361-371.

327. Errahmani, M.B., Zouaoui, F., Bendjoudi, D.J. (2014). Metabolic effects in the bivalve *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis*: Impact on the environment due to contamination by copper. *Journal of Marine Sciences*, 1-10.

328. Goswami, P., Govindasamy, H., Godhantaraman, N., Munuswamy, N. (2014). An integrated use of multiple biomarkers to investigate the individual and combined effect of copper and cadmium on the marine green mussel (*Perna viridis*). *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 49, 1564-1577.

329. Belabed, S., Soltani, N. (2013). Acute toxicity of cadmium on *Donax trunculus*: acetylcholinesterase, glutathione Stransferase activities and pattern of recovery. *Eur J Exp Biol.,* 3, 54-61.

330. Belhaouari, B., Rouane-Hacene, O., Bendaha, M.E.A., Boutiba, Z. (2014). Effects of Metal Sulfates on Catalase and Glutathione-S-transferase of Marine Gastropod: *Osilinus turbinatus*. *J Appl Environ Biol Sci*., 4,1-7.

331. Dodds, WK. (2002). Effects of toxic chemicals and other pollutants on aquatic ecosystems, in: Dodds WK (ed) Freshwater Ecology,1 st ed . Academic Press, San Diego, USA., 267-293 pages.

332. Singh, N., Gupta, VK., Kumar, A., Sharma, B. (2017). Synergistic effects of heavy metals and pesticides in living systems.*Frontiers in Chemistry,*5,1-9.

333. Winston, GW., Di, Giulio, RT. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology,* 19,137-161.

334. St. Dimitrova, M., Tishinova, V., Velcheva, V. (1994). Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* .108, 43-46.

335. Mohan., C.V., Gupta, T.R.C., Shelly, H.P.C., Menon, M. (1986). Combined toxicity of Hg and Cd to the mussel *Perna viridis*. *Diseases of Aquatic Organisms,* 2, 65-72.

336. Yuan, M., Wang, Y., Zhou, B., Jian, X., Dong, W., Tang, X. (2017). An integrated biomarker response index for the mussel *Mytilus edulis* based on laboratory exposure to anthracene and field transplantation experiments.*Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 35,1165-1178.

337. Jamshidnezhad, M. (2015).Experimental design in petroleum reservoir studies. Gulf professional publishing is an imprint of Elsevier, Waltham, USA.,187 pages.

APPENDICE A
VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

1. Une partie des résultats obtenus représentent un travail conséquent d'une valeur scientifique intéressante et publié dans la revue «Environmental Technology & Innovation» de facteur d'impact (IF=5,263). Study of heavy metal bioaccumulation in *Mytilus galloprovincialis* (Lamark 1819) from heavy metal mixtureusing the CCF design.
2. Une réelle importance dans les sciences environnementales basée sur l'exploitation de notre publication:

- Dong, X., Shao, H., Liu, N., Chang, J., He, S., Qin, S. (2022). Enhancing polysulfone nanocomposite membrane heavy-metal-removal performance using an amine-functionalized separation layer with 3D nanonetworks,*Chemical Engineering Journal*, 446(4), 137-362.

- Kouali,H., Chaouti,A., Achtak,H., Elkalay,K., Dahbi,A.(2022).Trace metal contents in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Atlantic coastal areas in northwestern Morocco: Levels of contamination and assessment of potential risks to human health.*Marine Pollution Bulletin*,179, 113680.

- Puccinelli,E., Porri,F., Altieri,K., Flynn,R., Little,H., Louw, T., Pattrick,P., Sparks,C., Tsanwani, M., Waardt,S.,Walker,D.,Fawcett,S.(2022).Coastal ecosystem services in South Africa's largest natural bay: The role of marine benthic filter feeders in mitigating pollution. *Ecological Indicators*, 139, 108899.

AUTRES TRAVAUX SCIENTIFIQUES

Articles scientifiques

- Boudjema, K., Kourdali, S., Bounakous, N., Meknachi, A., Badis, A. (2014). Catalase activity in brown mussels (*Perna perna*) under acute cadmium, lead, and copper exposure and depuration tests. *Journal of Marine Biology*, 2014,1- 9. (Citations:21).

- Boudjema, K., Kourdali, S., Bounakous, N.,Meknachi, A., Badis, A. (2015). Tilising caging techniques to investigate catalase response, accumulated fecal bacteria and heavy metals in*Perna perna* (Linnaeus, 1758) for active biomonitoring coastal waters: A study applied in the bay of Bou-Ismail (Algeria). *Advances in Environmental Biology*, 8(824),215-224.(Citations: 2).

- Boudjema, K., Meknachi, A., Kourdali, S., Bounakous, N., Badis, A. (2016). Effect of sublethal concentrations of heavy metals (cadmium, lead, and copper) on the soluble nitrogen and phosphorus excretion of marine brown mussel (*Perna perna*) (Linnaeus, 1758) (Mollusca; Bivalvia). *Int. J. Fish. Aquat. Stud.,* 4, 455-462.(Citations: 2).

- Kourdali, S.,Boudjema, K.,Meknachi, A., Bounakous, N., Jaouadi, B., Mechri, S., Badis, A. (2022). An ecotoxicological approach for assessing marine pollution: Comparative study of multi-responses of marine mussels, *Mytilus galloprovincialis* and *Perna perna*, exposed to pollutant heavy metals (copper and lead).*Regional Studies in Marine Science*,87-94.(Citation 0).

Communications nationales et internationales

- Kamel Boudjema, Sidali Kourdali, Nabila Bounakous, Abdelmalek Badis, "Catalase activity in marin brown mussels (*Perna perna*) under acute cadmium, lead and copper exposure and depuration test".Conférence nationale sur la pollution et déchets industriels (CNPDI)(Skikda-Algerie), 04-05Juin 2014.

- Kamel Boudjema, Sidali Kourdali, Nabila Bounakous, Abdellah Meknachi, Abdelmalek Badis, "Catalase activity in marin brown mussels (*Perna perna*) under acute cadmium,lead and copper exposure". 1ème Congrès Algérien de caractérisation, propriétés et modélisation de matériaux et des matériaux composites (CACPM3C-1'2015)(Khenchela-Algerie), 19-21Mai 2015.

- Kamel Boudjema, Sidali Kourdali, Nabila Bounakous, Abdellah Meknachi, Abdelmalek Badis, "Tilisingcaging techniques to investigate catalase response, accumulated fecal bacteria and heavy metalsin *Perna perna* (Linnaeus, 1758) for active biomonitoring coastal waters: A study applied in the bay of Bou-Ismail (Algeria)». Conférence nationale sur la science et technologies de l'environnement (CNSTE)(Skikda-Algerie), 03-04Juin 2015.

- Kamel Boudjema,Abdellah Meknachi,Sidali Kourdali, Nabila Bounakous, Nadji Moulai Mostefa, Abdelmalek Badis, "Antioxidant biomarker (Catalase) in brown mussels (*Perna perna*) as tool to assess marin water quality:under acute exposure and *insitu*".4ème Congrès international de physiologie et biosurveillance de l'environnement (ATP-BE) (Tabarka-Tunisie), 20-23 Décembre 2015.

- Kamel Boudjema, Sidali Kourdali, Abdelmalek Badis, "Effect of sublethal concentrations of cadmium and lead on ammonia-N excretion and catalase activity in marin brown mussels (*Perna perna*)".Conférence nationale sur la pollution de la mer Méditerranée, Quelles Solution ?(CNPMM)(Skikda-Algerie), 01-02 Juin 2016.

APPENDICE B
MÉTHODES D'ANALYSES

B.1. Analyse des métaux traces par spectrophotométrie d'absorption atomique

B.1.1. Principe de la méthode

Les méthodes quantitatives d'absorption atomique sont basées sur les mêmes principes que celles de l'absorption moléculaire quantitative. La technique repose sur l'interaction entre les radiations émises par une lampe cathodique à une longueur d'onde spécifique et le produit d'atomisation du minéralisât de l'échantillon.

En effet, ce dernier, lorsqu'il est porté à une température d'atomisation très élevée par un atomiseur électrothermique (four en graphite : 1200-3000 °C) ou un atomiseur de flamme (1700-3150 °C), est converti en vapeur atomique excité. Ceux-ci absorbent spécifiquement le rayonnement émis par la lampe, ce qui permet ainsi le dosage de l'élément en question [95,210,216].

La sensibilité de la spectroscopie atomique couvre un domaine qui s'étend du ppm (mg. L^{-1}) au ppb (µg. L^{-1}) selon la méthode d'atomisation (flamme ou électrothermique). L'utilisation de l'une ou l'autre des sources d'atomisation dépend de la concentration de l'élément à doser dans l'échantillon.

En effet, la spectroscopie d'absorption atomique, SAA sera appliquée aux éléments présents dans l'échantillon de moule en concentration élevées (Zn dans notre cas) par contre, la spectroscopie d'absorption atomique électrothermique, SAAE sera appliquée au cadmium (Cd) et cuivre (Cu) (Figure A.B.1.)[95,210,216].

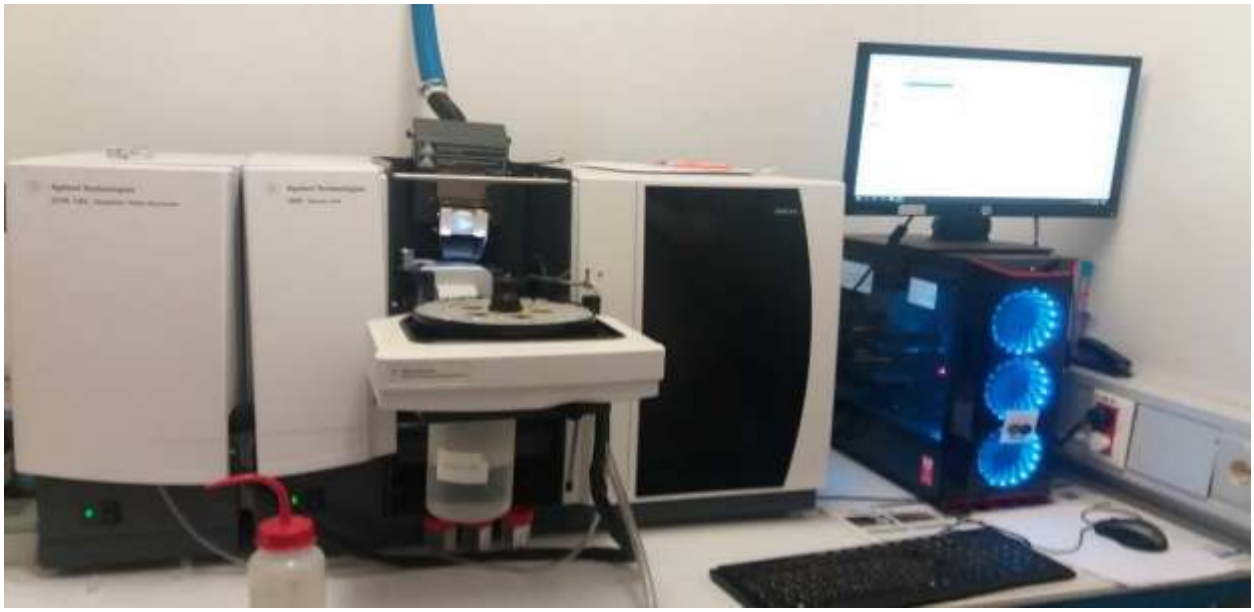


Figure A.B.1.SAA-Agilent (modèle AA 240Z) (Photo originale).

B.2. Dosage des protéines

B.2.1. Principe de la méthode

La méthode développée par Lowry et al. [222] combine une réaction au biuret et une réaction d'oxydo-réduction au réactif de Folin-Ciocalteu en milieu alcalin. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret. Cette méthode a l'avantage d'être très sensibles. Elle est utilisée quand les quantités de protéines dans l'échantillon sont très faibles [223].

B.2.2. Mode opératoire

Dans des tubes à fond conique en polypropylène, les prises d'échantillons de la fraction S_9 (surnageant) sont diluées au 1/5-1/8 et 1/10 et complétées à 1 mL avec l'eau distillée. Le tube de blanc contient 01 mL d'eau distillée.

05 mL de réactif Lowry (Carbonate de sodium (2 %, m/v) préparé dans la soude 0,1N et Sulfate de cuivre (0,5 %, m/v) préparé dans (1 %, m/v) tartrate double de sodium et de potassium) sont ajoutés à chaque tube. On homogénéise par vortex et on attend 10 min.

Par la suite, 0,5 ml de réactif Folin et Ciocalteu's Phenol (Sigma Aldrich, CAS : 47641) dilué extemporanément au ½ est additionné au mélange (il est important d'agiter par vortex juste après l'addition de ce dernier). L'ensemble est mis au repos à l'obscurité au moins 30 min. Ainsi la lecture de l'absorbance est faite à 660 nm.

La gamme d'étalonnage est réalisée à partir de la solution de sérum albumine bovine (SAB) (Sigma Aldrich, CAS : 9048-46-8) à 500 $\mu g.mL^{-1}$.

B.3. Dosage des biomarqueurs

B.3.1. Activité enzymatique

L'activité enzymatique est une mesure de la quantité d'enzyme active dans une préparation. Elle correspond à une vitesse réactionnelle, c'est-à-dire, à une quantité de substrat consommé ou de produit formé pendant un temps défini. Elle se détermine par la mesure d'une vitesse réactionnelle. Celle-ci correspond à la vitesse d'un signal analytique par unité de temps qui, en enzymologie, est le plus souvent celle d'une absorbance ($\Delta Abs.min^{-1}$), correspond soit à la disparition d'un substrat, soit à l'apparition d'un produit de réaction. Ainsi de façon classique, le calcul d'une concentration d'activité enzymatique utilise la loi de Beer-Lamber est nécessaire de connaitre le coefficient d'extinction molaire (ε) du constituant mesuré (substrat, ou le plus souvent produit de réaction). Il est basé sur la définition de l'unité internationale d'activité enzymatique (U) qui correspondant au nombre de micromole de substrat dégradé par minute ou autrement dit correspondant à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute dans les conditions opératoires définies et la concentration d'enzyme contenue dans un spécimen biologique (concentration catalytique) [224,225].

L'approche cinétique enzymatique consiste à suivre en continu l'évolution dans le temps. La méthode typique consiste donc à mélanger les réactifs (tampon, substrat…etc.) et la préparation enzymatique dans une cuvette de spectrophotomètres UV-VIS (Jenway 6705)puis à suivre la variation temporelle du paramètre mesuré (Absorbance) [143,151,220].

B.3.1.1. Dosage de l'activité catalase

B.3.1.1.1. Principe de la méthode

La catalase est une enzyme qui intervient dans la défense de la cellule contre le stress oxydatif en éliminant les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique pour la cellule en eau et en oxygène [43,148, 226]. La technique utilisée est celle décrite par Claiborne[143]. Elle consiste à suivre la disparition de l'eau oxygénée par action de la catalase selon la réaction suivante :

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} H_2O + \frac{1}{2}O_2 \quad \text{(B.1)}$$

B.3.1.1.2. Suivi de l'activité enzymatique

Dans une cuve en quartz on introduit dans l'ordre 750 µL de tampon phosphate (100 Mm, pH 7,4, à 25°C), 200 µL H_2O_2 (500 mM ; 34,5-36,5 % ; Sigma Aldrich, CAS : 7722-84-1), et

enfin 50 µL de l'extrait brut contenant l'enzyme (S_9). On suit la diminution de la densité optique pendant 120 secondes à un intervalle de 10 secondes à une longueur d'onde 240 nm.L'activité spécifique de la catalase est exprimée en µmole. min^{-1}. mg^{-1} de protéines ou U. mg^{-1} de protéines.

B. 3.1.2. Dosage de l'activité glutathion S-transférase

B. 3.1.2.1. Principe de la méthode

L'activité de la Glutathion *S*-transférases (GST) est déterminée par la technique spectrophotométrique d'Habig et al. [151] en utilisant le dichloronitrobenzène (DCNB) comme substrat. Le principe du dosage est basé sur la mesure de la cinétique d'apparition du complexe Glutathione-Dinitrobenzene (GS-DNB) formé lors de la conjugaison du substrat 1-chloro 2,4-dinitrobenzène (CDNB) avec le glutathion réduit (GSH) utilisé comme cofacteur selon la réaction suivante [151,227,228] :

$$\mathrm{CDNB} + \mathrm{GSH} \xrightarrow{\mathrm{GST}} \mathrm{GS-DNB} + \mathrm{HCl} \quad \text{(B.2)}$$

B. 3.1.2.2. Suivi de l'activité enzymatique

Dans les cuves, on introduit dans l'ordre : 850 µL du tampon phosphate (100 Mm, pH 7,4, à 25°C) ; 50 µL (50 mM) de la solution de 1-chloro-2,4-dinitrobenzéne (CDNB, Sigma Aldrich, CAS : 138630), 50 µL de l'extrait brut contenant l'enzyme (S_9) et enfin 50 µL (100 mM) de glutathion réduit (GSH, Sigma Aldrich, CAS 70-18-8) pour déclencher la réaction. La variation de la densité optique est suivie pendant 5 minutes à un intervalle de 1 minutes contre une solution ne contenant pas l'échantillon à doser (blanc) à une longueur d'onde 340 nm.L'activité spécifique de la GST est exprimée en nmole. min^{-1}. mg^{-1} de protéines.

B.3.2. Dosage du malonedialdéhyde

B.3.2.1. Principe de la méthode

Le malondialdéhyde (MDA) est dosé selon la méthode de Uchiyama and Mihara [229] basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et certains composés résultant de la peroxydation lipidique, comme le malondialdéhyde (MDA) dans un milieu acide et à chaud, donnant un produit coloré (rose) (Figure II.7) extractible par les solvants organiques comme le butanol,dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 532 nm.

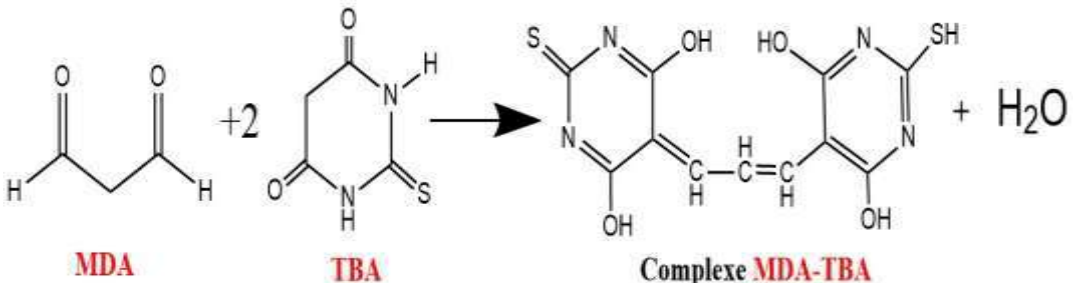


Figure A.B.3. Formation du complexe coloré Malondialdéhyde (MDA) -Acide thiobarbiturique (TBA).

B.3.2.2. Mode opératoire

Dans un tube à essai, on introduit 3 ml de la solution d'acidephosphorique (H_3PO_4, 1%), 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA, 0,6%) ; et 0,5 ml de l'échantillon à étudier (S_9), le mélange a été mélangé ensuite incubé pendant 45 minutes à 100 °C et refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation (3000 $tr.min^{-1}$; 5 min), l'absorbance est déterminée sur le surnageant au moyen de spectrophotomètres UV-VIS (Jenway 6705) à 535 nm et 520 nm. La différence d'absorbance est utilisée pour la quantification du contenu en malondialdéhyde.

La concentration de MDA est déduite à partir d'une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec 1,1, 3,3-tétraétoxypropane (TEP, Sigma Aldrich, CAS : 122-31-6) qui donne le MDA après son hydrolyse en solution.

Pour quantifier le contenu en malondialdéhyde, on extrapole les valeurs obtenues à partir des échantillons étudiés sur la courbe de référence du TEP. La quantité de MDA exprimée en nmole. mg^{-1}de protéine .

APPENDICE C
TABLE DE LA LOI DE FISHER-SNEDECOR

Table de la loi de Fisher-Snedecor(modéfie d'aprés Jamshidnezhad, M. (2015))[337].

La table de la loi de Fisher-snedecor(5%) donnant la limite supérieure deF pour le risqueα = 0,05, en fonction des ddl_x(numérateur) et ddl_r(dé-numérateur), placés respectivementen ligne et colonne. Pour ddl_x (ligne) =9 et ddl_r (colonne) = 7, le seuil supérieur de$F_{0.05,\,7,\,9}$=3,29.

ddl_r \ ddl_x	1	2	3	4	5	6	**7**	8	9	∞
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234	236,8	238,9	240,5	254,3
2	18,51	19	19,16	19,25	19,3	19,33	19,35	19,37	19,38	19,5
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,53
4	7,71	9,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,1	3,67

7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,5	3,44	3,39	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	**3,29**	3,23	3,18	2,71
10	4,96	4,1	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,2	3,09	3,01	2,95	2,9	2,4
12	4,57	3,89	3,49	3,26	3,11	3	2,91	2,85	2,8	2,3
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,21
14	4,6	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,7	2,65	2,13
15	4,54	3,86	3,29	3,06	2,9	2,79	2,71	2,64	2,59	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,01
17	4,54	3,59	3,2	2,96	2,81	2,7	2,61	2,55	2,49	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	1,92
∞	3,84	3	2,6	2,37	2,21	2,1	2,01	1,94	1,88	1