

Seasonal variations of oxidative stress biomarkers in *Z. ophiocephalus* and *G. niger* in an unpolluted site on the north-eastern coast of Tunisia

Variations saisonnières de biomarqueurs du stress oxydant chez *Z. ophiocephalus* et *G. niger* dans un site salubre de la côte Nord-est de Tunisie

I. LOUIZ^{1,2*}, M. BEN-ATTIA¹, W. GADDACHA¹, O. PALLUEL³, S. AÏT-AÏSSA³, O. K. Ben HASSINE²

¹ University of Carthage, Sciences Faculty of Bizerte, Environment Biomonitoring Laboratory (LR01 / ES14), 7021 Zarzouna, Tunisia.

² University of Tunis-El-Manar, Faculty of Sciences of Tunis, Research Unit for Integrative Biology and Evolutionary and Functional Ecology of Aquatic Environments (UR11ES08), 2092 El Manar, Tunisia.

³ National Institute for the Industrial Environment and Risks (INERIS), In Vitro and In Vivo Ecotoxicology Unit, f-60550 Verneuil-en-Halatte, France.

*Corresponding author: louiz.ibtissem@gmail.com

Abstract – This study assessed seasonal variations of two oxidative stress biomarkers, i.e. total glutathione (GSH_{tot}) and lipoperoxidation level, in two fish species, *G. niger* and *Z. ophiocephalus*, during a one year-survey in the low contaminated Ghar-El-Melh lagoon located on northeastern coast of Tunisia. In parallel, changes in physical and chemical parameters of water and climate were recorded. Significant annual rhythms of GSH_{tot} and lipoperoxydation were validated by cosinor analysis. In both fish species the highest peak of GSH_{tot} activity occurred in summer and was likely related to the elevated seawater temperature and higher photoperiod. while it was negatively correlated with dissolved oxygen content. In addition, maximum values of lipid peroxidation were observed during the spring and were negatively correlated with salinity. Midline Estimating Statistic of Rhythm (mesor) and amplitudes of the two biomarkers was higher in *Z. ophiocephalus* than in *G. niger*.

This study established an annual baseline for the selected oxidative stress biomarkers in gobies which is a required information for a correct interpretation of biomarker responses in environmental monitoring.

Keywords: Annual rhythm - total glutathione - lipoperoxidation - environmental factors - *Gobiidea* - unpolluted site.

Résumé - La réponse de deux biomarqueurs de stress oxydant, le glutathion total (GSH_{tot}) et le taux de lipoperoxydation ont été suivis mensuellement durant une année chez deux espèces de gobies, *Gobius niger* et *Zosterisessor ophiocephalus*, originaires d'un site laguno-marin relativement salubre, situé sur la côte nord-est de la Tunisie. Parallèlement à ce suivi, les variations des paramètres climatiques et physico-chimiques de l'eau ont été analysées afin de déterminer leur influence sur les fluctuations des deux biomarqueurs considérés.

Les résultats de la présente étude, ont montré une forte variabilité des biomarqueurs du stress oxydant au cours du temps concomitamment à une corrélation significative avec les paramètres physico-chimiques du milieu. En effet, une induction estivale du GSH_{tot}, corrélée positivement à la température et la photopériode et négativement à la teneur en oxygène dissous, a été mise en évidence chez les deux espèces de gobies. Par ailleurs, les valeurs maximales de la peroxydation lipidique ont été observées pendant le printemps et étaient corrélées négativement à la salinité. L'amplitude et le niveau moyen du rythme (Mésor) étaient cependant plus importants chez *Z. ophiocephalus*.

L'ensemble des résultats obtenus montre que la variation diffère selon le biomarqueur de stress oxydant et l'espèce de gobie considérés.

Mots clés : Rythme annuel - glutathion totale- lipoperoxydation - facteurs environnementaux – *Gobiidea* - site non pollué.



1. Introduction

De nombreux xénobiotiques sont capables de générer de manière directe (p. ex. composés redox) ou indirecte (p. ex. via le métabolisme oxydatif) des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui vont perturber le statut redox de la cellule en faveur des conditions oxydantes. Lorsque les systèmes antioxydants de défense sont dépassés, on parle alors de stress oxydant qui peut conduire à une altération irréversible des dommages des macromolécules de structure comme les membranes lipidiques, l'ADN ou les protéines (Eisenbrand et al. 2002, Viarengo et al. 1990, De Oliveira et al. 2005).

Au niveau cellulaire, une conséquence du métabolisme de nombreux xénobiotiques est la formation « d'espèces réactives d'oxygène » (ERO) (Sies 1991 ; Halliwell 2006, Lemaire et al. 1993 ; Cossu et al. 1997 ; Lagadic et al. 1997). Pour neutraliser ces ERO, les organismes possèdent un système de défense antioxydant de composants enzymatiques et non enzymatiques (Nordberg et Arner 2001 ; Pandey et al. 2003). De ce fait, l'induction d'enzymes antioxydantes, la modification oxydante des protéines et l'augmentation de la peroxydation lipidique constituent des marqueurs biochimiques du stress oxydant. Chez le poisson, la réponse des biomarqueurs de stress oxydant, suite à une exposition à une diversité de xénobiotiques organiques et inorganiques, a été démontrée dans de nombreuses études au laboratoire (Sanchez et al. 2005 ; Smith et al. 2007 ; Ahmed et al. 2000), suggérant leur intérêt pour détecter l'exposition aux contaminants chimiques sur des organismes sauvages prélevés dans le milieu.

Dans cette perspective, l'analyse des biomarqueurs de stress oxydant devient très pertinente dans les études de biosurveillance, eut égard à leur capacité d'informer sur une réponse adaptative à un stress, telle qu'une pression toxique, ou encore comme un signal d'alerte d'apparition ultérieure de dommages irréversibles si les capacités de défense sont dépassées. Toutefois, le stress chimique n'est pas l'unique cause de modifications biologiques chez un organisme vivant. En effet, différents facteurs biotiques et abiotiques, comme les fluctuations des paramètres physicochimiques de l'environnement, la disponibilité de la nourriture, l'état physiologique de l'organisme, etc. occasionnent des réponses biologiques d'adaptation et pourront potentiellement influencer sur la variabilité naturelle des biomarqueurs de stress oxydant (Pascual et al., 2003 ; Alonso-Alvarez et al. 2004 ; Lushchak et Bagnyukova 2006a ; 2006b). Toutefois, peu d'études font état de la caractérisation de la variabilité naturelle des biomarqueurs du stress oxydant chez les organismes aquatiques, utilisés comme modèles dans des études d'écotoxicologie in situ. Dans une majorité des cas, les travaux publiés portent sur la comparaison de résultats isolés dans le temps et l'espace, sans réellement intégrer la variabilité naturelle du paramètre suivi et ainsi la distinguer des variations attribuables à l'exposition aux contaminants. La mise en œuvre de ces biomarqueurs nécessite donc, au préalable, la connaissance, dans un milieu faiblement pollué, de leurs variations annuelles sous l'effet des fluctuations des facteurs naturels du milieu et de l'organisme. Dans cette étude, nous avons choisi comme biomarqueurs de stress oxydant le glutathion total (GSH_{tot}) et la peroxydation lipidique (POL). Le GSH est un antioxydant non enzymatique qui joue un rôle central dans le maintien de l'équilibre redox intracellulaire, agissant comme chélateur d'espèce réactive et comme cofacteur de systèmes enzymatiques (GST, GPX, GR) de défenses antioxydantes. La peroxydation lipidique est une réaction radicalaire en chaîne qui peut provoquer une altération structurale et fonctionnelle des membranes (Kappus 1987 ; Lagbouri 1997). Les lipopéroxydes sont mesurés grâce au dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Ce paramètre apparaît comme un biomarqueur très intéressant qui permet d'évaluer la conséquence d'un stress oxydant sur les structures lipidiques d'un organisme lorsque les systèmes antioxydants sont dépassés (Oakes et Van Der Kraak 2003). Ces deux biomarqueurs sont complémentaires et fournissent des informations importantes quant à l'exposition des organismes à des polluants inducteurs de stress oxydant et à leur capacité à se défendre et à se protéger vis-à-vis de ce dernier.

Les gobiidés présentent un intérêt écotoxicologique certain et ils ont été utilisés auparavant comme des bioindicateurs de la qualité du milieu, incluant des mesures de biomarqueurs biochimiques (Corsi et al. 2003a , 2003b ; Kwon et al. 2006 ; Ramsak et al. 2007 ; Bahroumi et al. 2014 ; Louiz et al. 2016). Pour ces raisons, nous les avons utilisés comme modèle biologique dans notre étude.,

A ce jour, peu d'études se sont intéressées aux variations saisonnières des biomarqueurs chez les poissons Gobiidés (Solè et al. 2006 ; Louiz et al. 2016). Il nous a donc semblé intéressant de considérer les fluctuations naturelles de la GSH_{tot} et du TBARS chez deux espèces de gobies *Zosterisessor ophiocephalus* (Pallas 1811) et *Gobius niger* (Linnaeus 1758) dans une station située au niveau d'un site laguno-marin qui ne présente aucune source de contamination chimique évidente (Mahmoudi 2003 ; Louiz et al. 2008).

L'objectif de cette étude est d'examiner l'impact des fluctuations des facteurs physicochimiques sur les variations de ces deux biomarqueurs afin de préciser les conditions de leur utilisation comme outils d'évaluation de la qualité de l'eau dans les programmes de biosurveillance du milieu aquatique.

2. Matériels et méthodes

2.1. Échantillonnage

Les gobies ont été collectés mensuellement d'août 2005 à juillet 2006 dans une station située au niveau de la passe de communication de la lagune de Ghar El Melh avec la mer (Figure 1).

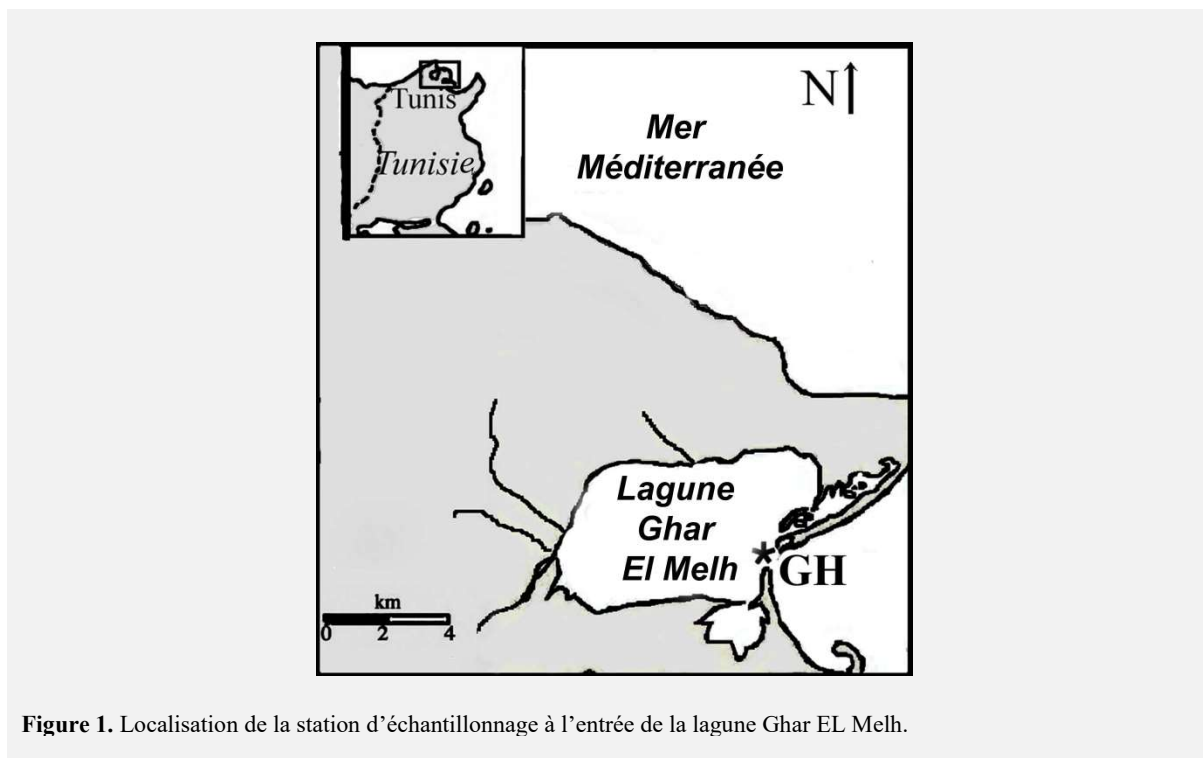


Figure 1. Localisation de la station d'échantillonnage à l'entrée de la lagune Ghar EL Melh.

Le matériel biologique a été récolté au moyen d'un petit chalut benthique, le nombre d'individus collecté est représenté dans le tableau 1. Les poissons ont été prélevés au hasard avec la précaution toutefois d'utiliser des tailles très proches (77 à 85 mm pour *G. niger* et 84 à 108 mm pour *Z. ophiocephalus*) afin d'éviter une variation individuelle liée à l'âge. Les poissons ont été euthanasiés par commotion cérébrale. La longueur totale (Lt), la longueur standard (LS), le poids total (Pt), le poids éviscéré (Pe) et le poids du foie (Pf) ont été relevés. Le foie et un fragment du muscle ont été prélevés, pesés et conservés à -80 °C en vue des dosages biochimiques ultérieurs.

Tableau 1. Nombre d'individus examinés

Mois	Août	Sep	Oct	Nov	Déc	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Jui	Juil
<i>G. niger</i>												
(M ; F)	(17 ;5)	(17 ;8)	(19 ;8)	(19 ;7)	(13 ;5)	(12 ;3)	(19 ;9)	(17 ;5)	(23 ;3)	(34 ;5)	(30 ;6)	(21 ;3)
Total	22	25	27	26	18	25	28	22	26	39	36	24
<i>Z. ophiocephalus</i>												
(M ; F)	(3 ;3)	(3 ;3)	(7 ;3)	(10 ;3)	(3 ;9)	(3 ;3)	(4 ;2)	(4 ;3)	(4 ;5)	(2 ;3)	(7 ;4)	(3 ;4)
Total	6	6	10	13	12	6	6	7	9	5	11	7

Au moment de la capture des poissons, les valeurs des principaux paramètres physico-chimiques de l'eau ont été relevées à une profondeur de la colonne d'eau de 20 cm. La température et la salinité ont été mesurées à l'aide d'un conductimètre de type Cond 315i/SET, WTW. De même, le potentiel hydrogène a été évalué à l'aide d'un pH-mètre de type pH 315i/SET, WTW. La teneur en oxygène dissous a été appréciée à l'aide d'un oxymétrie de type Oxi 315i/SET, WTW. Les données

climatologiques (pluviométrie et ensoleillement) ont été fournies par l'Institut National de la Météorologie (INM).

2.2. Préparation des échantillons et techniques d'analyse

Après décongélation, les tissus, maintenus à 4°C pendant toute la durée de dosage, sont broyés à l'ultra-turrax dans un tampon phosphate (PBS, pH = 7,8, supplémenté en glycérol 20 % et 0,2 mM de PMSF) ; l'homogénat obtenu est centrifugé à 10000 × g pendant 15 min. Le surnageant, qui représente la fraction post-mitochondriale (S₉), est récupéré dans des mini-tubes pour le dosage des biomarqueurs. Tous les dosages biochimiques ont été réalisés en triplicatas à température ambiante sur microplaque comme décrit précédemment (Aït-Aïssa et al. 2003) et la lecture a été effectuée en utilisant un spectrophotomètre de microplaque (Power Wave X, Bio-tek). La teneur en protéines totales est déterminée par la méthode colorimétrique de Bradford (1976). Le GSH_{tot} a été dosé dans le foie selon la méthode colorimétrique de Vandeputte et al. (1994). La peroxydation lipidique a été estimée par la formation de TBARS. Ce biomarqueur a été mesuré dans le muscle selon la méthode développée par Ohkawa et al. (1979).

2.3. Traitement statistique des données

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPAW 18. La normalité de la distribution a été vérifiée à l'aide du test de Kolmogorov-Smirnov. L'homogénéité des variances, au risque $\alpha = 5\%$, a été validée par le test de Levene. Le test *t* de Student a été utilisé pour comparer la réponse des biomarqueurs aussi bien chez les mâles que chez les femelles pendant chaque mois. L'analyse de variance (ANOVA) à un facteur a permis de vérifier si les variations des biomarqueurs dans l'échelle du temps présentent des différences significatives. Les séries temporelles ont été analysées par la méthode de chronogramme puis modélisées par cosinor. Les paramètres estimés à partir de la fonction cosinus sont: le Mésor (niveau moyen ajusté du rythme), l'amplitude (différence entre le Mésor et le pic ou creux de la sinussoïde) et l'acrophase (localisation du sommet du rythme ou temps du pic ayant pour référence temporelle le mois de janvier pour un rythme circannuel). La différence est considérée comme significative lorsque $p < 0,05$. Enfin, les corrélations entre les paramètres abiotiques et les valeurs mensuelles des biomarqueurs sont établies après calcul du coefficient de corrélation de Bravais-Pearson.

3. Résultats et Discussion

3.1. Paramètres physico-chimiques

Les valeurs mensuelles de la température des eaux montrent une variation temporelle allant de 14°C à 28°C, avec une valeur maximale pendant le mois d'août et une valeur minimale pendant le mois de janvier (Tab. 2). Les valeurs du pH demeurent relativement stables pendant la période d'étude avec une moyenne de l'ordre de 8,12. En revanche, les teneurs en oxygène dissous oscillent entre un minimum de 5,5 mg L⁻¹ en juin et un maximum de 9,5 mg L⁻¹ en janvier. La salinité varie de 35,6‰ à 37,5‰ avec des maxima pendant la période estivale et des minima hivernaux (Tab. 2).

Tableau 2. Fluctuations mensuelles des paramètres environnementaux. La température, le pH, l'oxygène dissous et la salinité mesurés au niveau du site laguno-marin de Ghar el Melh, d'août 2005 à juillet 2006

	Août	Sep	Oct	Nov	Déc	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Jui	Juil
T°C	28,0	26,0	24,7	23,0	14,5	14,0	14,8	20,0	22,5	23,5	25,0	27,0
PH	8,1	8,0	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1	8,3	8,3	8,2	8,0	8,2
Salinité (‰)	37,5	37,3	37,0	37,3	36,0	35,6	35,9	36,5	37,1	37,2	36,5	37,2
O ₂ (mg/ml)	5,0	10,0	7,9	7,9	8,0	7,0	9,5	7,9	10,3	8,7	7,0	6,0
Pluviométrie (mm ³)	1,6	12,1	15,8	107,4	86,7	192,4	82,9	44,7	9,0	28,2	7,1	3,6
Photopériode (h)	13,3	12,2	11,1	10,2	9,7	10	10,8	11,9	12,9	13,8	14,3	14,1

Il est bien connue que les paramètres physico-chimiques du milieu sont des facteurs limitants et très contraignants, notamment en milieu lagunaire. C'est le cas pour notre site d'échantillonnage et de prélèvements, situé à l'entrée de la lagune de Ghar El Melh qui constitue un milieu fluctuant, en raison de sa faible profondeur (Hammami et al. 2013). Ainsi, dans ce site, la teneur des eaux en oxygène dissous est corrélée négativement et significativement avec la température. De même, la salinité est corrélée

positivement avec la température. Dans ce cas, il n'est pas étonnant que ces facteurs aient une influence sur les biomarqueurs de stress oxydant.

3.2. Réponse des biomarqueurs

La réponse des biomarqueurs de stress oxydant a été analysée chez des poissons de tailles très proches et qui, de plus, appartiennent à deux espèces chez lesquelles le sexe ne semble pas avoir un effet significatif sur la réponse de ces biomarqueurs (Test de Student ; $p > 0,05$) pendant chaque mois. Un regroupement des deux sexes a donc été réalisé dans la suite des analyses.

Il est bien connu que de nombreux facteurs biotiques et abiotiques, incluant l'espèce, le sexe, l'âge des individus, la température de l'eau et la biodisponibilité de la nourriture, peuvent influencer les états physiologiques des organismes et la réponse des biomarqueurs biochimiques (Martinez-Alvarez et al. 2005 ; Whyte et al. 2000 ; Flammarión 1997). S'ils ne sont pas pris en compte dans l'évaluation, ces facteurs peuvent biaiser l'interprétation de la réponse des biomarqueurs à la pollution chimique. Dans notre cas, les variations observées ne pourraient donc être expliquées que par les fluctuations des paramètres environnementaux qui ont un impact sur la physiologie des poissons.

3.2.1. Variation saisonnière du glutathion totae

Le suivi mensuel du GSH_{tot} chez *G. niger* et *Z. ophiocephalus* au cours d'une année et la modélisation par cosinor révèlent que la variation annuelle suit un rythme dont le pic (acrophase) est situé pendant les mois de mai et juin respectivement (fin de la saison printanière). Les valeurs du moyen mésor (M) et de l'amplitude (A) du GSH_{tot} chez *G. niger* (M= 4,49 ; A= 2,05) sont plus faibles que celles chez *Z. ophiocephalus* (M=8,81; A= 4,9) (Fig. 2 ; Tab. 3).

Tableau 3 : Paramètres du rythme annuel des biomarqueurs de stress oxydant chez *G. niger* et *Z. ophiocephalus* originaires du site laguno-marin de de Ghar el Melh. Résultats obtenus par analyse de cosinor.

Variable	Mésor ^a ± SEM	Amplitude ± SEM	Acrophase (Ø) ^b ± SEM [CI ₉₅]	PR ^c	P-value ^d
<i>G. niger</i>					
GSH	4.49 ± 1.66	2.05 ± 1.62	28 mai ± 44 jours [07 mars ; 18 août]	9.52	< 0.05
TBARS	196 ± 15.10	86.30 ± 25.70	02 mars ± 10 jours [27 janv ; 05 avril]	44.41	< 0.0001
<i>Z. ophiocephalus</i>					
GSH	8.81 ± 0.51	4.90 ± 0.73	22 juin ± 9 jours [04 juin ; 11 juillet]	40.92	< 0.0001
TBARS	286 ± 12	170 ± 17.50	07 avril ± 6 jours [25 mars ; 18 avril]	59.41	< 0.0001

^a Mésor : niveau moyen ajusté du rythme pour une période de 12 mois.

^b Ø : Localisation temporelle du sommet du rythme est représentée par le jour et le mois dans l'année.

^c : Pourcentage du rythme ; où la proportion de la variance globale expliquée par l'approximation de la courbe cosinus de 365 jours.

^d : obtenue par le test F du rejet de l'hypothèse de l'amplitude nulle.

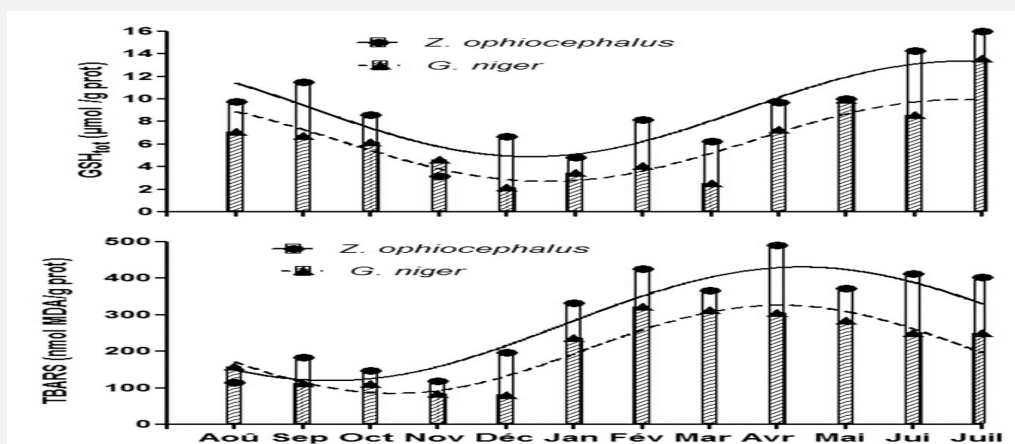


Figure 2. Chronogramme représentant la variation temporelle du GSH_{tot} et du TBARS chez *G. niger* et *Z. ophiocephalus* au niveau du site d'étude. Le rythme annuel est validé par le test d'ANOVA et par cosinor ($p < 0.05$).

L'étude des coefficients de corrélation entre le GSH_{tot} et les facteurs abiotiques a montré des corrélations avec certains paramètres. Ainsi, la température et la photopériode sont corrélées positivement ($p < 0,001$) avec ce biomarqueur chez *G. niger* et *Z. ophiocephalus*. La réponse de ce biomarqueur semble aussi modulée par le taux d'oxygène dissous. En effet, une corrélation négative a été mise en évidence chez les deux espèces de gobies (Tableau 4).

Tableau 4 : Corrélations entre les paramètres environnementaux log (GSH_{tot}+1), d'une part et log (TBARS+1), d'autre part chez *G. niger* ; et *Z. ophiocephalus*. r = Coefficient de corrélation de Pearson. **: ($p < 0,01$) ; * : ($p < 0,05$). Sig : degré de signification

		T (°C)	pH	Sal (‰)	Phot	Oxyg (mg/l)
<i>G. niger</i>	GSH _{tot}	R	0.378**	0.023	0.083	0.422**
		Sig.	0.000	0.738	0.221	0.000
	TBARS	R	-0.002	-0.143*	-0.397**	0.424**
		Sig.	0.978	0.040	0.000	0.000
<i>Z. ophiocephalus</i>	GSH _{tot}	R	0.562**	-0.174	-0.018	0.566**
		Sig.	0.000	0.179	0.888	0.000
	TBARS	R	-0.138	0.045	-0.316*	0.476**
		Sig.	0.336	0.752	0.024	0.000

L'impact de l'augmentation de la température sur les biomarqueurs de stress oxydant a déjà été rapporté par différents auteurs. En effet, la variation de ces biomarqueurs est vraisemblablement liée au changement du statut métabolique des individus qui dépend, à son tour, de plusieurs facteurs tels que la température, la disponibilité de la nourriture, la longueur de la photopériode (Regoli 1998 ; Khessiba et al. 2005 ; Leiniö et al. 2005). Généralement, les organismes thermo-dépendants comme les poissons sont particulièrement soumis à des variations métaboliques associées à une production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). En effet, le changement de la température ambiante de l'eau peut induire une production des ERO dans les tissus de certains organismes marins (Abel et Puntarulo 2004 ; Lushchak et Bagnyukova 2006 a , 2006 b). Selon Madeira et al., (2015) les biomarqueurs de stress oxydant sont souvent corrélé positivement aux biomarqueurs de stress thermique (Hsp70) chez plusieurs espèces de poissons. Ainsi, la production des ERO et l'activation des enzymes antioxydantes doivent théoriquement augmenter lorsque la température augmente. L'élévation de la température et l'irradiation de la lumière peuvent être considérées comme facteurs pro-oxydants naturels pendant les mois d'été. En effet, l'augmentation de la température de la lagune est un facteur additionnel qui, directement ou indirectement, peut affecter le métabolisme des radicaux oxygénés des organismes. Elle occasionne une augmentation de l'activité métabolique et de la consommation d'oxygène (Storey 1996), en plus d'une

induction spécifique du système producteur des ERO comme les cytochromes P450 par exemple. En outre, on pourrait également envisager que de faibles niveaux d'oxygène dissous, qui causent parfois des conditions anoxiques dans ce plan d'eau peu profond (Moussa et al. 2005), réduisent, par conséquent, la possibilité de formation des ERO au cours des périodes chaudes (Cooper et al. 2002 ; Lushchak et al. 2005 ; Lushchak et al. 2001 ; Storey 1996). Selon Lushchak et al. (2007) l'hypoxie induit un stress oxydant dans les tissus du gobie *Percottus glenii*, ce qui est en accord avec nos résultats qui ont montré que le GSH_{tot} est corrélé négativement avec la teneur en oxygène dissous chez les deux espèces de gobies.

3.2.2. Variation saisonnière de la peroxydation lipidique

Le suivi de l'évolution annuelle des TBARS chez *G. niger* et *Z. ophiocephalus* a mis en évidence une acrophase pendant les mois de mars chez *G. niger* et d'avril chez *Z. ophiocephalus*. Le mésor (M) et l'amplitude (A) de l'évolution du TBARS, sont plus faibles chez *G. niger* (M= 196 ; A= 86,3) que chez *Z. ophiocephalus* (M= 286., A=170) (Fig. 2 ; Tab. 3).

L'étude des coefficients de corrélation entre la teneur des TBARS (la peroxydation lipidique) et les facteurs abiotiques ne semble pas induite par la température, mais se trouve plutôt sous l'influence de la photopériode avec une corrélation positive significative ($p < 0,01$) chez les deux espèces de gobies (Tab. 4)

Les travaux de Madeira et al. (2013), menés sur plusieurs espèces de poissons, confirment l'absence de corrélation entre la température et le taux de la peroxydation lipidique chez *G. niger*. De plus, ces auteurs rapportent que la réponse au stress oxydant n'est pas directement corrélée avec la température et suggèrent que l'expression de ces biomarqueurs est spécifique de l'espèce.

Le suivi mensuel de la peroxydation lipidique chez les deux espèces a montré, aussi, une corrélation négative avec la salinité ($p < 0,05$). Ce résultat est conforme à ceux rapportés dans d'autres travaux (Zanette et al. 2011; Lorà et al. 2012) qui ont mis en évidence un effet protecteur de la salinité contre la peroxydation lipidique.

Ce biomarqueur est aussi corrélé négativement, chez *G. niger*, avec le pH de l'eau alors qu'il est corrélé positivement à la teneur en oxygène dissous uniquement chez *Z. ophiocephalus* avec une acrophase de la teneur de TBARS pendant la période de reproduction (avril) de cette espèce (Louiz et al. 2013), alors que pour *G. niger* nous avons noté une acrophase pendant le mois de mars (phase de repos sexuelle) (Louiz 2010). Le résultat obtenu pour *Z. ophiocephalus* pourrait être expliqué par le fait que la reproduction chez les vertébrés est un processus exigeant en énergie et pouvant potentiellement entraîner un stress oxydatif. Dans la littérature, une augmentation des dommages oxydatifs et le statut antioxydant ont été enregistrés pendant la période de reproduction chez plusieurs espèces de poissons (Alonso-Alvarez et al. 2004; Aras et al. 2009 ; Hoogenboom et al. 2012).

4. Conclusion

Bien que les biomarqueurs de stress oxydant aient été utilisés principalement comme indicateurs des effets de la contamination chimique dans les études in situ, nous rapportons ici qu'ils sont très sensibles à la température et cette sensibilité peut être modulée par la salinité et la teneur en oxygène dissous. Il convient donc d'en tenir compte dans les études comparatives entre des sites soumis à différents régimes thermiques et présentant des salinités différentes. De plus, un choix judicieux et une caractérisation approfondie de l'espèce d'étude s'imposent, étant donné que les différentes espèces ne semblent pas répondre de la même façon aux modifications naturelles du milieu.

5. Références

- Abele D, Puntarulo S (2004)** Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp Biochem Physiol A* 138 :405–415
- Ahmad I, Hamid T, Fatima M, Chand HS, Jain SK, Athar M, Raisuddin S (2000)** Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim Biophys Acta* 1523 : 37-48
- Aït-Aïssa S, Ausseil O, Palluel O, Vindimian E, Ganier-Laplace J, Porcher JM (2003)**. Biomarker responses in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after single and combined exposure to low doses of cadmium, zinc, PCB77 and 17- α -estradiol. *Biomarkers* 8 (6): 491-508.

- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Devevey G, Prost J, Faivre B, Sorci G (2004).** Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecol Lett* 7: 363–368.
- Aras NM, Bayir A, Sirkelcioglu AN, Bayir M, Aksakal E, Haliloglu HI (2009)** Seasonal changes in antioxidant defence system of liver and gills of *Salmo trutta caspius*, *Salmo trutta labrax* and *Salmo trutta macrostigma*. *J Fish Biol* 74 : 842–856.
- Barhoumi B, Clérandeau C, Gourves PY, Le Menach K, El Megdiche Y, Peluhet L, Budzinski H, Baudrimont M, Driss MR (2014)** Pollution biomonitoring in the Bizerte lagoon (Tunisia), using combined chemical and biomarker analyses in grass goby, *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei, Gobiidae). *Mar Environ Res* 101: 184–195
- Bradford M (1976).** A rapid and sensitive method for the hquantification of microgram quantities of protein utilising the principal of protein - dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Cooper RU, Clough LM, Farwel MA, West TL (2002)** Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *J Exp Mar Biol Ecol* 279: 1-20
- Corsi I, Mariottini M, Sensin C, Lancini L, Focardi S (2003°).** Fish as bioindicators of brackish ecosystem health: integrating biomarker responses and target pollutant concentrations. *Oceanol Acta* 26 (1) : 129-138
- Corsi I, Mariottini M, Sensini C, Lancini L, Focardi S (2003b)** Cytochrome P450, acetylcholinesterase and gonadal histology for evaluating contaminant exposure levels in fishes from a highly eutrophic brackish ecosystem: the Orbetello Lagoon, Italy. *Mar Poll Bull* 46 (2) : 203-212.
- Cossu C, Doyotte A, Jaquin M, Vasseur P (1997).** Mecanismes de formation et effets des especes reactives de l'oxygene. In *Biomarqueurs en ecotoxicologie. Aspects fondamentaux* : 125-147.
- De Oliveira UO, Araujo ASR, Bello-Klein A, da Silva RSM., Kucharski LC (2005)** Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp Biochem Physiol B* 140: 51–57
- Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blauboere BJ, Boobisf A, Carereg A, Kevekordesh S, Lhuguenoti JC, Pieterse R, Kleinerj J (2002)** Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol* 40 : 193–236
- Flammarion P, Garric J (1997)** Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers: A relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker. *Chemosphere* 35 (10) : 2375-2388
- Halliwell B (2006)** Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol* 141:312-322.
- Hoogenboom MO, Metcalfe NB, Groothuis TGG, De Vries B, Costantini D (2012)** Relationship between oxidative stress and circulating testosterone and cortisol in pre-spawning female brown trout. *Comp Biochem Physiol A* 163 : 379–387
- Hammami I, Bahri-Sfar L, Kaouache M, Grenouillet G, Lek L, Kara MH Ben Hassine OK. (2013)** Morphological characterization of striped seabream (*Lithognathus mormyrus*, Sparidae) in some Mediterranean lagoons. *Cybium*, 37(1-2): 127-139.
- Kappus H (1987)** A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. *Chem Phys Lipids* 45: 105-115.
- Oakes KD, Van Der Kraak GJ (2003)** Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol* 63 : 447- 463.
- Khessiba A, Roméo M, Aissa P (2005)** Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environ Pollut* 133: 275-281.
- Kwon TD, Fisher SW, Kim, GW, Hwang H, Kim JE (2006)** Trophic transfer and biotransformation of polychlorinated biphenyls in zebra mussel, round goby, and smallmouth bass in Lake Erie, USA. *Environ Toxicol Chem* 25(4):1068-78.
- Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F, (1997)** Biomarqueurs en ecotoxicologie: Principes et definitions : 1-7. In : *Biomarqueurs en ecotoxicologie : aspects fondamentaux. Edt, Masson.* : 419 p.

- Lagbouri A (1997)** Etude de la biologie de *Donax trunculus* dans la baie d'Agadir et de sa réponse à la pollution à travers trois biomarqueurs (Acétylcholinestérase, Peroxydation lipidique et Glutathion-S-Transférase). *Fac Sci Agadir (Maroc)*: 171 p.
- Leiniö S, Lehtonen KK (2005)** Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Macoma balthica* and *Mytilus edulis* from the northern Baltic Sea. *Comp Biochem Physiol C* **140**: 408-421.
- Lemaire P, Viarengo A, Canesi L, Livingstone DR (1993)**. Prooxidant and antioxidant process in gas gland and other tissues of cod (*Gadus morhua*). *J Com Physiol* **163**: 477-786.
- Livingstone DR (2001)** Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* **42**: 656–666.
- Lorà VL, Jorge MB, Silva KR, Wood CM (2012)** Oxidative stress parameters and antioxidant response to sublethal waterborne zinc in a euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: Protective effects of salinity. *Aquat Toxicol* **110-111** : 187- 193
- Louiz I, Ben Hassine OK, 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. *Mar Poll Bull* **107**: 305–314.
- Louiz I, Kinani S, Gouze ME, Ben Attia M, Menif D, Bouchonnet S, Porcher JM, Ben Hassine OK, Aït-Aïssa S (2008)** Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Sci Total Environ* **402**: 318-329.
- Louiz I (2010)** Caractérisation d'outils diagnostiques pour la biosurveillance de l'environnement aquatique : Les poissons gobiidés de la lagune de Bizerte. PhD thesis. University of Tunis El Manar, Tunisia. 298p.
- Lushchak VI, Lushchak LP, Mota AA, Hermes-Lima M (2001)** Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280** (1): 100-107
- Lushchak,VI, Bagnyukova TV (2006 a)** Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. *Comp Biochem Physiol C* **143**: 30-35
- Lushchak VI, Bagnyukova TV (2006 b)** Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comp Biochem Physiol C* **143**: 36-41
- Lushchak VI, Bagnyukova TV, Lushchak OV, Storey LM, Storey KB (2005)** Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:1319-1330
- Lushchak VI, Bagnyukova TV (2007)** Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii* *Comp Biochem Physiol B* **148**(4): 390–397
- Madeira D, Narciso L, Cabral HN, Vinagre C, Diniz MS (2013)** Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comp Biochem Physiol A* **166** :237–243
- Mahmoudi E (2003)** La méiofaune de deux lagunes perturbées : Ghar El Melh et Boughrar. Thèse de doctorat, Université 7 Novembre, Carthage.
- Martinez-Alvarez RM, Morales AE, Sanz A (2005)** Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev Fish Biol Fish* **15**: 75-88.
- Miller PJ, (1986)** Gobiidae. In: Whitehead P J P, Bauchot ML, Hureau JC, Nielsen J, Tortonese E. (eds), *Fishes of the Northeastern Atlantic and the Mediterranean*. Paris: UNESCO.Vol.3 p 1019-1085
- Moussa M, Baccar L, Ben Khemis R (2005)** La lagune de Ghar El Melh: Diagnostic écologique et perspectives d'aménagement hydraulique. *Rev Sci Eau* **18**: 13-26.
- Nordberg J Arn'er ESJ (2001)** Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* **31** (11): 1287-1312.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979)**. Assay for lipid peroxides in animal tissues thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95** : 351-358.
- Pandey S, Parvez S, Sayeed I, Haque R, Bin-Hafeez B, Raisuddin S (2003)** Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci Total Environ* **309** :105–115
- Pascual P, Pedrajas JR, Toribio F, López-Barea J, Peinado J (2003)**. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*), *Chem Biol Interact* **145**: 191-199

- Phillips DJH, Spies RB (1988)** Chlorinated hydrocarbons in the San Francisco estuarine ecosystem. *Mar Pollut Bull* 19 (9): 445-453
- Ramsak A, Stopar K, Sepcic K, Berden-Zrimec M, Bajt O, Malej A (2007)** Reflection of hydrocarbon pollution on hepatic EROD activity in the black goby (*Gobius niger*). *Environ Toxicol Pharmacol* 24 (2007) 304–310
- Regoli F (2000)** Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress; *Aquat Toxicol* 50 (4) : 351-361.
- Regoli F, Nigro M, Orlando E (1998)** Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat Toxicol* 40: 375-392
- Sanchez W, Palluel O, Meunier L, Coquery M Porcher JM, Aït-Aïssa S (2005)** Copperinduced oxidative stress biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus aculeatus* L.): relationship with hepatic copper and zinc levels. *Environ Toxicol Pharmacol* 19: 177-183.
- Santovito G, Piccinni E, Cassini A, Irato P, Albergoni V (2005)** Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. *Comp Biochem Physiol C* 140 (3-4): 321-329
- Sheehan M, Bollner TD (2007)** Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* L.: Evidence for variation along a natural salinity gradient of the Baltic Sea *Aquat Toxicol* 82:63–71
- Sies H, (1991)** Oxidative Stress II: Oxidants and Antioxidants. *London: Academic Press.*
- Smith CJ, Shaw BJ, Handy RD (2007)** Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquat Toxicol* 82 : 94-109
- Solé M, Kopecka J, García de la Parra LM (2006).** Seasonal variations of selected biomarkers in sand gobies *Pomatoschistus minutus* from the Guadalquivir Estuary, Southwest Spain., *Arch Environ Contam Toxicol* 50:249-255.
- Storey KB (1996)** Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res* 29:1715-33
- Vandeputte C, Guizon I, Genestie-Denis I, Vannier B, Lorenzon G (1994)** A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol Toxicol* 10(5-6): 415-421.
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Poli G, Moore MN, Orunesu M (1990).** Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *mytilus galloprovincialis* lam. *Comp Biochem Physiol C* 97(1): 37-42
- Whyte J, Jung R, Schmitt C, Tillitt D (2000)** Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol* 30 (4): 347-570
- Zanette J, De Almeida EA, Da Silva AZ, Guzensk J, Ferreira JF, Di Mascio P, Marques MRF, Bairy ACD (2011)** Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil. *Sci Total Environ* 409 : 1976-1983