

SOMMAIRE

	Page
1. INTRODUCTION	01
2. MATERIEL ET METHODES	07
2.1. Présentation de <i>Donax trunculus</i>	07
2.2. Présentation du site d'échantillonnage	13
2.3. Collecte et élevage	15
2.4. Présentation du cadmium	16
2.5. Détermination des paramètres de létalité du cadmium	17
2.6. Exposition au cadmium et prélèvement des gonades	19
2.7. Analyse des biomarqueurs	19
2.7.1. Extraction et dosage des protéines carbonylées.....	19
2.7.2. Extraction et dosage des métallothionéines.....	21
2.8. Analyse des constituants biochimiques de la gonade	23
2.8.1. Extraction et dosage des réserves énergétiques (glucides, lipides, et protéines).....	23
2.8.2. Méthode d'extraction et dosage des oméga-3.....	26
2.8.3. Extraction et dosages des acides nucléiques.....	27
2.9. Analyse statistique	30
3. RESULTATS	31
3.1. TOXICITE AIGUE DU CADMIUM CHEZ <i>D. trunculus</i>	31
3.1.1. Toxicité en période de repos sexuel	31
3.1.2. Toxicité en période d'activité sexuelle	35
3.1.2.1. Chez les mâles.....	35
3.1.2.2. Chez les femelles.....	39
3.1.2.3. Comparaison des résultats entre sexe et période à la fin des tests (96h).....	43
3.2. EFFET SUBLETAL DU CADMIUM SUR LES BIOMARQUERS	43
3.2.1. Effet du cadmium chez <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel durant l'exposition aigüe et la dépuración	43
3.2.1.1. Variation des taux de protéines carbonylées.....	43
3.2.1.2. Variation des taux de métallothionéines.....	43
3.2.2. Effet chez les mâles et les femelles de <i>D. trunculus</i> en période d'activité sexuelle durant l'exposition aigüe et la dépuración	46
3.2.2.1. Variation des taux de protéines carbonylées.....	46
3.2.2.2. Variation des taux de métallothionéines.....	48
3.2.3. Comparaison des résultats entre sexe et période	50
3.3. EFFET SUBLETAL DU CADMIUM SUR LES COMPOSANTS BIOCHIMIQUES DES GONADES DE <i>D. trunculus</i>	51
3.3.1. Effet sur les réserves énergétiques	51
3.3.1.1. Effet en période de repos sexuel durant l'exposition aigüe et la dépuración	51
3.3.1.1.1. Variation des taux de glucides.....	51

3.3.1.1.2. Variation des taux de lipides.....	51
3.3.1.1.3. Variation des taux de protéines.....	51
3.3.1.2. Effet chez les mâles et les femelles de <i>D. trunculus</i> en période d'activité sexuelle durant l'exposition aigüe et la dépuración.....	55
3.3.1.2.1. Variation des taux de glucides.....	55
3.3.1.2.2. Variation des taux de lipides.....	57
3.3.1.2.3. Variation des taux de protéines.....	59
3.3.1.3. Comparaison des résultats entre sexe et période.....	61
3.3.2. Effet sur les oméga-3.....	61
3.3.2.1. Effet en période de repos sexuel durant l'exposition aigüe et la dépuración.....	61
3.3.2.1.1. Variation des taux de l'acide eicosapentaénoïque (EPA).....	61
3.3.2.1.2. Variation des taux de l'acide docosahéxaénoïque (DHA).....	62
3.3.2.2. Effet chez les mâles et les femelles de <i>D. trunculus</i> période d'activité sexuelle durant l'exposition aigüe et la dépuración.....	64
3.3.2.2.1. Variation des taux de l'acide eicosapentaénoïque (EPA).....	64
3.3.2.2.2. Variation des taux de l'acide docosahéxaénoïque (DHA).....	66
3.3.2.3. Comparaison des résultats entre sexe et période.....	68
3.3.3. Effet sur les acides nucléiques	68
3.3.3.1. Effet en période de repos sexuel durant l'exposition aigüe et la dépuración.....	68
3.3.3.1.1. Variation des taux d'ARN.....	68
3.3.3.1.2. Variation des taux d'ADN.....	69
3.3.3.2 Effet chez les mâles et les femelles de <i>D. trunculus</i> en période d'activité sexuelle durant l'exposition aigüe et la dépuración.....	71
3.3.3.2.1. Variation des taux d'ARN.....	71
3.3.3.2.2. Variation des taux d'ADN.....	73
3.3.3.3. Comparaison des résultats entre sexe et période.....	75
4. DISCUSSION.....	76
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	92
6. RESUMES.....	94
Français.....	94
Anglais.....	95
Arabe.....	96
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	97
ANNEXES.....	131
Annexe 1: Données statistiques.....	131
Annexe 2: Valorisation scientifique.....	164

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Morphologie externe avec les différentes couleurs de la coquille de <i>D. trunculus</i> (Photo personnelle).	08
02	Morphologie interne de la coquille de <i>D. trunculus</i> (Photo personnelle).	08
03	Anatomie générale de <i>D. trunculus</i> (Louzán Pérez, 2015).	09
04	Distribution géographique de <i>D. trunculus</i> (Louzán Pérez, 2015).	10
05	Localisation de <i>D. trunculus</i> dans son biotope (Photo personnelle).	11
06	Gonade de <i>D. trunculus</i> en période de reproduction A): mâle, B): femelle, et C): en période de repos sexuel (Photo personnelle).	12
07	Cycle de vie de <i>D. trunculus</i> (Louzán Pérez, 2015).	13
08	Localisation du site El Battah dans le golfe d'Annaba (Belabed <i>et al.</i> , 2013).	14
09	Photographie de la plage El Battah (Photo personnelle).	14
10	Le cope (A) et le déroulement de l'opération de pêche (B) (Photo personnelle).	15
11	Elevage de <i>D. trunculus</i> au laboratoire (Photo personnelle).	16
12	Aspect du cadmium solide (A) et Greenockite ou sulfure de cadmium (B) (Verge, 2006).	17
13	Dosage des protéines: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumines (μg) (R^2 coefficient de détermination).	20
14	Dosage des MTs: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de GSH (μl) (R^2 coefficient de détermination).	22
15	Principales étapes d'extraction des protéines, glucides et lipides (Shibko <i>et al.</i> , 1966).	23
16	Dosage des glucides: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de glucose (μg) (R^2 coefficient de détermination).	24
17	Dosage des lipides: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de lipide (μg) (R^2 coefficient de détermination).	25
18	Dosage des protéines: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumines (μg) (R^2 coefficient de détermination).	26
19	Principes de l'estérification (ANSES, 2011).	27
20	Principales étapes d'extraction des acides nucléiques: ADN, ARN selon Shibko <i>et al.</i> (1966).	28
21	Dosage de l'ARN: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'ARN (μg) (R^2 coefficient de détermination).	29
22	Dosage de l'ADN: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'ADN (μg) (R^2 coefficient de détermination).	30
23	Toxicité du cadmium (mg/L) après 24h, 48h, 72h et 96h d'exposition de <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel : Analyse des probits.	34
24	Toxicité du cadmium (mg/L) après 24h, 48h, 72h et 96h d'exposition des mâles de <i>D. trunculus</i> en période de reproduction : Analyse des probits.	38
25	Toxicité du cadmium (mg/L) après 24h, 48h, 72h et 96h d'exposition des femelles de <i>D. trunculus</i> en période de reproduction : Analyse des probits.	42
26	La structure des dérivés carbonylés produits par oxydation directe de chaînes latérales d'acides aminés: 2-pyrrolidone à partir de résidus prolyle, glutamique semialdéhyde d'arginyle et résidus prolyle, un aminoadipique semialdéhyde de résidu lysyle, résidu, et de l'acide 2-amino-3-cétobutyrique de thréonyle (Dalle-Donne <i>et al.</i> , 2003).	78
27	Structure des métallothionéines liés au cadmium (Langston <i>et al.</i> , 1998).	80

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Paramètres Physico-chimiques de l'eau de l'élevage de <i>D. trunculus</i> .	16
02	Dosage des protéines: réalisation de la gamme d'étalonnage.	21
03	Gamme étalon de glutathion réduit (GSH).	22
04	Dosage des glucides: réalisation de la gamme d'étalonnage.	24
05	Dosage des lipides: réalisation de la gamme d'étalonnage.	25
06	Dosage de l'ARN: Réalisation de la gamme d'étalonnage.	29
07	Dosage de l'ADN: Réalisation de la gamme d'étalonnage.	30
08	Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard de <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel , et après 24h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).	31
09	Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard de <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel , et après 48h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).	32
10	Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard de <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel , et après 72h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).	32
11	Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard de <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel , et après 96h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).	33
12	Toxicité du cadmium (mg/L) après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h chez <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel : concentrations sublétales et sulétales (IC: intervalle de confiance).	34
13	Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard des mâles de <i>D. trunculus</i> en période de reproduction et après 24h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).	35
14	Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard des mâles de <i>D. trunculus</i> en période de reproduction , et après 48h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).	36
15	Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard des mâles de <i>D. trunculus</i> en période de reproduction , et après 72h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).	36
16	Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard des mâles de <i>D. trunculus</i> en période de reproduction , et après 96h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).	37
17	Toxicité du cadmium (mg/L) après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h chez les mâles de <i>D. trunculus</i> en période de reproduction : déterminatin de la CL₁₀, CL₂₅, CL₅₀, CL₉₀ (IC: intervalle de confiance).	38
18	du cadmium (mg/L) à l'égard des femelles de <i>D. trunculus</i> en période de reproduction et après 24h d'exposition: classement des concentrations.	39
19	Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard des femelles de <i>D. trunculus</i> en période de reproduction et après 48h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).	39
20	Toxicité du cadmium (mg/L) l'égard des femelles de <i>D. trunculus</i> en période de reproduction , et après 72h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).	40
21	Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard des femelles de <i>D. trunculus</i> en période de reproduction , et après 96h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).	41
22	Toxicité du cadmium (mg/L) après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h	42

	chez les femelles de <i>D. trunculus</i> en période de reproduction : déterminatin de la CL₁₀, CL₂₅, CL₅₀, CL₉₀ (IC: intervalle de confiance).	
23	Taux de protéines carbonylées (nmol/mg de protéines) au niveau des gonades de <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel durant la phase d'exposition et de dépurat ion (m ± SD, n=4).	45
24	Taux de métallothionéines (µg/mg de protéines) au niveau des gonades de <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel durant la phase d'exposition et de dépurat ion (m ± SD, n=4).	45
25	Taux de protéines carbonylées (nmol/mg de protéines) au niveau des gonades des adultes mâles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restaurat ion (m ± SD, n=4).	47
26	Taux de protéines carbonylées (nmol/mg de protéines) au niveau des gonades des adultes femelles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restaurat ion (m ± SD, n=4).	47
27	Taux de métallothionéines (µg/mg de protéines) au niveau des gonades des adultes mâles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restaurat ion (m ± SD, n=4).	49
28	Taux de métallothionéines (µg/mg de protéines) au niveau des gonades des adultes femelles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restaurat ion (m ± SD, n=4).	49
29	Taux de glucides (µg/mg de tissu) au niveau des gonades de <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel durant la phase d'exposition et de dépurat ion (m ± SD, n=4).	53
30	Taux de lipides (µg/mg de tissu) au niveau des gonades de <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel durant la phase d'exposition et de dépurat ion (m ± SD, n=4).	53
31	Taux de protéines (µg/mg de tissu) au niveau des gonades de <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel durant la phase d'exposition et de dépurat ion (m ± SD, n=4).	54
32	Taux de glucides (µg/mg de tissu) au niveau des gonades des adultes mâles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restaurat ion (m ± SD, n=4).	56
33	Taux de glucides (µg/mg de tissu) au niveau des gonades des adultes femelles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restaurat ion (m ± SD, n=4).	56
34	Taux de lipides (µg/mg de tissu) au niveau des gonades des adultes mâles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restaurat ion (m ± SD, n=4).	58
35	Taux de lipides (µg/mg de tissu) au niveau des gonades des adultes femelles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restaurat ion (m ± SD, n=4).	58
36	Taux de protéines (µg/mg de tissu) au niveau des gonades des adultes mâles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restaurat ion (m ± SD, n=4).	61
37	Taux de protéines (µg/mg de tissu) au niveau des gonades des adultes femelles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restaurat ion (m ± SD, n=4).	61
38	Taux d' EPA (µg/mg de tissu) au niveau des gonades de <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel durant la phase d'exposition et de dépurat ion (m ± SD, n=4).	63
39	Taux d' DHA (µg/mg de tissu) au niveau des gonades de <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel durant la phase d'exposition et de dépurat ion (m ± SD, n=4).	63
40	Taux d' EPA (µg/mg de tissu) au niveau des gonades des adultes mâles de	65

	<i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restauration (m \pm SD, n=4).	
41	Taux d' EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes femelles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restauration (m \pm SD, n=4).	65
42	Taux de DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes mâles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restauration (m \pm SD, n=4).	67
43	Taux de DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes femelles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restauration (m \pm SD, n=4).	67
44	Taux d' ARN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades de <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel durant la phase d'exposition et de dépuración (m \pm SD, n=5).	69
45	Taux d' ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades de <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel durant la phase d'exposition et de dépuración (m \pm SD, n=5).	69
46	Taux d' ARN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes mâles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restauration (m \pm SD, n=5).	71
47	Taux d' ARN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes femelles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restauration (m \pm SD, n=5).	71
48	Taux d' ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes mâles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restauration (m \pm SD, n=5).	73
49	Taux d' ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes femelles de <i>D. trunculus</i> durant la période d'exposition et de restauration (m \pm SD, n=5).	73

Introduction

1. INTRODUCTION

Au cours des vingt dernières années, la population algérienne a augmenté de 50 %. Environ 45 % de cette population est concentrée sur une bande très étroite du littoral, en particulier dans les zones industrielles et portuaires. Cette population côtière continue d'augmenter considérablement, et exerce une forte pression anthropique sur l'écosystème marin côtier (Grimes *et al.*, 2010). Le golfe d'Annaba est le plus important pôle touristique et économique installé sur la côte Est algérienne. Toutefois, ses ressources halieutiques sont menacées par une pollution liée à une activité économique en plein essor. Ces activités ont engendré une multitude de substances synthétiques et étrangères aux mécanismes biologiques susceptibles de porter préjudice à l'écosystème marin et au cadre de vie des habitants. Les travaux antérieurs ont permis la mise en évidence d'une contamination métallique importante dans cette région notamment par le cadmium (Beldi *et al.*, 2006; Drifi *et al.*, 2010; Belabed *et al.*, 2013; Larba *et al.*, 2014).

Les polluants chimiques peuvent contaminer l'environnement par des voies diverses (évacuation des eaux usées, déversement d'effluents industriels, épandage sur les sols, retombées de polluants atmosphériques) et sous diverses formes (gazeuses, dissoutes ou particulaires) (Barranger, 2015). Ces produits finissent dans les écosystèmes côtiers qui sont également parmi les zones préférentielles pour la reproduction et la croissance de plusieurs espèces aquatiques (Freitas *et al.*, 2012). La pollution de ces écosystèmes est devenue un problème écologique mondial majeur (Perez *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2015). L'écotoxicologie est née de ce constat et se décrit comme étant la science qui a pour objectif majeur d'évaluer et de prédire l'impact des contaminants sur les organismes, populations, communautés et *in fine* sur les écosystèmes (Baillon, 2015). Il existe différents types de contaminants chimiques allant des rejets radioactifs (Uddin *et al.*, 2015; Falfushynska *et al.*, 2016), les nanoparticules (Rocha *et al.*, 2016), les matières organiques (Olivares-Rubio & Vega-Lopez, 2016), comme les polychlorobiphényles (PCBs) (Choi *et al.*, 2014; Kodavanti & Loganathan, 2017), et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (Lüchmann *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2017), les pesticides (Moraleda-Cibrín *et al.*, 2015; El Nemr *et al.*, 2016; López *et al.*, 2017), les produits pharmaceutiques (Aguirre-Martínez *et al.*, 2016; Andreu *et al.*, 2016; Joseph, 2017), et les métaux lourds (Chandurvelan *et al.*, 2015; Schoonover *et al.*, 2016; Durkalec *et al.*, 2017).

Bien que les métaux soient naturellement omniprésents dans les systèmes aquatiques (volcanisme, gisement pétrolier, biotoxines, etc.) (De Souza Machado *et al.*, 2016), ils

représentent le groupe de polluant aquatique le plus important en raison de leurs propriétés cumulatives et non dégradables (Velma & Tchounwou, 2010). Outre leur caractère fortement mutagène et cancérigène, les métaux peuvent entraîner à l'échelle de l'organisme d'importantes perturbations du système nerveux, cardiovasculaire, immunitaire, gastro-intestinal, hépatique, rénal, respiratoire et reproducteur (Pont, 2010). On distingue parmi les éléments traces métalliques (ETM):

- Les éléments traces essentiels indispensables au déroulement des processus biologiques, mais à de très faibles quantités, comme le fer (Fe), le cuivre (Cu), ou le zinc (Zn).
- Les éléments traces non essentiels, comme l'arsenic (As), le mercure (Hg), le plomb (Pb) et le cadmium (Cd), qui sont au premier rang de la liste des substances dangereuses prioritaires (ATSDR, 2015).

Le Cd n'est pas essentiel au développement des organismes animaux ou végétaux et ne participe pas au métabolisme cellulaire. En revanche, ses propriétés physiques et chimiques, proches de celles du calcium, lui permettent de traverser les barrières biologiques et s'accumuler dans les tissus (Martin-Garin & Simon, 2004). Il peut conduire à des effets toxiques à de faibles concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$), en raison de la biodisponibilité de sa forme ionique libre Cd^{2+} (Part *et al.*, 1985; Wang & Rainbow, 2006; Nzengue *et al.*, 2011; Yeung *et al.*, 2016). La recherche sur la toxicité sublétales est donc nécessaire pour la compréhension des effets toxiques autres que létaux, puisque ce sont eux qui s'expriment le plus souvent dans les situations réelles de pollution de l'environnement (Mouabad, 1991; Dutta *et al.*, 2017).

L'évaluation des effets toxicologiques induits par les concentrations sublétales du Cd nécessite l'utilisation des biomarqueurs (Chiodi Boudet *et al.*, 2013), qui sont des signaux cellulaires à l'échelle moléculaire, biochimique ou physiologique dont les caractéristiques structurales ou fonctionnelles peuvent être rapidement modifiées à la suite de contraintes environnementales ou de l'exposition à des polluants. Ils sont des indicateurs précoces de l'atteinte des individus et peuvent être prédictifs d'une altération des populations, voire d'un dysfonctionnement des communautés (Pelletier *et al.*, 2004).

De nombreux biomarqueurs biochimiques et cellulaires spécifiques, mais aussi non spécifiques ont été étudiés chez les organismes aquatiques (Tlili *et al.*, 2013; Schoonover *et al.*, 2016; Magni *et al.*, 2017). Parmi les biomarqueurs spécifiques, on peut citer; l'acétylcholinestérase (AChE) (Menéndez-Helman *et al.*, 2015; Guerreño *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017), la glutathion S-transférases (GST) (Capó *et al.*, 2015; Bielen *et al.*, 2016; Bertrand *et al.*, 2017), les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP450) (Ito *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2017), les métallothionéines (MTs) (Le *et al.*, 2016; Durkalec *et al.*, 2017) qui sont spécifique à l'exposition aux métaux lourds, mais associées aussi à la protection des organismes contre les radicaux libres (Viarengo *et al.*, 1999; Hauser-Davis, *et al.*, 2014), et l'éthoxyrésorufine-Odeethylase (EROD) (Joachim *et al.*, 2017; Siebert *et al.*, 2017). Les biomarqueurs non spécifiques ont été également largement étudiés et utilisés pour la détection des niveaux de pollution, comme le glutathion réduit (GSH) impliqué dans le système de défense antioxydant (Fernandez-Iglesias *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2017), les vitamines (vitamines A, C, E) (Cai *et al.*, 2013; Narra *et al.*, 2015), le malondialdéhyde (MDA) qui est

un produit issu de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires lors d'un stress oxydatif important, et les protéines carbonylées (PCs) qui un marqueur de l'oxydation globale des protéines, car ils sont générés par de multiples espèces réactives d'oxygène, et sont considérés comme de bons biomarqueurs des lésions cellulaires et tissulaires (Dewes *et al.*, 2006; Oruc & Usta, 2007; Weber *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2017).

Les réserves énergétiques peuvent être également de bons biomarqueurs de l'état de santé de l'organisme et de son environnement (Yeung *et al.*, 2016; Moreira *et al.*, 2017). En effet, la répartition de l'énergie entre les fonctions fondamentales de l'organisme telles que la croissance et la reproduction, peut prédire l'impact de l'accumulation des polluants sur ces fonctions et sur la survie des organismes exposés à des contaminants (Kooijman, 2000; Mouneyrac *et al.*, 2008; Hamdani & Soltani-Mazouni, 2011).

L'acide nucléique désoxyribose (ADN) est une composante essentielle de toute matière vivante et contient le code génétique d'un organisme. L'acide nucléique ribonucléique (ARN) assure le transfert du code génétique de l'ADN nucléaire au cytoplasme, et la synthèse des protéines (Love, 1980; Viarengo *et al.*, 1982). Les processus de la croissance et de la division cellulaire nécessitent la synthèse d'acides nucléiques et de protéines. Le fait que l'ARN soit un précurseur nécessaire à la synthèse des protéines, a conduit à ce que sa quantité dans la cellule soit directement proportionnelle au taux de synthèse des protéines (Ferron & Leggett, 1994; Suthers *et al.*, 1996). Comme la majorité de l'ADN cellulaire est chromosomique, la quantité d'ADN par cellule est quasi constante dans les tissus somatiques et la concentration d'ADN tissulaire reflète donc le nombre de cellules (Suthers *et al.*, 1996). La mesure des acides nucléiques a été appliquée pour évaluer l'état individuel d'une variété d'organismes aquatiques (Abdul Aziz, 2012; Ning *et al.*, 2013; Foley *et al.*, 2016).

Les acides gras (AG) sont une classe de biomolécules qui possèdent une grande diversité de fonctions dans les processus structuraux et biologiques à travers les interactions avec les protéines (Dowhan *et al.*, 2008; Sul & Smith, 2008). Au cours des deux dernières décennies, les acides gras polyinsaturés (AGPI) comme la famille des oméga 3 (ex. l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) ont suscité un grand intérêt parmi les scientifiques pour leurs propriétés médicinales et nutritionnelles (Razak *et al.*, 2001; Berger *et al.*, 2013). L'abondance des AGPI est une caractéristique des bivalves (Gonçalves *et al.*, 2016). Enfin, la composition en acides gras s'est révélée être un bon bioindicateur pour évaluer les niveaux de contamination des milieux aquatiques (Signa *et al.*, 2015; Filimonova *et al.*, 2016).

Les bivalves sont des modèles utiles pour comprendre les conséquences de la pollution par les métaux aux niveaux cellulaire, organique et de population (Boening, 1999; Berthet, 2013). Ces organismes sont choisis en raison de leur capacité à accumuler des contaminants provenant habituellement de l'eau et des aliments, reflétant la fraction biodisponible (Chandurvelan *et al.*, 2015). De plus, leur immobilité relative, leur large répartition entre différents habitats aquatiques, leur abondance, leur persistance et leur facilité de collecte, en font de bons indicateurs à long terme de la contamination de l'environnement (Hamza-Chaffai, 2014). Ils ont un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes et même parfois au plan économique, certaines espèces étant commercialisées. De plus, leur abondance

et leur large répartition géographique, associées à leur caractère robuste et résistant par rapport aux perturbations du milieu, constituent d'importants atouts dans le cadre d'études environnementales (Rittschof & McClellan-Green, 2005). Une caractéristique importante des bivalves qui les rend attrayants comme espèces sentinelles est leur mode d'alimentation. Filtreurs, ils concentrent dans leurs tissus les éléments dissous et particuliers présents dans leur entourage (Kimbrough *et al.*, 2008). Enfin, les formes adultes étant généralement sessiles ou sédentaires permettent d'avoir un bon reflet de l'état qualitatif du milieu environnant. L'ensemble de ces caractéristiques en fait de ces organismes de bons indicateurs biologiques de l'état de santé et de la contamination du milieu (Mejdoub *et al.*, 2017).

Différentes approches de biosurveillance peuvent être utilisées afin d'analyser les effets des contaminants sur les organismes aquatiques. Chacune de ces approches apportera différents degrés d'information. Les études *in situ* sont effectuées en milieu naturel. Ces études représentent l'outil le plus intégrateur des conditions environnementales et permettent ainsi d'aboutir à des résultats pertinents sur l'état de contamination chimique du milieu environnant. Ces études présentent l'avantage d'une représentativité élevée et ce d'autant plus qu'elles se rapprochent des conditions physico-chimiques et biotiques propres aux écosystèmes naturels. Cependant, avec la complexité des structures écologiques ainsi que l'intervention des facteurs relatifs aux modalités et aux mécanismes de la contamination, il est souvent difficile d'interpréter les données recueillies lors de ces études et de proposer des hypothèses explicatives. En plus, dans des conditions *in situ*, la multitude des composés toxiques contenus dans les rejets ne permet pas de déterminer avec exactitude lequel d'entre eux induit les effets toxiques (Karray, 2015).

Les études expérimentales sont effectuées en laboratoire en conditions contrôlées et ont donc une reproductibilité élevée. Les paramètres expérimentaux étant peu nombreux et faciles à normaliser. Ces études permettent de prendre en compte les interactions entre les facteurs biotiques et abiotiques dans l'étude des effets des contaminants. Ces études permettent également de pallier en partie certaines difficultés rencontrées dans les études *in situ*. En effet, en contrôlant des facteurs confondants, les bioessais de toxicité apparaissent comme des outils pertinents pour tester les mécanismes de toxicité ainsi que la biodisponibilité des contaminants grâce à son potentiel analytique puissant (Karray, 2015).

Les effets du Cd ont été bien documentés dans les mollusques bivalves en conditions expérimentales aiguës. Des articles récents soulignent certains de ces effets; étant donné la nature pro-oxydante du Cd, les bivalves exposés à ce métal peuvent présenter une peroxydation lipidique et une perturbation neurotoxique (Chandurvelan *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017), une expression et/ou une activité antioxydante modifiée (Ji *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2016), l'apoptose des hémocytes (Koutsogiannaki *et al.*, 2015) et des dommages à l'ADN (Michel & Vincent-Hubert, 2015). Parmi les autres conséquences figurent les altérations de la stabilité des lysosomes, la fonction mitochondriale (Evariste *et al.*, 2017), et le transport ionique (Faubel *et al.*, 2008). Le Cd est impliqué dans une croissance déprimée (Wu *et al.*, 2016), une perturbation endocrinienne et une interférence dans le processus de reproduction (Chen *et al.*, 2016).

La restauration (dépuration ou purification) est une technique adoptée dans de nombreuses parties du monde qui vise à réduire et à éliminer les micro-organismes pathogènes des mollusques bivalves légèrement à modérément contaminés. Les coquillages sont alors placés dans des bassins d'eau de mer propre de façon à ce qu'ils entreprennent leur activité normale de filtration pendant une période comprise entre quelques heures et plusieurs jours (Lee *et al.*, 2010). Ces dernières années, les études se sont intéressées de plus en plus à la possibilité de purification des produits chimiques toxiques pour l'organisme lui-même, mais aussi pour ses consommateurs (Belabed & Solatni, 2013; Zhang *et al.*, 2015; Belabed & Solatni, 2016).

Parmi les mollusques bivalves comestibles, *Donax trunculus*, qui est largement distribué au niveau de la méditerranée (Tlili *et al.*, 2010), apparaît comme une espèce sentinelle appropriée pour l'évaluation du risque écotoxicologique des contaminants (Moukrim *et al.*, 2004; Tlili *et al.*, 2013; Aly Salem *et al.*, 2014; Banaoui *et al.*, 2015), c'est pourquoi il est utilisé dans la biosurveillance du golfe d'Annaba (Amira *et al.*, 2011; Soltani *et al.*, 2012; Sifi *et al.*, 2013; Bensouda *et al.*, 2014; Hamdani *et al.*, 2014). La croissance et la dynamique des populations (Beldi, 2007; Hamdani, 2013) ainsi que le cycle reproducteur (Beldi, 2007; Hamdani & Soltani-Mazouni, 2011; Bensouda, 2015; Hafsaoui *et al.*, 2016; Hafsaoui, 2017) ont été précisés dans cette région.

La reproduction est reconnue comme un élément essentiel pour le maintien de l'équilibre des communautés dans les écosystèmes. Cependant, de nombreux polluants ont une influence marquée sur la reproduction des organismes aquatiques notamment les bivalves (Ivaniva & Sokolova, 2015; Schoonover *et al.*, 2016; Nardi *et al.*, 2017). Chez *D. trunculus*, la reproduction comprend deux phases: en automne, une phase de repos sexuel marquée par la réorganisation du tissu gonadique (après la ponte); et en hiver jusqu'en été, une phase d'activité sexuelle qui commence par la multiplication des cellules germinales par mitoses successives, le développement des tubules gonadiques, la maturation des gamètes et enfin leur émission (ponte).

C'est dans cette optique que nos objectifs ont été fixés. La réalisation de la présente thèse sur *D. trunculus*, une espèce comestible et sentinelle, s'inscrit dans le cadre du projet de recherche du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée « Qualité des écosystèmes: biosurveillance et impact physiotoxicologique des xénobiotiques sur les organismes ». Elle est en continuité avec les travaux antérieurs (Beldi, 2007; Sifi, 2009; Belabed, 2013; Hamdani, 2013; Khati-Amira, 2014; Bensouda, 2015; Benradia, 2016).

La présentation des résultats de cette thèse se décline en trois parties:

- **La première partie** est consacrée à la détermination de la toxicité aiguë du cadmium à l'égard d'un mollusque bivalve *D. trunculus* en précisant les concentrations sublétales (CL₁₀ et CL₂₅) et létales (CL₅₀ et CL₉₀) pour chaque période du cycle de reproduction (repos et reproduction), et chaque sexe séparément en ce qui concerne la période d'activité sexuelle.
- **La seconde partie** concerne l'évaluation de la réponse de deux biomarqueurs, au cours d'une exposition aiguë (96h) des bivalves à deux concentrations sublétale (CL₁₀ et CL₂₅) du Cd; les métallothionéines, et les protéines carbonylées, en considérant les

facteurs biotiques (période du cycle de reproduction, et sexe pour la période d'activité sexuelle).

- **La troisième partie** est dédiée à l'impact de ce métal sur la composition biochimique des gonades (les réserves énergétiques; glucides, lipides, et protéines, les acides nucléiques; ARN et ADN) et les oméga-3; EPA et DHA) en fonction de la période du cycle sexuelle (repos et reproduction) et du sexe (en période de reproduction), et ce, au cours de l'exposition aiguë (96h) aux deux concentrations sublétales du Cd.

Enfin, nous avons également évalué la capacité de *D. trunculus* à surmonter le stress chimique induit lors de l'exposition sublétale au cadmium, par l'analyse de l'ensemble des paramètres biochimiques après transfert des individus contaminés dans de l'eau de mer saine (dépurée ou restaurée), pour chaque période du cycle de reproduction, et chaque sexe séparément.

Matériel et méthodes

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Présentation de *Donax trunculus*

2.1.1. Classification, morphologie et biologie de l'espèce

Donax trunculus (Linnaeus, 1758), communément appelé Haricot de mer, Filion tronqué ou encore Telline, est un mollusque bivalve aquatique, comestible, très apprécié en gastronomie et à intérêt commercial dans beaucoup de pays (Penchaszadeh & Olivier, 1975; McLachlan, 1996; Pereira *et al.*, 2015). Plusieurs classifications existent, selon que les auteurs tiennent compte de la forme de la coquille, de celle de la charnière ou de la structure des branchies. La classification taxonomique la plus complète est proposée par le World Register of Marine Species (WoRMS) (Gofas, 2017), et est la suivante:

- Règne** Animal
- Embranchement** Chordata
- Phylum** Mollusca
- Classe** Bivalvia Linnaeus, 1758
- Sous-Classe** Heterodonta Neumayr, 1884
- Ordre** Veneroida Gray, 1854
- Superfamille** Tellinoidea Blainville, 1814
- Famille** Donacidae Fleming, 1828
- Genre** *Donax* Linnaeus, 1758
- Espèce** *Donax trunculus* Linnaeus, 1758

D. trunculus est un bivalve à coquille solide peu renflée, allongée triangulaire et inéquilatérale, avec la partie postérieure plus courte que la partie antérieure. Cette coquille est fortement déclive en arrière des crochets et tronquée à l'extrémité postérieure. Elle est légèrement inéquivalve (le bord dorsal antérieur est un peu plus haut à la valve gauche qu'à la valve droite et le plan de jonction des valves faiblement flexueux ventralement), lisse au toucher de couleur jaune pâle à beige vif ou brunâtre. Elle est uniforme extérieurement ou variablement ornée de bandes concentriques et/ou de rayons plus ou moins violacés. L'intérieur de la coquille est souvent de couleur violette et maculé de blanc, brunâtre ou orangé (Fischer *et al.*, 1987) (**Fig. 1**). Les stries de la coquille dépendent de la saison et de l'activité métabolique de l'individu, ils apparaissent principalement avec un ralentissement voire un arrêt de la croissance notamment au cours de la saison hivernale (Ramon *et al.*, 1995).

L'intérieur de la coquille est blanchâtre à violacé, sur laquelle apparait la ligne palléale qui résulte de l'empreinte du manteau, chaque valve porte dans sa face interne deux empreintes visibles de muscles adducteurs antérieur et postérieur presque de même taille, un sinus palléal profond, peu ascendant dorsalement (**Fig. 2**). Sa taille maximale peut atteindre 5 cm à 6 cm (Fischer *et al.*, 1987), mais ne dépasse pas les 39 mm sur les côtes d'Annaba (Hamdani, 2013; Hafsaoui, 2017).



Figure 1. Morphologie externe avec les différentes couleurs de la coquille de *D. trunculus* (Photo personnelle).

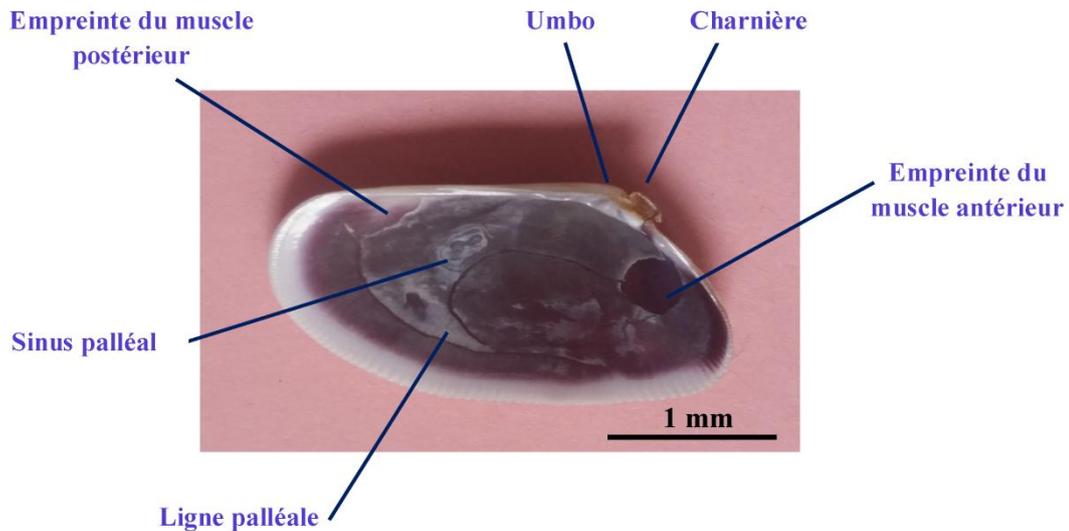


Figure 2. Morphologie interne de la coquille de *D. trunculus* (Photo personnelle).

L'anatomie interne de *D. trunculus* (**Fig. 3**) présente un organe musculueux, ventral mobile et turgescent, appelé le pied qui constitue un solide point d'encrage pour l'animal et assure également sa locomotion et son fouissage (Mouëza, 1971). Les deux valves de *D. trunculus* qui sont formées par contraction de deux muscles adducteurs renferment un corps mou, non segmenté, comprimé latéralement, sans tête différenciée (acéphale) ni appareil masticateur; il est développé d'un manteau; le repli tégumentaire étant constitué de deux lobes latéraux qui secrètent et supportent chacun une valve. Ces lobes palléaux, fusionnés dorsalement entre eux et avec la masse viscérale, délimitent ventralement une vaste cavité palléale en communication avec le milieu extérieur. Ils sont attachés étroitement aux valves le long d'une ligne palléale proche de la marge ventrale de la coquille. Les bords externes du manteau sont soudés donnant ainsi sur l'arrière deux siphons séparés et relativement courts: l'un inhalant, ventral, assurant l'entrée de l'eau dans la cavité palléale, l'autre, exhalant, dorsal faisant sortir l'eau vers l'extérieur. Entre chaque partie du manteau et du corps, s'insère une branchie (Cténidie) de type eulamellibranche qui assure la respiration, participe également à la collecte de la nourriture par la création de courants d'eau à l'intérieur de la cavité palléale, et la filtration (Fisher *et al.*, 1987; Tlili, 2012). Les

particules sélectionnées noyées dans une substance muqueuse, sont transportés vers les palpes labiaux et la bouche, qu'on trouve dans le dos de l'animal. Les particules filtrées sont rejetées, agglutiner dans la cavité du manteau constituant les pseudofèces et seront expulsés vers l'extérieur à travers le siphon exhalant. Après une brève visite de l'œsophage, la nourriture arrive dans l'estomac où elle est digérée par l'action du style cristallin qui broie les particules par un mouvement de rotation et produit des enzymes extracellulaires qui permettent la semi digestion, puis vont à la glande digestive où la digestion intracellulaire est finaliser, enfin ils se répandent dans la cavité du manteau par l'anus, à proximité du siphon exhalant. La gonade est l'organisation anatomique multicellulaire où se développe la lignée germinale qui donnent lieu à des gamètes. Le tissu gonadique se compose des follicules, qui sont en forme de structures acinus bordée par des cellules de fibroblastes (parmi lesquels la lignée germinale mâle ou femelle) et les myocytes, les cellules musculaires, les contractes pour éjecter les gamètes aux gonoductes. L'expulsion des gamètes matures est produite par les cellules ciliaires qui tapissent ces gonoductes (Louzán Pérez, 2015). Les gonades sont également très riches en réserves énergétiques indispensable à l'effort de reproduction (Hamdani & Soltani-Mazouni, 2011).

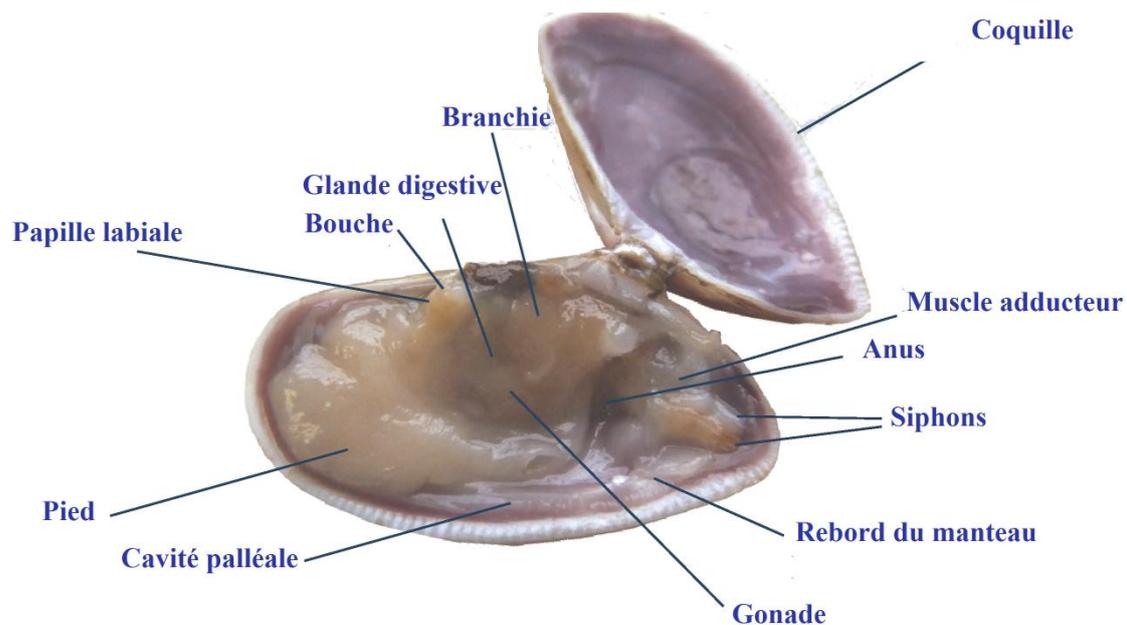


Figure 3. Anatomie générale de *D. trunculus* (Louzán Pérez, 2015).

2.1.2. Habitat et distribution spatiale

D. trunculus est une espèce Atlantico-Méditerranéenne caractéristique des eaux chaudes tempérées, sa présence a été enregistrée en Méditerranée, dans la Mer Noire et du Sénégal aux côtes atlantiques nord de la France (Ramon *et al.*, 1995; Deval, 2009) (Fig. 4).

D. trunculus colonise les plages sableuses caractérisées par un bon tri sédimentaire et est principalement abondante sur les plages de sable fin (Guillou *et*

al., 1991). La présence d'un sédiment grossier (sable moyen ou sable grossier) ou d'une barrière rocheuse exclue la présence de ce bivalve (Bayed, 1998). De ce fait, *D. trunculus* est également considérée comme étant une espèce dépendante des variations de la taille des grains de sable particulièrement dans les premières phases de développement des juvéniles (Alexander *et al.*, 1993; de La Huz *et al.*, 2002; La Valle *et al.*, 2011). Sa distribution en fonction de la profondeur est de 0 à 2 mètres en Méditerranée et entre 0 et 6 mètres sur les côtes atlantiques. Elle est présente en grand nombre, enfouie de 5 à 15 cm dans le sédiment à la surface duquel seuls les siphons affleurent (**Fig. 5**). Sa distribution est limitée aux plages à hydrodynamisme moyen à fort, généralement au niveau des zones intertidale et subtidale peu profondes des plages sableuses (De La Huz *et al.*, 2002, La Valle, 2005; Beldi, 2007).

D. trunculus présente une distribution spatiale où les plus jeunes individus occupent généralement le haut des plages. La répartition se fait ensuite selon un gradient croissant de taille lorsque l'on va vers les niveaux les plus bas, les individus les plus grands colonisent ainsi les espaces correspondants à la limite inférieure de la répartition de l'espèce. Les secteurs majoritairement occupés par les adultes sont très souvent moins denses en individus que ceux colonisés par les juvéniles (Ansell & Lagardère, 1980). Les raisons avancées pour expliquer cette distribution concernent les courants et l'hydrodynamisme qui poussent les larves, passives, sur les parties les moins profondes, alors que les individus grandissant en taille et en capacité de déplacement, colonisent les zones les plus profondes, diminuant ainsi la compétition pour la nourriture et la densité des populations (Lastra *et al.*, 2002). Ce schéma général de distribution peut être temporairement remis en cause, notamment les années de fort recrutement, ou localement perturbé à proximité des zones de résurgence ou suite au remaniement des sédiments dans des secteurs exposés aux vagues et à la houle (Marobin *et al.*, 2007). *D. trunculus* est considérée comme un excellent et rapide enfouisseur grâce à la morphologie particulière de sa coquille qui facilite sa pénétration dans le sédiment (Ramon *et al.*, 1995; Marcomini *et al.*, 2002). Cette espèce, présente une grande capacité de résistance aux variations des facteurs physico-chimiques du milieu dans la mesure où ces variations ne sont pas trop brutales (Marobin *et al.*, 2007).

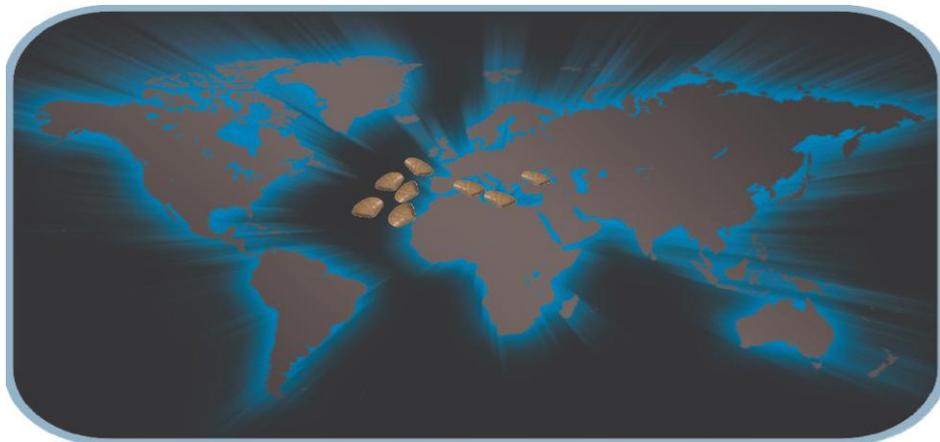


Figure 4. Distribution géographique de *D. trunculus* (Louzán Pérez, 2015).



Figure 5. Localisation de *D. trunculus* dans son biotope (Photo personnelle).

2.1.3. Régime alimentaire

Les Donacidae sont des filtreurs suspensivores qui filtrent l'eau de mer et se nourrissent principalement de phytoplancton et de particules en suspension de matière organique. Cela détermine la distribution de ce groupe qui habite normalement les zones où l'hydrodynamisme est plus ou moins élevé permettant la présence de particules en suspension et empêchant la sédimentation rapide de la matière organique (Manca-Zeichen *et al.*, 2002). L'haricot de mer sélectionne les éléments par la taille et non pas selon leur nature (plancton, bactéries, particules assimilables). Elle absorbe les particules en suspension les plus fines (suspensivore) ou récolte celles déposées sur le sédiment grâce à son siphon allongé (dépositivore) (Mouëza & Chessel, 1976). Cette espèce assure ces échanges avec le milieu extérieur par une circulation constante d'eau véhiculant nourriture et oxygène à travers la cavité palléale ce qui permet la collecte des particules en suspension (Degiovanni & Mouëza, 1972).

2.1.4. Reproduction et distinction des sexes

D. trunculus est une espèce gonochorique dont la glande génitale est localisée au-dessus du pied (Fischer *et al.*, 1987). Cette espèce ne présente aucun signe extérieur de dimorphisme sexuel durant la phase de repos sexuel et la distinction des sexes est donc impossible (Gaspar *et al.*, 1999). Toutefois, à maturité, les sexes sont bien reconnaissables à l'œil nu, et la distinction repose sur la couleur de la gonade, elle est colorée en bleu nattier par pigmentation du vitellus chez la femelle, et à aspect grenu blanc crème, plus finement lobée chez le mâle (Mouëza & Freniel-Renault, 1973; Manca Zeichen *et al.*, 2002) (**Fig. 6**). La maturité sexuelle est atteinte durant la première année de vie (Gaspar *et al.*, 1999). La taille des individus de la première maturité sexuelle est variable selon les régions, elle a été estimée à environ 16 mm de longueur sur les côtes algériennes (Mouëza & Frenkiel-Renault, 1973).

Le cycle de reproduction est rythmé par les facteurs climatiques saisonniers, et est déclenché par des variations brutales de la température et/ou de la salinité; il peut aussi être déclenché par d'autres facteurs tels que le bloom phytoplanctonique ou la présence dans l'eau de gamètes d'individus de la même espèce (Gouletquer, 1997). La période d'activité sexuelle présente une période de repos durant l'automne et une

période d'activité qui débute en hiver et qui se termine en été (Mouëza, 1971; Aouadene, 2003; Hamdani & Soltani-Mazouni, 2011; Hamdani, 2013; Hamdani *et al.*, 2014; Bensouda, 2015; Hafsaoui *et al.*, 2016). D'après l'étude histologique menée sur les gonades dans le golfe d'Annaba (Hamdani, 2013), le cycle de reproduction est décrit comme suit:

La période de repos, débute en Septembre jusqu'au mois de Novembre où 100% des individus sont au stade 0. Cette phase est marquée par la réorganisation du tissu gonadique (après la ponte). La période d'activité sexuelle s'étale de Décembre à Août:

-De Décembre à Février: reprise de l'activité sexuelle, les individus sont au stade I et II du cycle; une phase de multiplication des cellules germinales par mitoses successives, et de développement des tubules gonadiques.

-Du mois de Mars au mois d'Août (Stade III): maturation et émission des gamètes, deux pontes ont lieu, la première commence au mois de Mars, et la seconde se déroule au mois Août. L'émission des gamètes nécessite une grande consommation d'énergie et d'oxygène, En effet, pendant cette période, la demande énergétique est à son maximum (Delaporte, 2005) et entraîne un affaiblissement général des individus, qui se concrétise par une importante perte de poids (19 à 27 % du poids sec) (Marobin *et al.*, 2007).

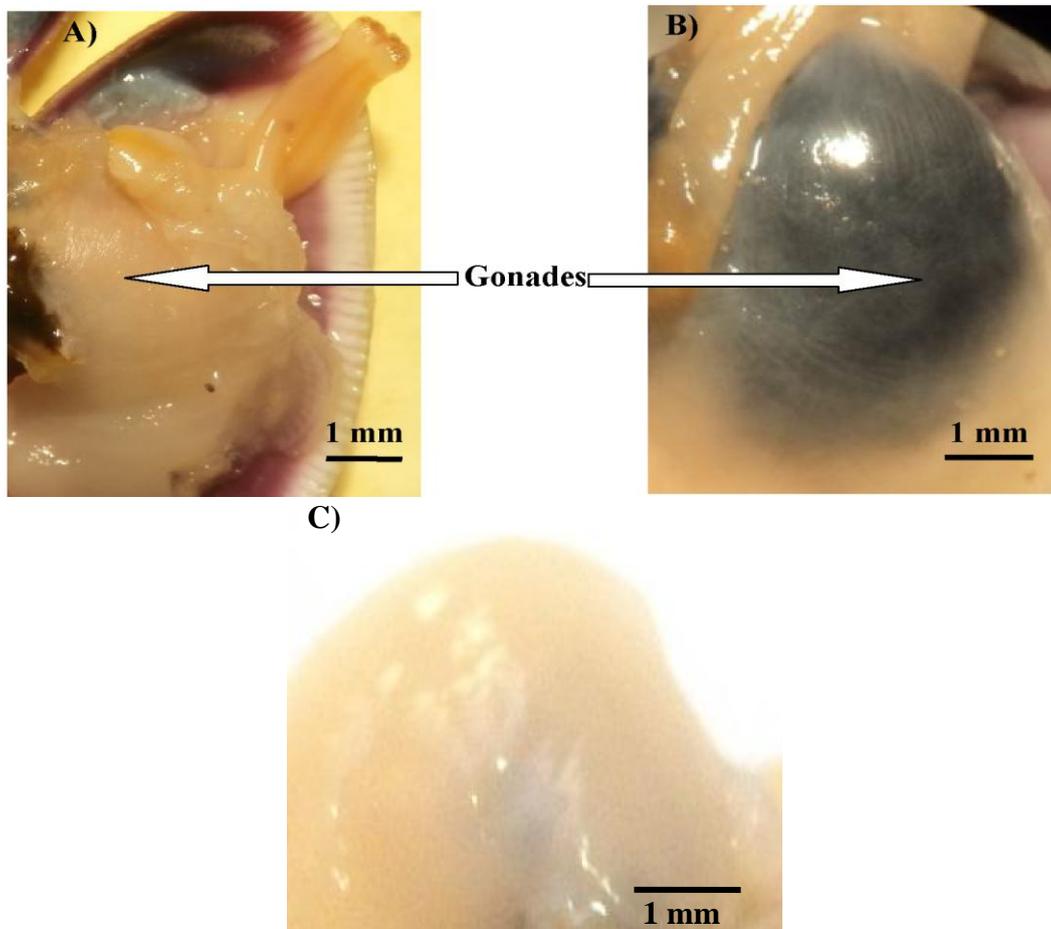


Figure 6. Gonade de *D. trunculus* en période de reproduction A): mâle, B): femelle, et C): en période de repos sexuel (Photo personnelle).

2.1.5. Cycle de vie

Les gamètes mâles et femelles de *D. trunculus*, sont libérés dans le milieu marin à travers le siphon exhalant, où les œufs sont fécondés (fécondation externe). Après l'apparition de l'œuf, le développement des larves est indirect par différents stades larvaires planctoniques (**Fig. 7**). Le premier est la trocophore est muni d'une couronne ciliée et se développe au détriment du jaune. La larve D se nourrit même de phytoplancton, puis la larve véligère est formée; présence d'un velum, une sorte de voile cilié déployable hors de la coquille pour capturer sa nourriture, le temps pour que commence à se développer le pied avant la disparition du voile (larve pédiveligère). Après un mois environ, la métamorphose se produit, le voile disparaît complètement, les branchies apparaissent, et les bivalves passent de la vie pélagique à la vie benthiques. Enfin, la métamorphose s'achève par la sécrétion d'une coquille définitive (post-larve). La production des gamètes chez les post-larves signifie la fin du développement larvaire (Adultes) (Louzán Pérez, 2015).

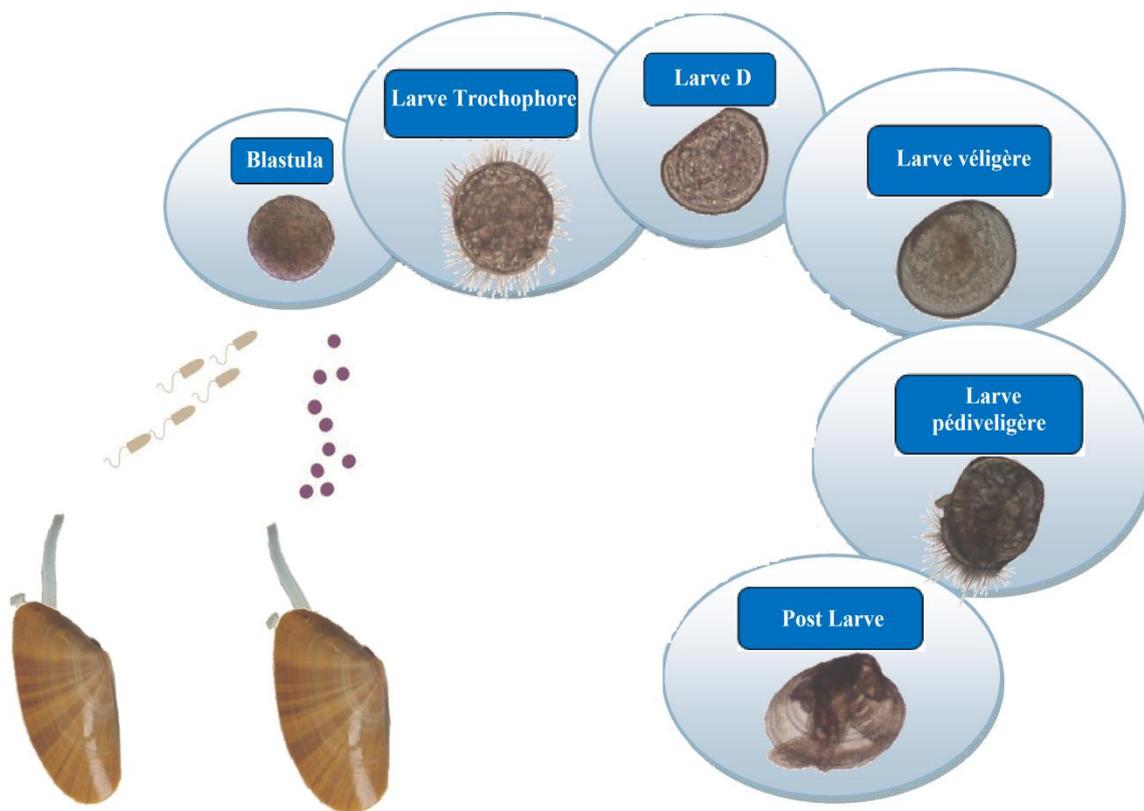


Figure 7. Cycle de vie de *D. trunculus* (Louzán Pérez, 2015).

2.2. Présentation du site d'échantillonnage

Le golfe d'Annaba est situé à l'extrême Nord-Est du littoral algérien, limité par le Cap Rosa ($8^{\circ}15'$ E et $36^{\circ} 58'$ N) à l'Est, et par le Cap de Garde ($7^{\circ} 16'$ E et $36^{\circ} 58'$ N) à l'Ouest (**Fig. 8**). Il s'étend sur une longueur d'environ 40 km, avec une profondeur maximale de 65 m. Divers oueds se déversent dans la baie, parmi les plus importants figure l'oued Mafrag à l'Est. Ces oueds apportent des matières minérales

et organiques de différentes origines terrigène, agricole, domestique et industrielle (Khelifi-Touhami *et al.*, 2006; Ounissi, 2007). De plus, la zone reçoit d'autres rejets des effluents urbains (Khammar, 2007) et industriels de plusieurs usines installées sur la côte, en particulier les produits phytosanitaires de FERTIAL près de la rive au Sud du golfe (Saker, 2007).

Le prélèvement des échantillons a été effectué au niveau du site El-Battah ($36^{\circ} 50' N$ et $7^{\circ} 56' E$) qui se trouve à l'Ouest de l'oued Mafrag, entre la plage de Chatt et le Cap Rosa (Fig. 9); il est constitué de sables moyens purs. Cette zone d'étude est caractérisée par son éloignement des sources de pollution potentielles et apparentes, et, est soumise à un régime hydrodynamique important, ce qui contribuerait à la dilution des polluants. En effet, les courants dans le golfe d'Annaba, présentent à son ouverture, après le Cap de Garde, une circulation orientée vers l'Est avec des vitesses fluctuantes selon les saisons pouvant atteindre 0,5 à 1 m/s. Ce courant part de la face Sud Est du Cap de Garde en direction de l'embouchure de l'oued Mafragh (Khati Hadj-Moussa, 2009).

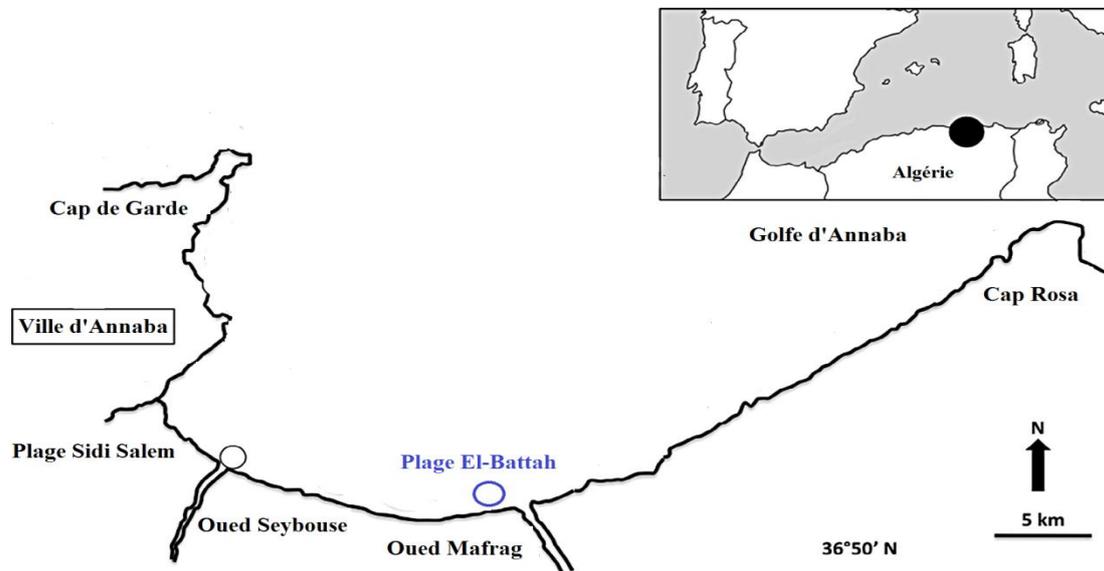


Figure 8. Localisation du site El Battah dans le golfe d'Annaba (Belabed *et al.*, 2013).



Figure 9. Photographie de la plage El Battah (Photo personnelle).

2.3. Collecte et élevage

Les expérimentations ont été effectuées durant trois années (2013, 2014, 2015), au cours de la période de reproduction printanière (Mars) et la période de repos sexuel (Novembre) de chaque année. La collecte de *D. trunculus* est effectuée à l'aide d'une grande époussette appelée communément le « cope » ou le « tellinier », qui comporte deux parties, une partie métallique composée de deux arceaux réunis, et d'une tôle dentée en métal sous forme de peigne supportant des dents d'un nombre et d'une longueur variable; et d'une partie constituée d'un filet attachée à l'armature métallique ayant pour rôle d'accumuler et de stoker les haricots. La collecte est effectuée par un pêcheur menu d'un cope attaché autour de sa taille par une ceinture appelée baudrier ou sangle. Le pêcheur tout en ce déplaçant vers l'arrière racle le sable grâce à la tôle dentée récoltant ainsi les haricots qui seront récupérés dans le filet (**Fig. 10**) (Manca-Zeichen *et al.*, 2001; Gaspar *et al.*, 2002).

Les individus de *D. trunculus* sont transférés au laboratoire dans des bacs en plastiques contenant de l'eau de mer dans les heures qui suivent leurs pêches, pour être élevés au laboratoire. 100 individus dont la taille moyenne est d'environ 25 ± 2 mm, sont placés dans un aquarium (capacité de 50 à 80 L), contenant 25 L d'eau de mer, et quelques centimètres de sable, muni d'une pompe à air (Nirox X5) (**Fig. 11**). Lors de la période de reproduction, les sexes sont d'abord séparés, avant de les placer dans les aquariums. Les organismes ont été acclimatés pendant 48h (Belabed & Soltani, 2013) avant d'être exposés au cadmium.

Les paramètres physico-chimiques de l'eau de mer ont été relevés à l'aide d'un multiparamètre (Multi 340 i, Germany). La température, le pH, la salinité et l'oxygène dissous ont été considérés. Les moyennes des trois années d'études sont représentées dans le **tableau 1** ci-dessous.



Figure 10. Le cope (A) et le déroulement de l'opération de pêche (B) (Photo personnelle).



Figure 11. Elevage de *D. trunculus* au laboratoire (Photo personnelle).

Tableau 1. Paramètres Physico-chimiques de l'eau de l'élevage de *D. trunculus*.

		Température (°C)	Salinité (g/L)	pH	Oxygène dissous (mg/L)
Repos	Exposition	13,22± 0,66	30,63±0,75	7,60±0,39	1,52±0,15
	Restauration	13,33± 0,16	31,89±0,38	7,45±0,24	1,63±0,08
Reproduction	Exposition	15,75± 1,02	33,33±0,87	8,36±0,45	1,43±0,20
	Restauration	16,20± 0,61	33,38±0,84	7,97±0,13	1,50±0,28

2.4. Présentation du cadmium

Le Cadmium (Cd) est un métal blanc argenté avec des teintes de bleue pâle (**Fig. 12 A**), appartenant à la famille des métaux de transition. Le Cd élémentaire a un numéro atomique de 48 et une masse atomique de 112,4 g/mol. La valence Cd^{2+} est la valence la plus souvent rencontrée dans l'environnement (McLaughlin et Singh, 1999).

Ayant des propriétés physico-chimiques proches de celle du zinc, il fond à 320,9 °C et bout à 767 °C, lors de son ébullition, il se dégage des vapeurs jaunes toxiques. Sa densité est de 8650 kg/m³, il est ductile (résistant à l'étirement), malléable et résiste à la corrosion atmosphérique, ce qui en fait un revêtement de protection pour les métaux ferreux, il s'oxyde très peu à température ambiante et brûle dans l'air en donnant l'oxyde anhydre CdO (Adriano, 1986).

Le Cd est un élément rare et réparti uniformément dans la croûte terrestre, où sa concentration moyenne est de 0,15 à 0,20 mg/kg (Fleischer, 1974; Hiatt, 1975), il est géochimiquement liées au zinc dans les minéraux, à raison de 0,1% à 1% sous forme d'impuretés, il n'existe pas de minerai utilisable industriellement pour l'extraction du cadmium. En faite, le Cd peut être considérés comme un sous produit de l'extraction de minerais de zinc, de plomb, et accessoirement de cuivre. Les minerais les plus importants sont la greenockite (CdS) (**Fig. 12 B**) ou l'otavite (CdCO₃) (Verge, 2006). La production mondiale annuelle du Cd est de 20,000 tonnes (Achard-Joris, 2005), il est utilisé pour protéger l'acier contre la corrosion ou encore

comme stabilisant pour les plastiques, et comme pigment dans les produits céramiques (Jarup, 2002).

On le retrouve comme contaminant dans les sédiments, l'air, l'eau (Waisberg *et al.*, 2003), dans l'agriculture, les rejets industriels, et la fumée de cigarette (Fassett, 1975; He *et al.*, 2005; Jarup, 2003; Trinchella *et al.*, 2006). Le traitement des ordures ménagères reste le premier secteur responsable d'émissions du Cd. Ce métal est classifié comme un carcinogène de type I par l'agence internationale pour la recherche sur le cancer et le programme national de toxicologie USA (Who, 1992; IARC, 1993; US NTP, 2000; Oh *et al.*, 2006). Les sources d'exposition au Cd les plus importantes chez l'homme sont l'alimentation (coquillages, poissons, et végétaux dont les légumes riches en fibres), et le tabagisme. L'absorption intestinale du Cd chez l'homme est d'environ 30 µg/jour en fonction de l'âge, le sexe, ainsi que le régime alimentaire (Jarup, 2002; Satarug & Moore, 2004). Le Cd est un élément rencontré en milieu aquatique sous diverses formes physiques (dissoute, colloïdale, particulaire) et chimique (minérale ou organique). Un ensemble de variables physicochimiques du milieu (salinité, pH, caractéristique sédimentologique, concentration en chlorure...) gouvernent les transformations du Cd dans l'environnement (Gonzalez *et al.*, 1999; Chiffolleau *et al.*, 2001). Dans l'eau de mer, le Cd s'associe aux ions chlorures, de façon variable selon la salinité (Cossa & Lassus, 1989). Byrne *et al.* (1988) ont précisé qu'en milieu aquatique 97 % du Cd total était sous forme de complexe cadmium-chlorure ($CdCl^+$ et $CdCl_2$ en prédominance).

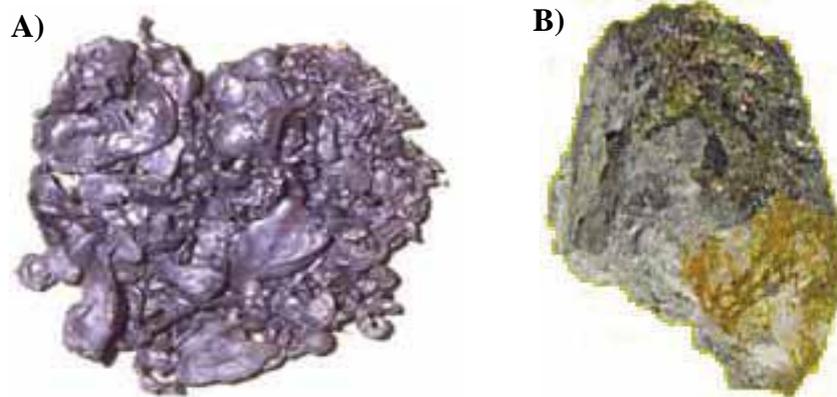


Figure 12. Aspect du cadmium solide (A) et Greenockite ou sulfure de cadmium (B) (Verge, 2006).

2.5. Détermination des paramètres de létalité du cadmium

L'objectif de ces bioessais est de déterminer les concentrations sublétales 10 et 25 (CL_{10} et CL_{25-96h}), et les concentrations létales 50 et 90 (CL_{50} et CL_{90-96h}) du Cd à l'égard des adultes de *D. trunculus* en période de repos sexuel (sexes non séparés) et durant la reproduction (sexes séparés). Les individus de *D. trunculus* sont contaminés par du chlorure de cadmium ($CdCl_2$, Sigma, USA), dissous dans de l'eau de mer aux concentrations finales de 5, 7,6 et 10 mg/L. En période de repos, à chaque

concentration correspondent un aquarium et un pour les témoins, en période de reproduction, deux aquariums, un pour les mâles et l'autre pour les femelles, ainsi que deux pour les témoins. Trois répétitions de 100 individus sont effectuées par série. Les animaux sont quotidiennement observés à la même heure, pendant toute la durée de l'expérience (96h). Les animaux morts ont leurs deux valves béantes, et la mort est certaine lorsque les valves restent ouvertes même après avoir essayé de les fermer par pression. Les individus morts sont aussitôt enlevés des aquariums.

2.5.1. Mortalité observée

Le pourcentage de mortalité observée chez les bivalves traités par le cadmium à différentes concentrations ainsi que les témoins est déterminé selon la formule suivante:

$$\text{Mortalité observée} = \frac{\text{Nombre des bivalves morts après traitement}}{\text{Nombre totale des bivalves traités}} \times 100$$

2.5.2. Mortalité corrigée

Le pourcentage de mortalité observée est corrigé par la formule d'Abbott (1925) qui permet d'éliminer la mortalité naturelle.

$$\text{Mortalité corrigée} = \frac{\text{Mortalité observée chez les traités} - \text{mortalité observée chez les témoins}}{100 - \text{mortalité observée chez les témoins}} \times 100$$

2.5.3. Transformation angulaire des données

Les pourcentages de mortalité corrigée subissent une transformation angulaire selon Bliss (1938) cité par Fisher & Yates (1957). Les données normalisées font l'objet d'une analyse de la variance à un critère de classification; suivie par le classement des concentrations par le test de Tukey.

2.5.4. Analyse des probits

Les pourcentages de mortalité corrigée subissent une transformation en probits (y), et les concentrations en logarithme décimal (x) (Fisher & Yates, 1957). Le calcul de la droite de régression $y = ax + b$, permet l'obtention des CL_{10} , LC_{25} , CL_{50} et CL_{90} (Finney, 1975).

2.5.5. Détermination des intervalles de confiance

La méthode de Swaroop *et al.* (1966) précise l'intervalle de confiance (IC) avec une probabilité de 95 %:

-Limite supérieure = $CL_{50} \times FCL_{50}$

-Limite inférieure = CL_{50} / FCL_{50}

Deux paramètres sont aussi nécessaires:

-Le 1^{er} paramètre est le S (Slope), donné par la formule suivante:

$$S = (CL_{84} / CL_{50} + CL_{50} / CL_{16}) / 2$$

-Le 2^{ème} paramètre est la FCL50 donnée par la formule suivante:

$$FCL_{50} = \text{Anti log } C$$

$$C = \log S \times 2,77 / \sqrt{N}$$

S: Slope

N: Nombre total des bivalves testés

2.6. Exposition au cadmium et prélèvement des gonades

Après estimation des concentrations sublétales 10 et 25 (CL_{10} et CL_{25-96h}), et les concentrations létales 50 et 90 (CL_{50} et CL_{90-96h}) du cadmium à l'égard des adultes de *D. trunculus*. Nous avons choisi d'appliquer la CL_{10} et CL_{25-96h} (sous forme de $CdCl_2$), afin d'évaluer l'effet sublétale du Cd sur la composition biochimique des gonades, au cours **du repos sexuel (sexes confondus)** et de **la reproduction (sexes séparés)**, et en deux phases successives lors de chaque période, la première dite **phase d'exposition (0, 48 et 96h)** suivie d'**une deuxième phase de dépuración** (transfert dans l'eau de mer non contaminée) pendant **96h**. La fin de l'exposition (96h) au cadmium est considérée comme 0 jour pour la période de dépuración. Pour chaque expérience les individus non traités ont été utilisés comme témoins.

Avant d'entamer la dissection nous avons pris toutes les précautions afin d'éviter les risques de contamination. Lors de la dissection, nous avons prélevé une partie de la gonade, à l'aide d'un couteau et d'une pince stérilisé, puis nous avons procédé ensuite à la pesée des tissus grâce à une balance de précision et nous les avons placé dans des tubes eppendorfs avec la solution de conservation adéquate (réserves énergétiques et acides nucléiques), et parfois à sec (biomarqueurs et oméga-3), avant de les stocker à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour les différents dosages biochimiques prévus. Le prélèvement avait lieu à 0, 48 et 96h lors de chaque période et chaque phase, sauf pour APGI oméga-3 (0 et 96h).

2.7. Analyses des biomarqueurs

2.7.1. Extraction et dosage des protéines carbonylées

La détermination des protéines carbonylées se fait par spectrophotométrie, Le dosage est basé sur la réaction du 2,4- dinitrophenylhydrazine (DNPH) avec les groupements carbonyles formant des 2,4- dinitrophenylhydrazones de couleur jaune, le DNPH se fixe aux groupements carbonyles mole à mole. Les teneurs en dérivés

carbonylés sont déterminées selon la méthode de Levine *et al.* (1990) modifiée par Mesquita *et al.* (2014). Un dosage des gonades individuel a été effectué, le fragment de tissu gonadique (50 mg environ) est homogénéisé dans 1 ml du tampon phosphate (50 mM, pH 7,4) contenant 200 µl de l'Éthylène Diamine Tétracétique (EDTA; 1mM) puis incubé pendant 15 min à température ambiante. Un blanc (sans DNPH) a été réalisé. L'ensemble est centrifugé (14000 rpm pendant 10 min). Pour le calcul des proportions des protéines carbonylées, 100 µl de l'homogénat sont prélevés pour être utilisés dans le dosage des protéines totales (Bradford, 1976).

500 µl d'homogénat sont mélangés avec 500 µl d'une solution à 10 mM de 2,4 dinitrophénylhydrazine (DNPH) dans l'acide chlorhydrique HCL (2 M), puis 100 µl de streptomycine sulfate (10 % dans 50 mmol/L de tampon HEPES, pH 7,2) est ajoutée pour précipiter les acides nucléiques. L'ensemble est incubé pendant 1h à température ambiante et à l'obscurité en agitant toute les 10 à 15 min. Ensuite, du TCA (0,5 ml à 20 %) est additionné dans chaque tube pour précipiter les protéines. Après homogénéisation au vortex, les tubes sont centrifugés à 10000 rpm pendant 5 min. Le 2,4-DNPH n'ayant pas réagi est éliminé par 3 lavages successifs du culot dans un mélange éthanol/éthyle acétate (1:1 v/v), puis centrifugé à nouveau à 6 000 rpm pendant 10 min. Le culot est remis en suspension dans 0,5 ml de solution de guanidine (6 M) est incubé pendant 15 min à 37 °C puis tout matériel insoluble a été enlevé par une centrifugation à 10000 rpm pendant 5 minutes afin d'éliminer les débris insolubles. L'absorbance du surnageant a été lue à 370 nm et les résultats sont exprimés en mM par mg de protéines grâce à l'utilisation du coefficient d'absorbance molaire de la 2,4 dinitrophénylhydrazone formée ($22\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Le contenu en carbonyles est ensuite normalise par la concentration finale de protéines totales mesurée au spectrophotomètre (WPA). Les teneurs en protéines sont estimées par la méthode colorimétrique au bleu de Coomassie (Bradford, 1976). La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (BSA) contenant 1 mg/ ml (**Tableau 2, Fig. 13**).

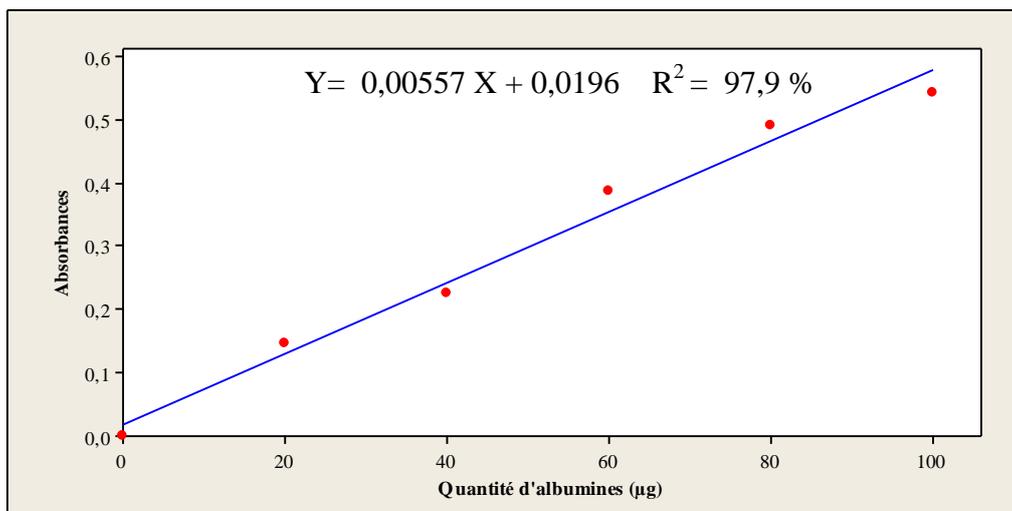


Figure 13. Dosage des protéines: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumines (µg) (R^2 coefficient de détermination).

Tableau 2. Dosage des protéines: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Quantité de BSA (µg)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

2.7.2. Technique d'extraction et dosage des métallothionéines

Les métallothionéines (MTs) sont quantifiées en évaluant le contenu en résidus –SH par une méthode spectrophotométrique utilisant le réactif d'Ellman (DTNB: 5,5-dithiobis 2 acide nitrobenzoïque) (Ellman, 1959). Une gamme étalon est préparée au préalable en utilisant une courbe de référence avec plusieurs concentrations de la forme réduite du glutathion (GSH) portant un groupement thiol –SH (Viarengo *et al.*, 1997). Les MTs contiennent un nombre important de cystéines (environ 20 à 30 %), la détermination des MTs est fondée sur la détection des groupements SH permettant une évaluation plus sélective de ces métalloprotéines.

La réaction entre la solution DTNB, et les groupements SH des protéines produit des quantités stœchiométriques de TNB (thionitrobenzoate), un composé de couleur jaune qui absorbe à 412 nm. Les étapes d'extraction et de dosage des métallothionéines ont été effectuées d'après la méthode de Viarengo *et al.* (1997). Le taux des MTs est exprimé par rapport à la quantité de protéines totales dans notre échantillon.

2.7.2.1 Préparation de la fraction enrichie en métallothionéines

Les gonades (pool de quatre individus), sont prélevées, pesées puis rincées avec une solution physiologique NaCl (9 %). L'homogénéisation est effectuée à froid dans 3 volumes d'une solution de lyse (1,5 ml) [17,115 g saccharose (0,5 M), 1,66 ml tampon Tris-HCl (20 mM, pH 8,6, 300 µl Leupeptine (0,006 mM), et 10 µl β-Mercaptoéthanol (0,01 %) comme agent réducteur), q.s.p 100 ml d'eau distillé], et au moment de l'extraction on rajoute 150 µl PMSF (0,5 mM) comme anti protéolytique, Après broyage mécanique puis homogénéisation aux ultrasons (SONIFER B-30 SONIFER B-30), l'homogénat est centrifugé (14500 rpm, 20 min à 4°C). 0,5 ml du surnageant obtenu est conservé à (-20° C) pour le dosage des protéines.

Une fraction aliquote de 0,5 ml du surnageant précédemment obtenu est ajoutée à un mélange de 0,5 ml d'éthanol absolu et 40 µl de chloroforme, ce mélange est conservé au préalable à -20 °C pour faire précipiter les protéines de haut poids moléculaire. L'ensemble est centrifugé à 7000 rpm durant 10 min à 4 °C. Le surnageant (0,9 ml) obtenu est précipité en présence de 20 µl de HCl (37%) additionné de 3 volumes d'éthanol absolu froid c'est-à-dire 3,3 ml (conservé à -20 °C).

Après incubation (1 heure à -20 °C) le mélange est recentrifugé de nouveau à 7000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Le culot obtenu, contenant les MTs, est lavé avec 1 ml de la solution de lavage (Ethanol, chloroforme et tampon d'homogénéisation;

87/1/12, v/v), inversement à la solution de lyse, ce tampon ne doit pas contenir du β -mercaptoéthanol, et du PMSF) et recentrifugé à 6000 rpm pendant 10 min à 4 °C.

Ajouter au culot 150 μ l d'une solution de NaCl (0,25 M) et 150 μ l d'une solution composée de HCl (1 N) contenant de l'Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) (4 mM) (solution de déstabilisation), agiter jusqu'à la remise en suspension complète de l'échantillon.

2.7.2.2. Dosage des métallothionéines

Le contenu en groupements thiols (-SH) des métallothionéines est évalué en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme standard de référence. Pour cela, une gamme étalon a été réalisée avec une solution GSH (1mg/ml dans du NaCl 0,25 M) (**Tableau 3, Fig. 14**). Les MTs sont quantifiées en utilisant le DTNB [Solution basique: 40 ml de NaCl (5 M), 5,36 g Na_2HPO_4 , q.s.p 100 ml avec de l'eau distillé, Solution acide: 40 ml de NaCl (5 M), 3,12 g NaH_2PO_4 , q.s.p 100 ml avec de l'eau distillé, et ajuster à pH 8 au pH mètre, enfin ajouter 17 mg de DTNB à 100 ml de ce tampon] comme réactif, et exprimée en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines.

Les protéines totales utilisées pour le calcul des MTs sont estimées par la méthode de Bradford, (1976) décrite précédemment (**Tableau 2, Fig. 13**).

Tableau 3. Gamme étalon de glutathion réduit (GSH).

Tubes	1	2	3	4	5
Solution mère de GSH (μl)	0	20	40	80	100
NaCl 0,25 M (μl)	150	130	110	70	50
HCl 1N, EDTA 4 mM (μl)	150	150	150	150	150
Solution de DTNB (ml)	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
Volume final (ml)	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

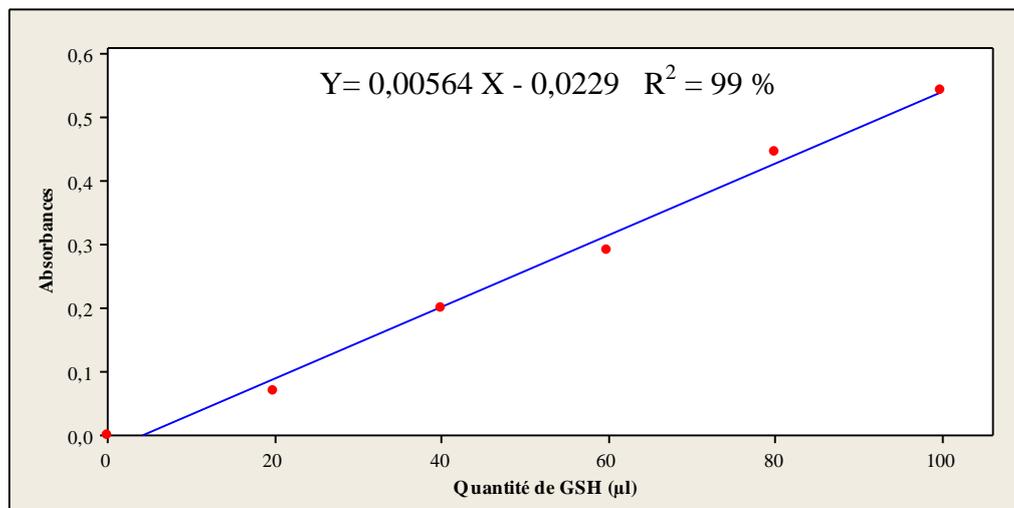


Figure 14. Dosage des MTs: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de GSH (μ l) (R^2 coefficient de détermination).

2.8. Analyse des constituants biochimiques de la gonade

2.8.1. Extraction et dosage des réserves énergétiques (glucides, lipides, et protéines)

L'extraction des différents constituants (protéines, glucides, lipides) est réalisée selon le procédé de Shibko *et al.* (1966) à partir de gonades individuelles de *D. trunculus* conservés dans 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 20 %. Après broyage mécanique puis homogénéisation aux ultrasons (SONIFER B-30), une première centrifugation (5000 rpm/mn, 10 mn) est effectuée et le surnageant I récupéré servira au dosage des glucides totaux. Le culot I reçoit 1 ml du mélange éther/chloroforme (v/v) et après une seconde centrifugation (5000 rpm/mn, 10 mn) le surnageant II sera destiné au dosage des lipides totaux, alors que le culot II est repris dans 1 ml d'hydroxyde de sodium NaOH (0,1 N) et sera utilisé pour la quantification de protéines totales (Fig. 15).

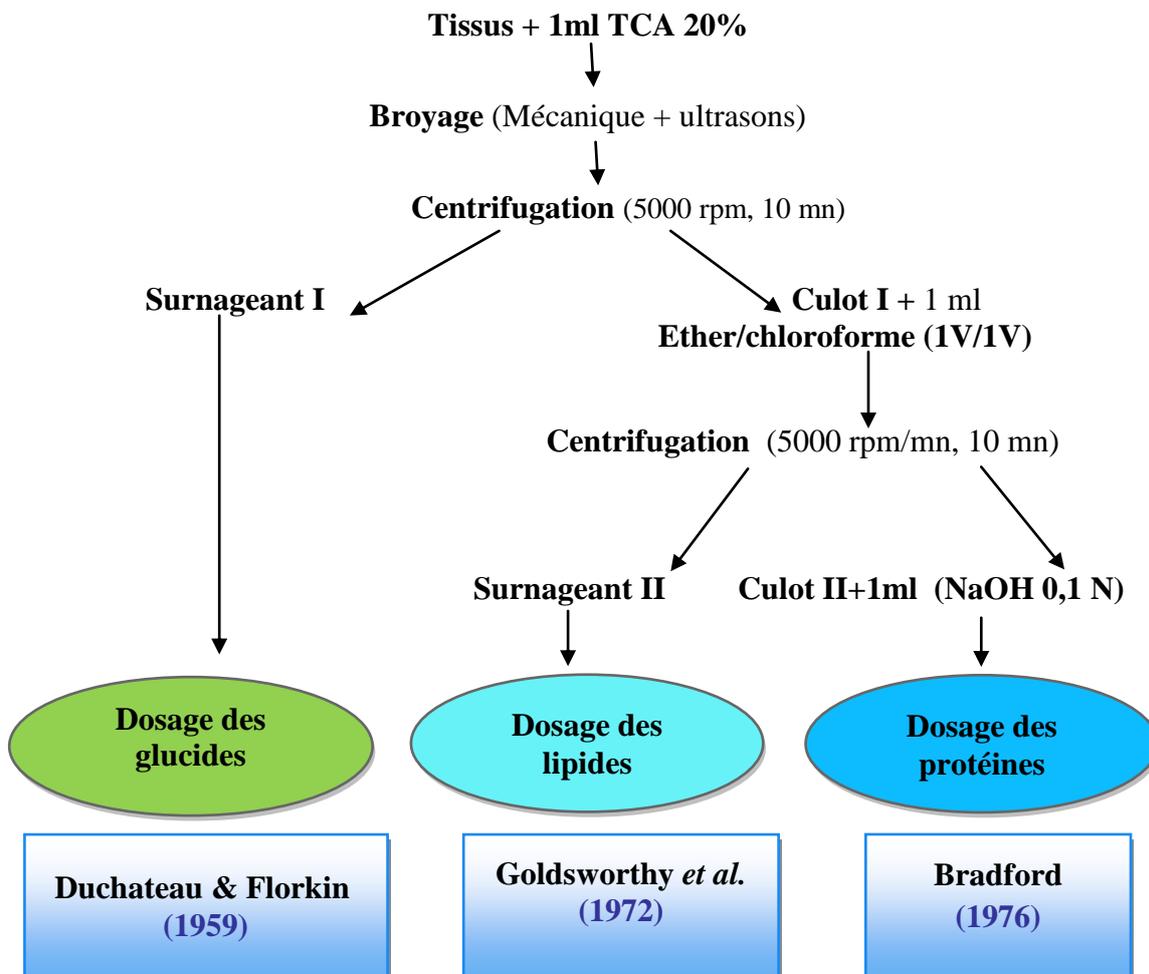


Figure 15. Principales étapes d'extraction des protéines, glucides et lipides (Shibko *et al.*, 1966).

2.8.1.1. Dosage des glucides

Le dosage des glucides est réalisé selon Duchateau & Florin (1959). Cette méthode est basée sur l'addition de 4 ml du réactif anthrone [150 mg anthrone, 75 ml acide sulfurique H₂SO₄ 96 %, 25 ml eau distillée] à 100 µl du surnageant ou de la gamme étalon utilisant une solution mère de glucose (1 g/L) comme standard. Après chauffage au bain marie (80 °C, 10 mn), il se développe une coloration verte, dont l'intensité est mesurée à une longueur d'onde de 620 nm au spectrophotomètre visible, et qui est proportionnelle à la concentration des glucides totaux (Tableau 4, Fig. 16).

Tableau 4. Dosage des glucides: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Quantité de la solution mère de Glucose (µl)	0	20	40	60	80	100
Quantité d'eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif d'anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

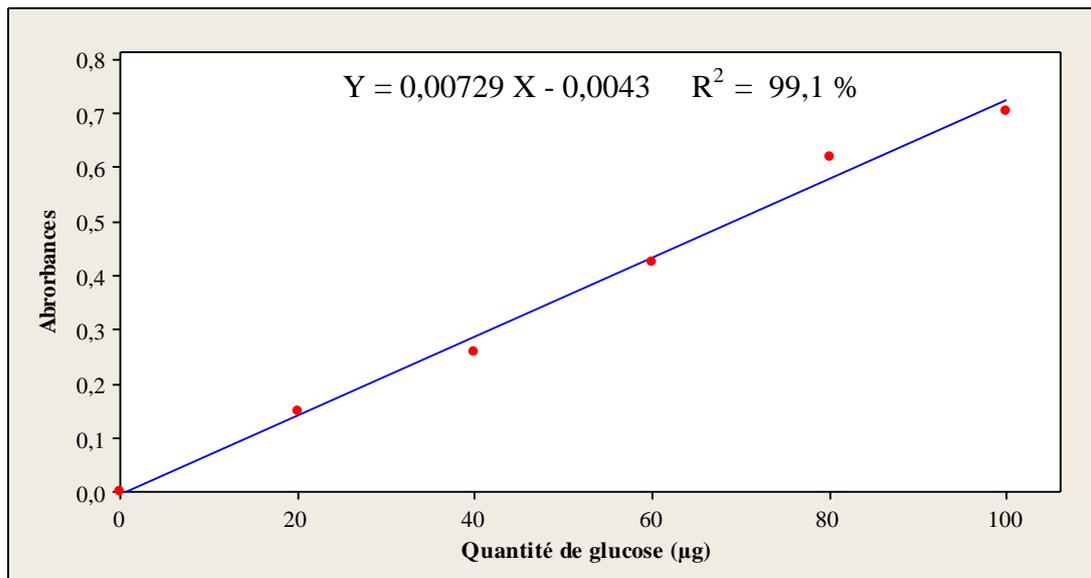


Figure 16. Dosage des glucides: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de glucose (µg) (R^2 coefficient de détermination).

2.8.1.2. Dosage des Lipides

Le taux de lipides est déterminé selon la méthode colorimétrique de Goldsworthy *et al.* (1972) basée sur la formation d'un complexe chromogène de couleur rose. Cette technique utilise la vanilline [0,38 g vanilline, 55 ml eau distillée, 195 ml acide orthophosphorique 85 %] comme réactif et une solution mère de lipides à 2,5 mg/ml [2,5 mg d'huile de table, 1 ml éther/chloroforme (v/v)] comme standard. Le dosage est réalisé sur des prises aliquotes de 100 µl des extraits lipidiques ou de la

gamme étalon auxquelles on ajoute 1 ml d'acide sulfurique (96 %). Après agitation et chauffage dans des bain à sec (100 °C 10 mn), puis refroidissement, 200 µl sont repris auxquels sont ajoutés 2,5 ml du réactif vanilline. Une fois agités et mis à l'obscurité pendant 30 mn, une coloration rose se développe, dont l'intensité est lue à une longueur d'onde de 530 nm (**Tableau 5, Fig. 17**).

Tableau 5. Dosage des lipides: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Quantité de la solution mère de lipides (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant Ether/Chloroforme (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif de vanilline (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

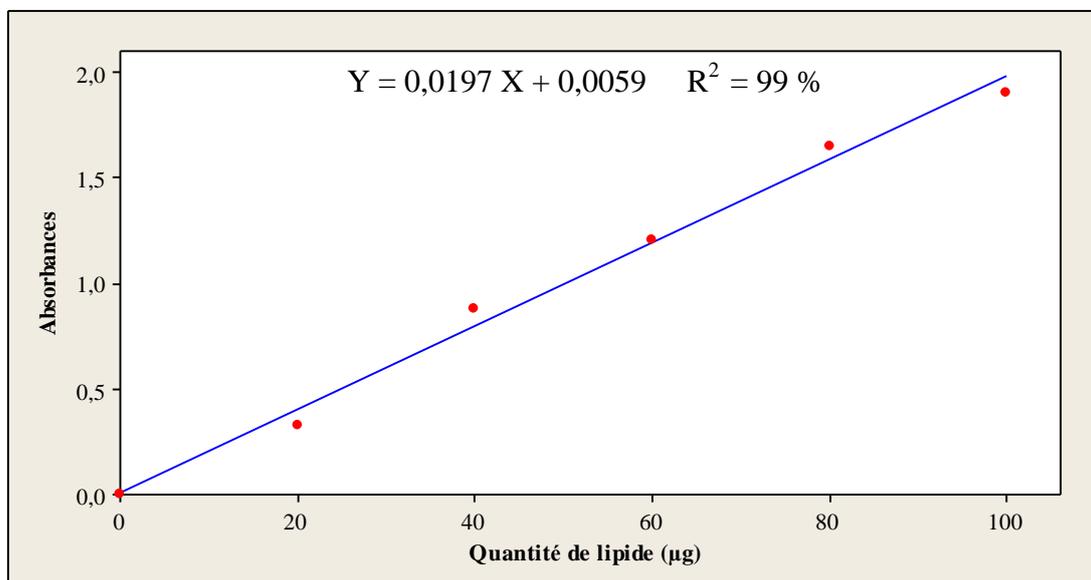


Figure 17. Dosage des lipides: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de lipide (µg) (R^2 coefficient de détermination).

2.8.1.3. Dosage des protéines

Les protéines sont quantifiées selon la méthode de Bradford (1976), qui consiste à additionner une fraction aliquote de 100 µl du surnageant ou de la gamme étalon à 4 ml du réactif colorant bleu brillant de Coomassie (BBC) G250 [100 mg BBC, 50 ml éthanol 95 °C, agitation pendant 2 heures, 100 ml acide orthophosphorique 85 %, q.s.p 1000 ml eau distillée]. La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une protéine standard, l'albumine sérum de boeuf (BSA) (1 mg/ml) (**Tableau 2, Fig. 18**).

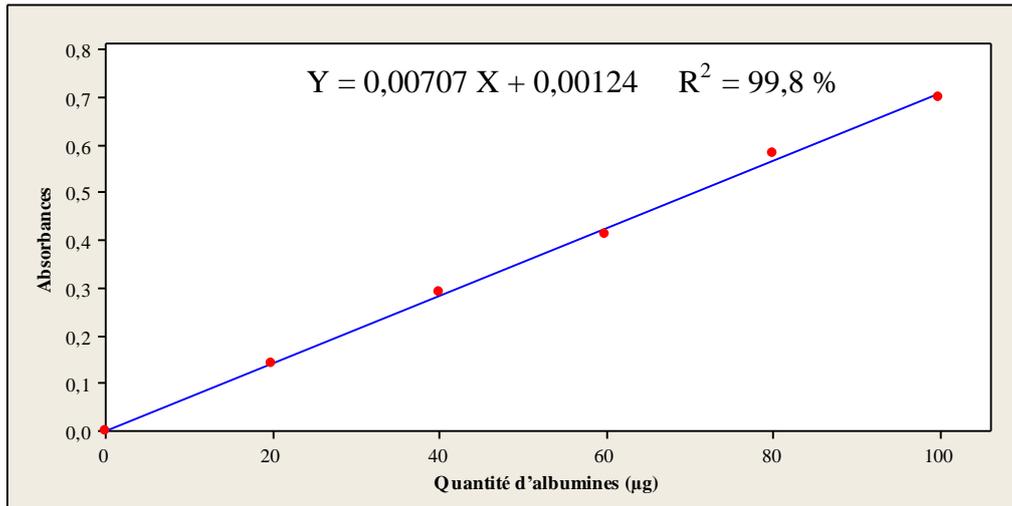


Figure 18. Dosage des protéines: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumines (μg) (R^2 coefficient de détermination).

2.8.2. Méthode d'extraction et dosage des oméga-3

L'extraction des acides gras polyinsaturés (AGPI) gonadiques n-3; l'acide eicosapentaénoïque (EPA; C20:5n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA; C22:6n-3) a été réalisée selon la méthode de Bligh & Dyer (1959) basée sur l'utilisation des solvants organiques pour extraire la totalité des lipides polaires et apolaires dont les oméga-3.

2.8.2.1. Extraction des lipides totaux

Le broyage des gonades individuelles est réalisé grâce à un Potter en verre à piston conique de 15 ml de capacité, dans la solution suivante; [100 μl d'étalon interne C15:0 (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)+ 2 ml de méthanol + 1 ml de chloroforme] (vortex pendant 2 mn) + [1 ml NaCl (2 M) + 1 ml chloroforme + 0,8 ml de NaCl (2 M)] (vortex pendant 5 mn). En respectant un ratio final des solvants 2: 2: 1,8 (v: v: v) de chloroforme: méthanol: NaCl 2 M. Après une centrifugation de 3000 rpm pendant 2 mn, la phase inférieure chloroformique est récupérée dans un tube en verre à joint Téflon (Sovirel) de 10 ml avec une pipette pasteur et une propipette. Les solvants sont ensuite évaporés sous azote afin de récupérer le résidu lipidique à sec.

2.8.2.2. Méthylation ou dérivation des acides gras

La dérivation des acides gras (AG), en abaissant leur point de fusion et en diminuant leur polarité, permet de réduire le temps d'analyse et d'obtenir de meilleures séparations des pics en chromatographie. La dérivation la plus usuelle est l'estérification (**Fig. 19**), surtout sous forme d'esters méthyliques d'AG. L'estérification des AG des lipides est effectuée en deux étapes (saponification puis estérification). La saponification se fait par ajout d'1 ml de NaOH méthanolique 0,5 N (2 g NaOH/100 ml méthanol). Ensuite, une incubation de 20 mn à 80 °C est effectuée, suivis d'un choc thermique pendant 2 mn dans de la glace.

L'estérification: Après refroidissement à température ambiante, 2ml de BF₃ (Boron trifluoride - méthanol) à 14 % sont rajoutés, une seconde incubation de 15 mn à 80 °C est effectuée, suivis encore d'un choc thermique pendant 2 mn dans de la glace.



Figure 19. Principes de l'estérification (ANSES, 2011).

2.8.2.3. Extraction des esters méthyliques

2 ml NaCl saturé à 35 % et 3 ml d'hexane sont rajoutés afin d'extraire les esters méthyliques, après passage au vortex (2 mn), nous avons placé la phase supérieure hénanique dans un tube en verre pour analyse.

2.8.2.4. Equipement et condition de dosage

La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) à Détection à Ionisation de Flamme (DIF) est la méthode d'analyse la plus couramment utilisée pour le dosage des AG (ANSES, 2011). Les esters méthyliques d'AG ont été analysés par CPG en utilisant le chromatographe de marque Clarus 500 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et une colonne capillaire VF-23 ms (30 m x 0,32 mm) (Agilent, Santa Clara, CA, USA), et d'un injecteur split/splitless. Pour l'acquisition des chromatogrammes et de leur retraitement, il est couplé à un ordinateur équipé du logiciel Azur, version 4.0.

Les paramètres de fonctionnement pour la CPG étaient identiques à celles décrites par Budg & Parrish (1998). Les conditions d'analyse sont les suivantes: la température du four est de 85 °C / 1 mn, augmenté à 150 °C à 30 °C / mn, puis on a augmenté à 3 °C / mn à 215 °C. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 3 ml / mn. La température de la colonne a été programmée pour maintenir à 85 °C pendant 0,5 mn, pour s'élever à 195 °C et maintenir pendant 15 mn après la rampe à 40 °C / mn et de tenir à 215 °C pendant 0,75 mn après rampe à 2 °C / mn. La température de l'injecteur est passé de 150 à 250 °C à 200 °C / mn. Le détecteur à ionisation de flamme a été maintenu à 260 °C tout au long de l'analyse. L'ester de méthyle (15: 0) a été utilisé comme étalon interne. L'identification des différents AG a été réalisée par comparaison des temps de rétention relatifs à celles des normes commerciales.

2.8.3. Extraction et dosage des acides nucléiques

Les échantillons (gonades individuelles) sont conservés dans 500 µl d'eau distillée additionnée à 2 µl de phénylméthylsilfonylfluoride (PMSF; 45 mg / 1ml éthanol), puis stockés au congélateur à -20° C. Les principales étapes de l'extraction (Shibko *et al.*, 1966), puis du dosage de l'ARN (Burton, 1956) et ADN (Schneider, 1957) sont résumées dans la **figure 20**.

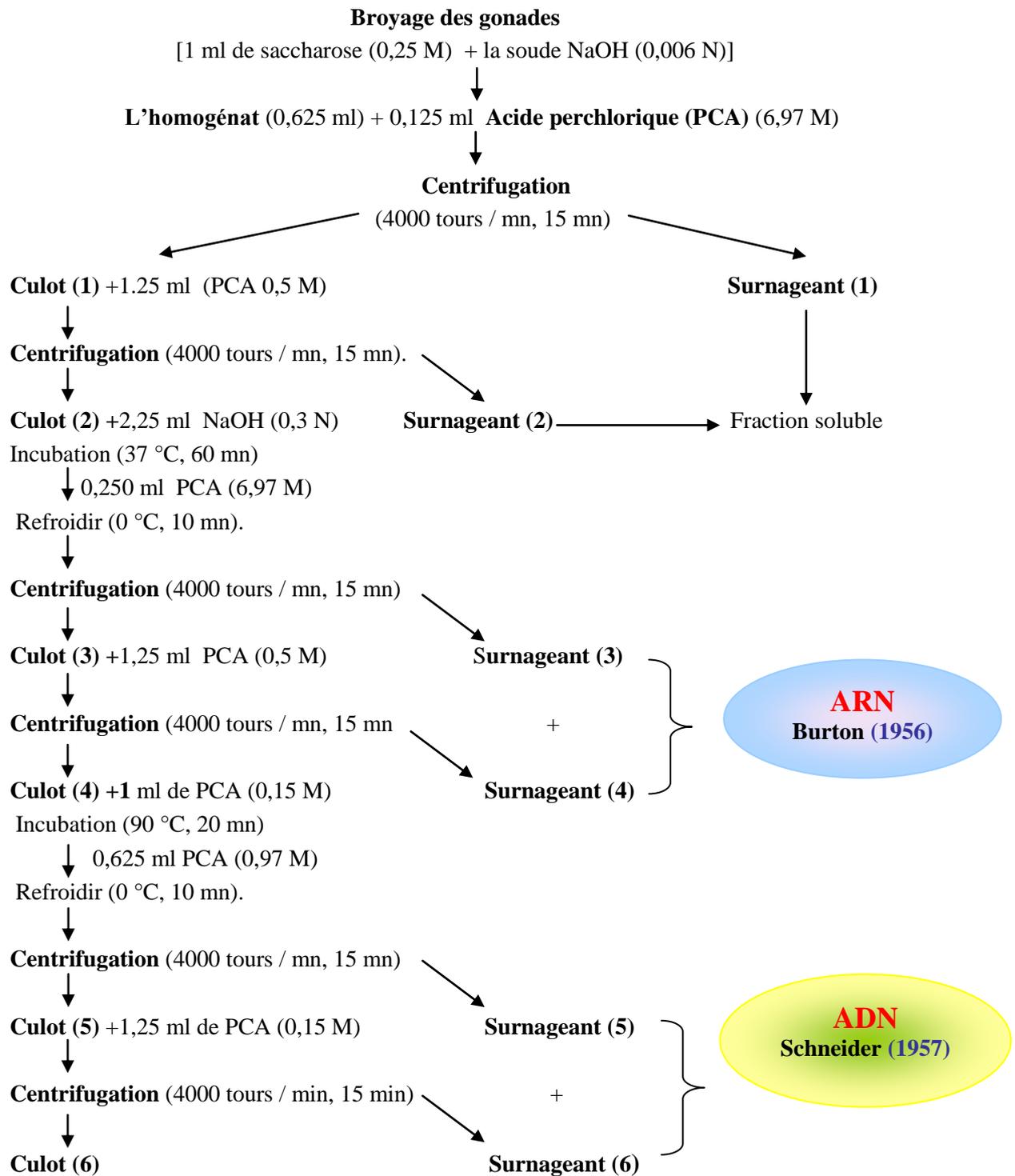


Figure 20. Principales étapes d'extraction des acides nucléiques: ADN, ARN selon Shibko *et al.* (1966).

2.8.3.1. Dosage de l'ARN

L'ARN a été quantifié selon la méthode de Burton (1956) basé sur la réaction de Bial (1902) qui utilise l'orcinol comme réactif (0,5 g de FeCl_3 , 1,5 ml d'orcinol et 100 μl d' HCl 37 %) pour la détection des riboses, et une solution mère (1 mg/ml d'eau distillée) de levure de boulangerie comme standard. Après agitation, les tubes sont chauffés au bain marie à 90 °C pendant 10 mn. Il se forme une coloration bleu clair. Le dosage de l'ARN a été effectué sur des fractions aliquotes 100 μl des extraits biologiques des gonades. Les absorbances sont lues à une longueur d'onde de 660 nm (Tableau 6, Fig. 21).

Tableau 6. Dosage de l'ARN: Réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5
ARN standard (μl)	0	20	40	60	80
Eau distillée (μl)	1,5	1,48	1,46	1,44	1,46
Orcinol (ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

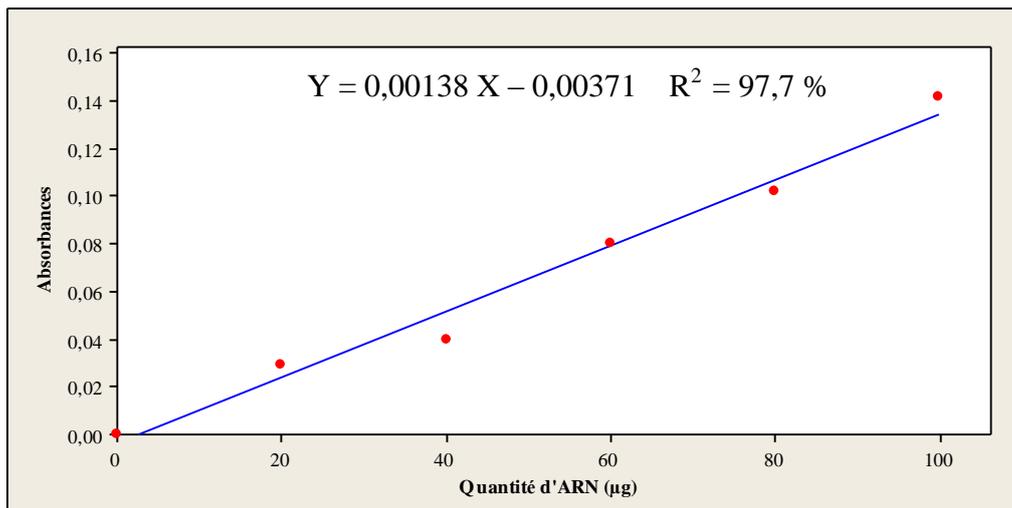


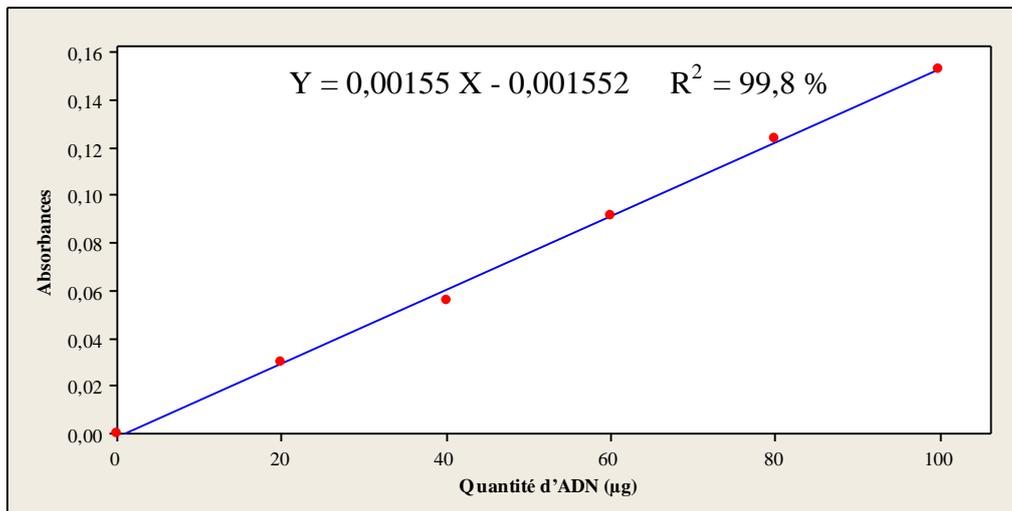
Figure 21. Dosage de l'ARN: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'ARN (μg) (R^2 coefficient de détermination).

2.8.3.2. Dosage de l'ADN

L'ADN a été quantifié selon la méthode de Scheneider (1957) qui utilise le diphénylamine comme réactif (1 g de diphénylamine, 100 ml d'acide acétique glacial, 2,75 ml d'acide sulfurique) et une solution mère de thymus de veau comme standard (1 mg/ml d'eau distillée). L'essai est basé sur la réaction entre la diphénylamine et le désoxyribose. Après chauffage au bain marie pendant 20 mn à 90 °C, il se développe alors une coloration rosâtre. Le dosage de l'ADN est effectué sur des fractions aliquotes (100 μl) des extraits biologiques des gonades, auquel est additionné 1 ml de réactif de diphénylamine. Les absorbances sont été lues dans un spectrophotomètre (WPA) à une longueur d'onde de 602 nm contre un blanc de gamme (Tableau 7, Fig. 22).

Tableau 7. Dosage de l'ADN: Réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5
ADN standard (µl)	0	20	40	60	80
Eau distillée (µl)	500	480	460	440	420
Diphénylamine (ml)	1	1	1	1	1

**Figure 22.** Dosage de l'ADN: droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'ADN (µg) (R^2 coefficient de détermination).

2.9. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés par la moyenne arithmétique plus au moins l'écart type ($m \pm SD$). Les analyses statistiques ont été réalisées grâce aux logiciels; GraphPad software (version 7.00, La Jolla California, USA), et MINITAB (version 16, Penn State College, PA, USA). L'homogénéité des variances est confirmée préalablement par les tests de Bartlett et de Brown-Forsythe. Dans le cas de non égalité des variances, une normalisation des données est alors effectuée (Dagnelie, 1998).

Les résultats obtenus ont subis différents tests statistique: régression linéaire pour la détermination des différentes droites de régression, l'analyse de la variance (ANOVA) à un, deux et trois critères de classification. De plus, le test HSD (Honest Significant Difference) de Tukey nous permet de classer les différentes moyennes, et de déterminer les différences entre les groupes étudiés.

Résultats

3. RESULTATS

3.1. TOXICITE AIGUE DU CADMIUM Chez *D. trunculus*

3.1.1. Toxicité en période de repos sexuel

3.1.1.1. Après 24h d'exposition

Le Cd a été appliqué à différentes concentrations (5, 7,6 et 10 mg/L) dans l'eau de mer d'aquariums contenant 100 individus de *Donax trunculus* en période de repos sexuel (sexe confondu). Le taux de mortalités observés est de $1,00 \pm 1,00$ % chez les témoins, $5,33 \pm 0,57$ % chez les traités avec la concentration 5 mg/L, $10,00 \pm 1,00$ % chez les traités avec la concentration 7,6 mg/L, et de $14,66 \pm 1,15$ % chez les traités avec la concentration la plus élevée (10 mg/L). Les mortalités corrigées par la formule d'Abbott (1925) montrent l'effet réel du traitement, elles varient de $4,37 \pm 0,54$ avec la faible concentration (5 mg/L) à $13,79 \pm 1,96$ avec la concentration la plus élevée (10 mg/L). Après transformation angulaire de la mortalité corrigée, l'analyse de la variance à un critère de classification (concentration) révèle un effet hautement significatif ($p= 0,001$). Le classement par le test de Tukey des concentrations testées révèle trois groupes: le groupe A renferme la concentration 5 mg/L, le groupe B la concentration 7,6 mg/L, et enfin le groupe C la concentration 10 mg/L (**Tableau 8**).

L'équation de la droite de regression exprimant le probit des pourcentages de mortalité corrigée en fonction du logarithme décimal (Log) des concentrations indique une liaison positive très forte (coefficient de détermination $R^2 = 97,50$ %) entre les deux variables. À partir de la droite de regression, les concentrations sublétales 10 (CL_{10}) et 25 (CL_{25}) ainsi que les concentrations létales 50 (CL_{50}) et 90 (CL_{90}) avec leurs intervalles de confiance (IC) sont calculées (**Tableau 12, Fig. 23**).

Tableau 8. Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard de *D. trunculus* en période de **repos sexuel**, et après **24h** d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; $n= 3$ répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	$4,37 \pm 0,54$	$11,80 \pm 0,45$	A
7,6	$9,08 \pm 0,97$	$17,44 \pm 1,00$	B
10	$13,79 \pm 1,96$	$21,66 \pm 1,71$	C

3.1.1.2. Après 48h d'exposition

Après 48h du traitement avec le Cd, le pourcentage de mortalité observé chez les témoins reste stable ($1,00 \pm 1,00$ %), mais il a augmenté chez les séries traités avec les concentrations 5, 7,6 et 10 mg/L ($14,33 \pm 1,52$ %, $25,00 \pm 4,00$ % et $39,66 \pm 2,51$ % respectivement). Les mortalités corrigées varient de $13,45 \pm 2,40$ pour la faible concentration (5 mg/L) à $39,04 \pm$

2,96 pour la concentration élevée (10 mg/L). L'analyse statistique des données transformées révèle un effet concentration très hautement significatif ($p= 0,001$). Le test de Tukey permet de distinguer trois groupes, chaque groupe correspond à une des concentrations testées (**Tableau 9**).

L'analyse des probits indique une liaison positive très forte ($R^2 = 96,3 \%$). Les concentrations sublétales et létales ont été estimées (**Tableau 12, Fig. 23**).

Tableau 9. Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard de *D. trunculus* en période de **repos sexuel**, et après **48h** d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; $n= 3$ répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	13,45 ± 2,40	21,36 ± 2,11	A
7,6	24,25 ± 3,73	29,29 ± 2,44	B
10	39,04 ± 2,96	38,44 ± 1,90	C

3.1.1.3. Après 72h d'exposition

Au bout du troisième jour de l'expérience, le cumul des mortalités observées, est de $1,66 \pm 0,57 \%$ chez les témoins, $25,66 \pm 1,52 \%$ chez les bivalves exposés à la concentration 5 mg/L, $41,33 \pm 3,05 \%$ pour le groupe exposé à la concentration 7,6 mg/L et $52,66 \pm 1,52 \%$ pour celui exposé à la concentration 10 mg/L. Les mortalités observées sont corrigées. L'analyse statistique des données transformées révèle un effet concentration très hautement significatif ($p= 0,001$). Le classement des concentrations testées montre trois groupes: le groupe A concerne la concentration 5 mg/L, le groupe B concerne la concentration 7,6 mg/L, et le groupe C concerne la concentration 10 mg/L (**Tableau 10**). Le coefficient de détermination ($R^2 = 99,9 \%$), révèle une liaison positive très forte entre les probits des mortalités (corrigées) et les concentrations testées (Log). Les concentrations sublétales 10 (CL_{10}) et 25 (CL_{25}) et les concentrations létales 50 (CL_{50}) et 90 (CL_{90}) avec leurs intervalles de confiance (IC) sont indiquées ci-dessous (**Tableau 12, Fig. 23**).

Tableau 10. Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard de *D. trunculus* en période de **repos sexuel**, et après **72h** d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; $n= 3$ répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	24,93 ± 1,91	29,32 ± 1,34	A
7,6	40,32 ± 3,37	39,02 ± 2,06	B
10	51,86 ± 1,63	45,95 ± 0,87	C

3.1.1.4. Après 96h d'exposition

Au dernier jour de l'expérience, le totale des mortalités observées est de $2,00 \pm 1,00$ % chez les témoins, alors que chez les traités aux différentes concentrations du Cd 5, 7,6 et 10 mg/L, il est de l'ordre de $33,66 \pm 1,52$ %, $49,66 \pm 2,08$ % et $59,66 \pm 1,52$ % respectivement. Les mortalités observées sont corrigées; elles varient de $32,30 \pm 1,88$ pour la concentration la plus faible (5 mg/L) à $58,83 \pm 1,87$ pour la concentration la plus élevée (10 mg/L). L'ANOVA indique un effet concentration très hautement significatif ($p= 0,001$). Les concentrations testées se répartissent en trois groupes (**Tableau 11**). L'analyse des probits démontre une importante relation entre le probit et logarithme décimal des concentrations ($R^2 = 100$ %). Les concentrations létales estimées sont indiquées ci-dessous (**Tableau 12, Fig. 23**).

Les données sur les mortalités transformées obtenues en période de repos sexuel sont soumises à une ANOVA à 2 critères de classification (concentration, temps) qui révèle un effet concentrations ($F_{2, 44} = 261,53$; $p= 0,001$), un effet temps ($F_{4, 44} = 1332,48$; $p= 0,001$) et une interaction concentration x temps ($F_{8, 44} = 19,90$; $p= 0,001$).

Tableau 11. Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard de *D. trunculus* en période de **repos sexuel**, et après **96h** d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; $n= 3$ répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	$32,30 \pm 1,88$	$34,23 \pm 1,27$	A
7,6	$48,63 \pm 2,06$	$43,91 \pm 1,43$	B
10	$58,83 \pm 1,87$	$49,80 \pm 1,20$	C

Tableau 12. Toxicité du cadmium (mg/L) après une exposition de **24h, 48h, 72h et 96h** chez *D. trunculus* en période de **repos sexuel**: concentrations sublétales et sulétales (IC: intervalle de confiance).

Traitement	Temps d'exposition (Heures)			
	24h	48h	72h	96h
Droite de régression	$Y = 1,86 X + 1,92$	$Y = 2,36X + 2,05$	$Y = 2,32X + 2,72$	$Y = 2,20X + 3,03$
Slope	3,42	2,39	2,68	2,83
CL₁₀ (IC)	9,16 (6,54-12,82)	4,27 (3,30-5,42)	2,72 (2,03-3,49)	2,03 (1,52-2,69)
CL₂₅(IC)	19,51 (13,93-27,31)	7,29 (5,74-9,25)	4,89 (3,73-6,40)	3,85 (2,89-5,12)
CL₅₀ (IC)	45,28 (32,34-63,39)	13,23 (10,41-16,80)	9,61 (7,33-12,58)	7,86 (5,90-10,45)
CL₉₀ (IC)	220,84 (157,74-309,17)	40,58 (31,95-51,53)	34,23 (26,19-44,84)	30,01 (22,56-39,91)

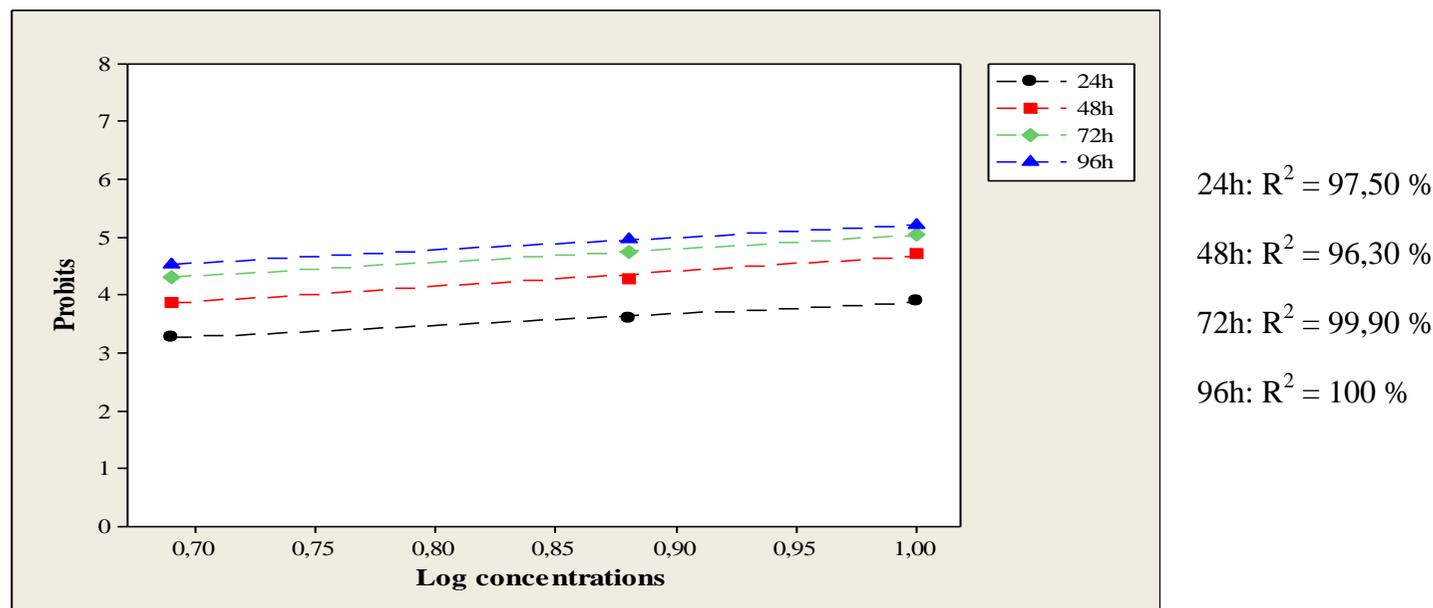


Figure 23. Toxicité du cadmium (mg/L) après **24h, 48h, 72h et 96h** d'exposition de *D. trunculus* en période de **repos sexuel**: Analyse des probits.

3.1.2. Toxicité en période d'activité sexuelle

3.1.2.1. Chez les mâles

3.1.2.1.1. Après 24h d'exposition

Le sexe peut être identifié macroscopiquement en période de reproduction. Le Cd a été administré aux mêmes concentrations 5, 7,6 et 10 mg/L dans l'eau de mer d'aquariums contenant 100 mâles de *D. trunculus* en période de reproduction. Après 24h d'exposition, le taux de mortalités observés est de $1,00 \pm 1,00$ % chez les témoins, $8,00 \pm 2,64$ % chez les traités avec la concentration 5 mg/L, $18 \pm 4,35$ % chez les traités avec la concentration 7,6 mg/L et $34,66 \pm 2,30$ % chez les traités avec la concentration 10 mg/L. Après transformation angulaire de la mortalité corrigée, l'analyse de la variance à un critère de classification (concentration) révèle un effet hautement significatif ($p= 0,001$). L'analyse statistique des concentrations testées permet de les classer en trois groupes distincts: le groupe A renferme la concentration 5, le groupe B la concentration 7,6 mg/L, et le groupe C la concentration 10 mg/L (**Tableau 13**).

L'équation de la droite de regression révèle une liaison positive très forte (coefficient de détermination $R^2 = 96,10$ %). Les concentrations sublétales 10 (CL_{10}) et 25 (CL_{25}) ainsi que les concentrations létales 50 (CL_{50}) et 90 (CL_{90}) avec leurs intervalles de confiance (IC) sont rapportées dans le **tableau 17** et la **figure 24**.

Tableau 13. Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard des mâles de *D. trunculus* en période de reproduction et après 24h d'exposition: classement des concentrations (m \pm s; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	7,07 \pm 2,06	15,24 \pm 2,27	A
7,6	17,18 \pm 3,78	24,27 \pm 2,71	B
10	34,01 \pm 1,77	36,06 \pm 1,39	C

3.1.2.1.2. Après 48h d'exposition

Chez les témoins, le pourcentage de mortalité observée après 48h est de $1,33 \pm 1,52$ % contre $23,33 \pm 4,16$ % pour le groupe traité avec la concentration 5 mg/L, $34,00 \pm 2,00$ % pour le groupe traité avec la concentration 7,6 mg/L, et $59,33 \pm 2,51$ % pour le groupe exposé à la concentration 10 mg/L. Les mortalités corrigées varient entre $22,32 \pm 3,04$ et $58,80 \pm 1,91$. L'ANOVA appliquée sur les mortalités transformées révèle un effet concentration très hautement significatif ($p= 0,001$). Le test HSD de Tukey a permis le classement des différentes concentrations en trois groupes (**Tableau 14**). Une liaison positive très forte entre le probit et le logarithme décimal des concentrations est enregistrée ($R^2 = 80,20$ %). Les concentrations sublétales 10 (CL_{10}) et 25 (CL_{25}) et les concentrations létales 50 (CL_{50}) et 90 (CL_{90}) avec leurs intervalles de confiance (IC) sont exprimées (**Tableau 17, Fig. 24**).

Tableau 14. Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard des mâles de *D. trunculus* en période de reproduction, et après 48h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; $n= 3$ répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	22,32 ± 3,04	27,94 ± 1,81	A
7,6	33,11 ± 1,02	34,39 ± 0,69	B
10	58,80 ± 1,91	49,79 ± 0,89	C

3.1.2.1.3. Après 72h d'exposition

A 72h de l'expérimentation, le taux de mortalité observé chez les témoins mâles est de $1,33 \pm 1,52$ %, tandis que chez les bivalves exposés aux concentrations 5, 7,6 et 10 mg/L du Cd, il est de l'ordre de $35,33 \pm 4,50$ %, $46,33 \pm 3,51$ % et $74,66 \pm 4,16$ % respectivement. Les mortalités corrigées varient entre $34,49 \pm 3,57$ et $74,35 \pm 3,85$. L'ANOVA révèle un effet concentration très hautement significatif ($p= 0,001$). Le test statistique Tukey appliqué afin de classer les concentrations testées donne trois groupes: le groupe A (la concentration 5 mg/L), le groupe B (la concentration 7,6 mg/L), et le groupe C (la concentration 10 mg/L) (**Tableau 15**). Le coefficient de détermination R^2 est de l'ordre de 73,20 %. Les concentrations sublétales et létales avec leurs intervalles de confiance (IC) sont exprimées (**Tableau 17, Fig. 24**).

Tableau 15. Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard des mâles de *D. trunculus* en période de reproduction, et après 72h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; $n= 3$ répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	34,49 ± 3,57	35,85 ± 2,12	A
7,6	45,63 ± 2,73	42,32 ± 1,44	B
10	74,35 ± 3,85	59,37 ± 2,33	C

3.1.2.1.4. Après 96h d'exposition

Au terme de l'exposition (96h), le pourcentage cumulé des mortalités observées chez les témoins mâles est de $2,66 \pm 2,08$ %, $63,00 \pm 2,00$ % chez les mâles traités avec la concentration 5 mg/L, $77,33 \pm 2,08$ % chez les mâles traités avec la concentration 7,6 mg/L, et le maximum est enregistré chez les mâles exposés à la concentration 10 mg/L avec $86,66 \pm 2,51$ %. Après transformations des mortalités corrigées, l'ANOVA à un critère de classification révèle un effet concentration très hautement significatif ($p= 0,001$). Le test de Tukey qui permet de classer les concentrations testées rapporte trois groupes: le groupe A

pour la concentration 5 mg/L, le groupe B pour la concentration 7,6 mg/L, et le groupe C pour la concentration 10 mg/L (**Tableau 16**).

Le coefficient de détermination ($R^2 = 97,70\%$); révèle une liaison positive très forte entre le probit et le logarithme décimal des concentrations. La CL_{10} , la CL_{25} , CL_{50} , et la CL_{90} avec leurs intervalles de confiance (IC) sont calculées (**Tableau 17, Fig. 24**).

Tableau 16. Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard **des mâles** de *D. trunculus* en période de **reproduction**, et après **96h** d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	61,97 ± 2,42	51,75 ± 1,23	A
7,6	76,37 ± 2,21	60,45 ± 1,53	B
10	86,32 ± 2,34	66,44 ± 1,37	C

Tableau 17. Toxicité du cadmium (mg/L) après une exposition de **24h, 48h, 72h et 96h** chez les **mâles** de *D. trunculus* en période de **reproduction**: déterminatin de la **CL₁₀, CL₂₅, CL₅₀, CL₉₀** (IC: intervalle de confiance).

Traitement	Temps d'exposition (Heures)			
	24h	48h	72h	96h
Droite de régression	$Y = 3,36 X + 1,17$	$Y = 3,06X + 2,05$	$Y = 3,25X + 2,26$	$Y = 2,51 X + 3,55$
Slope	1,97	2,11	2,02	2,49
CL₁₀ (IC)	5,70 (4,75-6,84)	3,48 (2,85-4,24)	2,79 (2,30-3,37)	1,15 (0,89-1,47)
CL₂₅(IC)	8,65 (7,20-10,38)	5,51 (4,51-6,72)	4,30 (3,55-5,20)	2,02 (1,57-2,58)
CL₅₀ (IC)	13,80 (11,50-16,56)	9,20 (7,54-11,22)	6,96 (5,75-8,42)	3,78 (2,95-4,83)
CL₉₀ (IC)	33,17 (27,64-39,80)	24,11 (19,76-29,41)	17,25 (14,25-20,87)	12,23 (9,55-15,65)

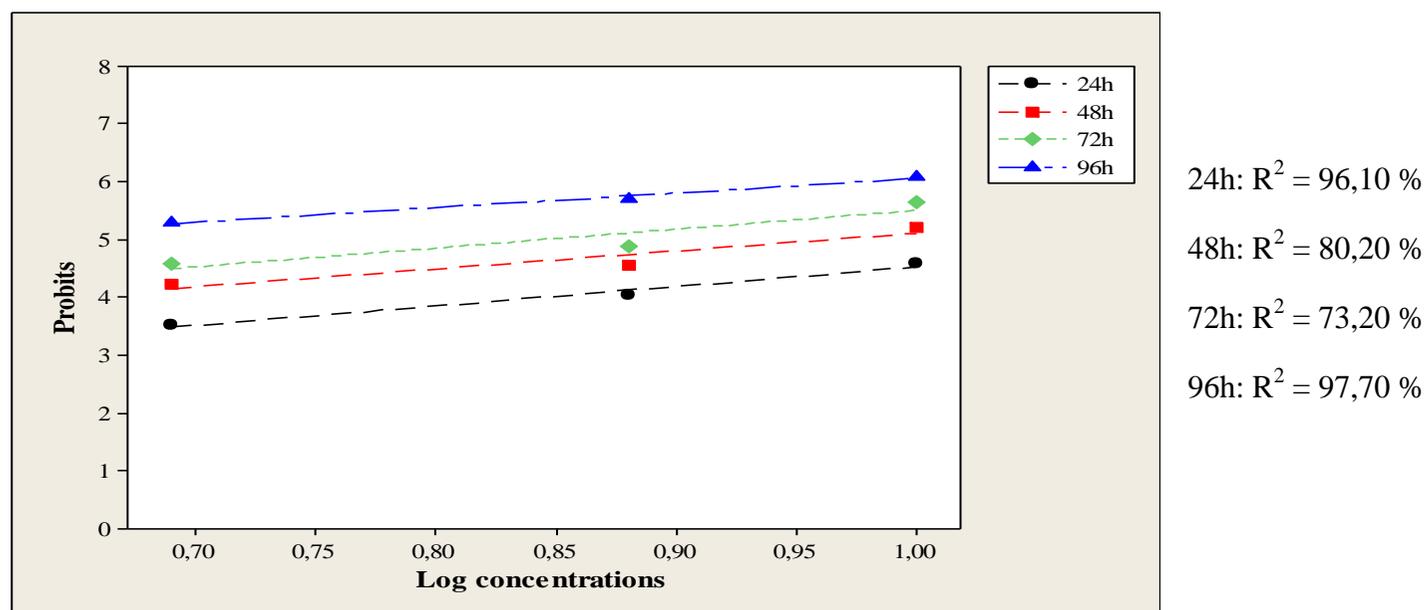


Figure 24. Toxicité du cadmium (mg/L) après **24h, 48h, 72h et 96h** d'exposition des **mâles** de *D. trunculus* en période de **reproduction**: Analyse des probits.

3.1.2.2. Chez les femelles

3.1.2.2.1. Après 24h d'exposition

Les trois concentrations de cadmium 5, 7,6 et 10 mg/L sont également testées chez les femelles de *D. trunculus* en période de reproduction, et appliquées dans l'eau de mer d'aquariums contenant 100 échantillons pour chaque lots. Le taux de mortalité observé est de $0,66 \pm 1,15$ % chez les témoins, $11,33 \pm 3,51$ % chez les traités avec la concentration 5 mg/L, $25,00 \pm 2,64$ % chez les traités avec la concentration 7,6 mg/L et $44,66 \pm 3,51$ % chez les traités avec la concentration 10 mg/L. Les mortalités subissent une correction. L'analyse de la variance révèle un effet concentration hautement significatif ($p= 0,001$), puis le test statistique Tukey relatif au classement des concentrations testées révèle trois catégories distinctes correspondant chacun à une des concentrations testées (le groupe A, le groupe B, et le groupe C) (**Tableau 18**).

Le coefficient de détermination issu de la droite de regression exprimant le probit des pourcentages de mortalité corrigée en fonction du logarithme décimal est déterminé $R^2 = 96,70$ %. Les concentrations sublétales et létales ainsi que les paramètres de létalité sont mentionnés dans le **tableau 22** et la **figure 25**.

Tableau 18. Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard des **femelles** de *D. trunculus* en période de **reproduction** et après **24h** d'exposition: classement des concentrations.

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	$10,75 \pm 2,63$	$18,97 \pm 2,37$	A
7,6	$24,50 \pm 2,18$	$29,32 \pm 1,17$	B
10	$44,31 \pm 3,02$	$41,55 \pm 1,52$	C

3.1.2.2.2. Après 48h d'exposition

Les concentrations du cadmium testées ont provoquées chez les femelles en période de reproduction après une exposition de 48h, une mortalité observé de $1,33 \pm 1,52$ % chez les témoins contre $32,66 \pm 5,05$ % chez les traités avec la concentration 5 mg/L, $44,33 \pm 4,50$ % chez les traités avec la concentration 7,6 mg/L, et $67,33 \pm 4,04$ % chez les traités avec la concentration 10 mg/L. L'analyse statistique des données révèle un effet concentration hautement significatif ($p= 0,001$). Le classement par le test de Tukey des concentrations testées révèle trois catégories: le groupe A (la concentration 5 mg/L), le groupe B (la concentration 7,6 mg/L), et enfin le groupe C (la concentration 10 mg/L) (**Tableau 19**). Les paramètres de létalité ont été déterminés (**Tableau 22**, **Fig. 25**).

Tableau 19. Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard des **femelles** de *D. trunculus* en période de **reproduction** et après **48h** d'exposition: classement des concentrations (m±s; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	31,80 ± 4,60	34,20 ± 2,81	A
7,6	43,61 ± 3,71	41,09 ± 1,92	B
10	66,90 ± 3,85	52,75 ± 2,47	C

3.1.2.2.3. Après 72h d'exposition

Au bout de 72h d'exposition au cadmium, le pourcentage de mortalité observé chez les femelles témoins est de $2,33 \pm 1,52$ %, alors que chez les femelles traitées avec les concentrations 5, 7,6 et 10 mg/L, il est de $41,00 \pm 2,64$ %, $61,33 \pm 2,00$ %, $78,66 \pm 2,08$ %, respectivement. Les mortalités corrigées fluctuent entre $39,60 \pm 1,93$ et $78,15 \pm 2,13$. L'ANOVA 1 des mortalités transformées révèle un effet concentration très hautement significatif ($p= 0,001$). Le classement des concentrations testées donne également trois groupes (**Tableau 20**). Les informations sur la toxicité sont résumées dans le **tableau 22** et la **figure 25**.

Tableau 20. Toxicité du cadmium (mg/L) l'égard **des femelles** de *D. trunculus* en période de **reproduction**, et après **72h** d'exposition: classement des concentrations (m±s; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	39,60 ± 1,93	38,64 ± 1,02	A
7,6	60,41 ± 1,59	50,76 ± 1,01	B
10	78,15 ± 2,13	61,83 ± 1,44	C

3.1.2.2.4. Après 96h d'exposition

Après 96h d'exposition des femelles au Cd, les résultats indique une mortalité observé chez les témoins de $3,33 \pm 2,30$ %, $76,00 \pm 2,64$ % chez les individus exposés à la concentration 5 mg/L, $84,66 \pm 2,51$ % chez les individus exposés à la concentration 7,6 mg/L, et $94,00 \pm 2,00$ % chez les individus exposés à la concentration 10 mg/L. Les taux corrigés subissent une transformation angulaire, et font l'objet d'une ANOVA 1 suivis par le test de Tukey dans le but de classer l'effet des concentrations testées. Les résultats indique un effet concentration très hautement significatif ($p= 0,001$), et le classement des concentrations révèle trois groupes A, B et C, chaque groupe correspond à une des concentrations testées (**Tableau 21**).

Le coefficient de détermination ($R^2 = 85,10 \%$); révèle l'importance de la relation entre le probit et le logarithme décimal des concentrations. Les concentrations létales et sublétales sont rapportées dans le **tableau 22 (Fig. 26)**.

Tableau 21. Toxicité du cadmium (mg/L) à l'égard **des femelles** de *D. trunculus* en période de **reproduction**, et après **96h** d'exposition: classement des concentrations ($m \pm s$; $n = 3$ répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	75,19 ± 2,18	59,79 ± 1,38	A
7,6	84,16 ± 2,31	66,20 ± 1,94	B
10	93,81 ± 1,95	74,76 ± 2,27	C

Tableau 22. Toxicité du cadmium (mg/L) après une exposition de **24h, 48h, 72h et 96h** chez les **femelles** de *D. trunculus* en période de **reproduction**: déterminatin de la **CL₁₀, CL₂₅, CL₅₀, CL₉₀** (IC: intervalle de confiance).

Traitement	Temps d'exposition (Heures)			
	24h	48h	72h	96h
Droite de régression	$Y = 3,49 X + 1,31$	$Y = 2,82 X + 2,51$	$Y = 3,30 X + 2,42$	$Y = 2,68 X + 3,77$
Slope	1,92	2,25	2,00	2,35
CL₁₀ (IC)	4,87 (4,09-5,79)	2,66 (2,12-3,32)	2,45 (2,02-2,96)	0,94 (0,74-1,18)
CL₂₅(IC)	7,28 (6,11-8,66)	4,38 (3,50-5,47)	3,76 (3,10-4,54)	1,60 (1,26-2,01)
CL₅₀ (IC)	11,41 (9,58-13,57)	7,63 (6,10-9,53)	6,05 (5,00-7,32)	2,87 (2,77-3,61)
CL₉₀ (IC)	26,55 (22,31-31,59)	21,72 (17,37-27,15)	14,78 (12,21-17,88)	8,64 (6,85-10,88)

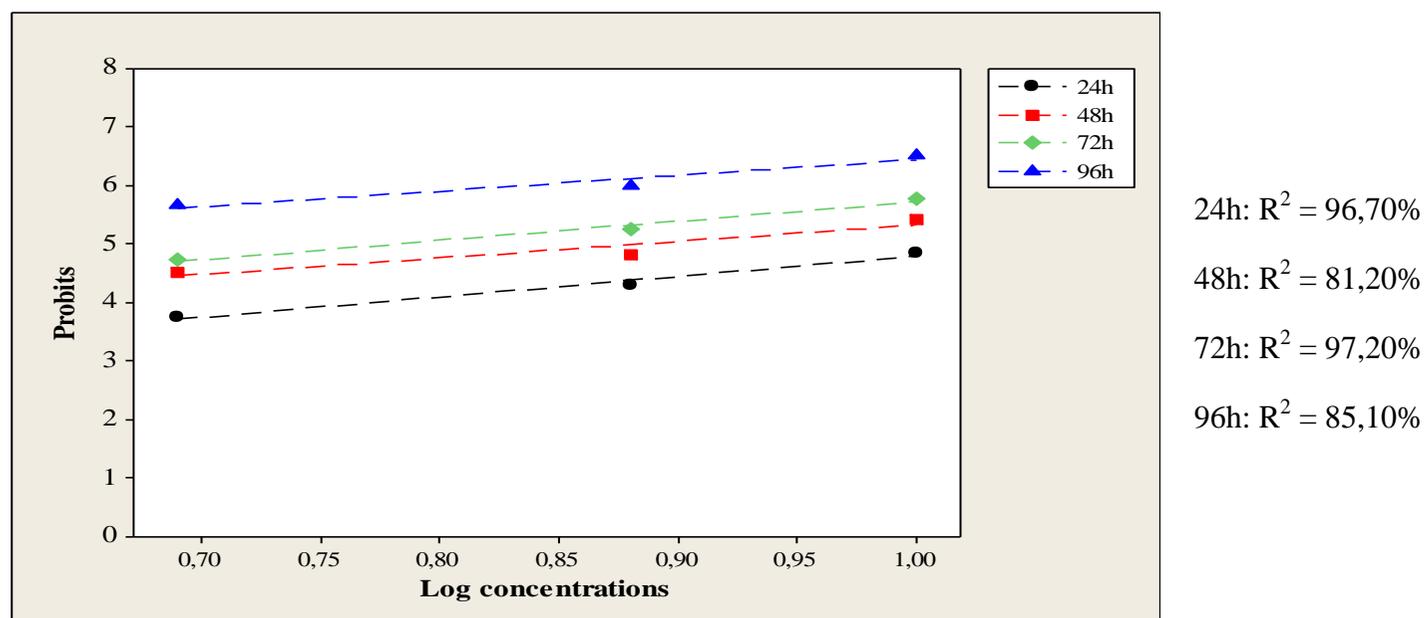


Figure 25. Toxicité du cadmium (mg/L) après **24h, 48h, 72h et 96h** d'exposition des **femelles** de *D. trunculus* en période de **reproduction**: Analyse des probits.

3.1.2.3. Comparaison des résultats entre sexe et période à la fin des tests (96h)

En période de reproduction, l'effet sexe ($F_{1, 89} = 165$; $p=0,001$) est indiqué par l'ANOVA à 3 critères de classification (concentration, temps et sexe) des mortalités transformées (96h). De plus, la présence d'un effet concentration ($F_{2, 89} = 738,04$; $p= 0,001$), et un effet temps ($F_{4, 89} = 3884,52$; $p= 0,001$) est signalée.

Afin de mettre en évidence l'effet période éventuel, une ANOVA à 3 critères de classification (période, concentration, et temps) est réalisée sur les mortalités transformées. Les résultats indiquent un effet période ($F_{1, 134} = 398,69$; $p= 0,001$), une interaction temps x période ($F_{2, 134} = 39,76$; $p= 0,001$) et une interaction concentration x période ($F_{2, 134} = 7,22$; $p= 0,001$).

3.2. EFFET SUBLETAL DU CADMIUM SUR LES BIOMARQUEURS

Les variations des teneurs en protéines carbonylées (PCs) et métallothionéines (MTs) ont été déterminées dans les gonades de *D. trunculus* en période de repos et de reproduction, après traitement aux deux concentrations sublétales du Cd (CL₁₀ et CL₂₅).

3.2.1. Effet chez *D. trunculus* en période de repos sexuel durant l'exposition aigüe et la dépuración

3.2.1.1. Variation des taux de protéines carbonylées

La mesure des protéines carbonylées a été réalisée chez les individus de *D. trunculus* durant la phase d'exposition au cadmium et de dépuración (0, 48, 96h).

L'analyse de la variance (ANOVA) à 3 critères de classifications (traitement, temps et phase) des taux de PCs en période de repos sexuel révèle un effet traitement ($F_{2, 71} = 157,68$; $p= 0,001$), temps ($F_{2, 71} = 9,37$; $p= 0,001$), et phase ($F_{1, 71} = 7,43$; $p= 0,009$).

Au cours de **la phase d'exposition**, les individus traités avec les deux concentrations sublétales du Cd (CL₁₀ et CL₂₅) présentent une induction marquée des taux de PCs par rapport aux témoins. En effet, nos résultats démontrent une augmentation très hautement significative à 48h et à 96h ($p \leq 0,001$) avec les deux concentrations testées. Les pourcentages d'induction les plus importants sont enregistrés chez les traités avec la CL₂₅, à 48h (135,76 %) et à 96h (134,54 %). En ce qui concerne **la dépuración**, on remarque que les taux de PCs n'ont pas été restaurés chez l'ensemble des séries traités au Cd (CL₁₀ et CL₂₅; $p \leq 0,001$) après 48h, et 96h (CL₁₀; $p \leq 0,001$ et CL₂₅; $p < 0,05$) du temps de dépuración (**Tableau 23**).

3.2.1.2. Variation des taux de métallothionéines

Les taux de métallothionéines ont été déterminés au niveau des gonades de *D. trunculus* en période de repos sexuel et ceci au cours des deux phases.

L'ANOVA à 3 critères de classifications (traitement, temps et phase) des taux de MTs des bivalves en période de repos sexuel indique un effet traitement ($F_{2, 71} = 61,01$; $p= 0,001$), temps ($F_{2, 71} = 17,47$; $p= 0,001$), et phase ($F_{1, 71} = 22,21$; $p= 0,001$).

Durant **la phase d'exposition**, les individus traités affichent une augmentation importante des taux de MTs dès 48h d'exposition. Le pourcentage d'induction le plus faible est enregistré chez les traités avec la CL₁₀, à 48h avec un taux de 31,00 % ($p < 0,05$), et le plus important chez les traités avec la CL₂₅ à 96h avec un taux de 84,17 % ($p \leq 0,001$). Pendant la **phase de restauration**, on remarque que les valeurs normales de MTs ont été rétablies dès 48h chez les deux séries traités (CL₁₀ et CL₂₅). Il n'y a pas de différences significatives ($p > 0,05$) entre séries témoins et traitées (**Tableau 24**).

Tableau 23. Taux de **protéines carbonylées** (nmol/mg de protéines) au niveau des gonades de *D. trunculus* en période de **repos sexuel** durant la phase **d'exposition et de déuration** (m ± SD, n=4).

Traitement	Période d'exposition (heures)			Période de déuration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	1,75 ± 0,20 a A	1,51 ± 0,28 a A	1,65 ± 0,32 a A	1,65 ± 0,32 a A	1,59 ± 0,36 a A	1,42 ± 0,35 a A
CL ₁₀	1,75 ± 0,20 a A	3,14 ± 0,30 b B	3,43 ± 0,52 b B	3,43 ± 0,52 a B	3,53 ± 0,37 a B	2,45 ± 0,41 b B
CL ₂₅	1,75 ± 0,20 a A	3,56 ± 0,28 b B	3,87 ± 0,22 b B	3,87 ± 0,22 b B	3,41 ± 0,35 ab B	3,05 ± 0,43 b B

Tableau 24. Taux de **métallothionéines** (µg/mg de protéines) au niveau des gonades de *D. trunculus* en période de **repos sexuel** durant la phase **d'exposition et de déuration** (m ± SD, n=4).

Traitement	Période d'exposition (heures)			Période de déuration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	4,63 ± 0,31a A	4,16 ± 0,45 a A	4,36 ± 0,51 a A	4,36 ± 0,51 a A	3,74 ± 0,32 a A	4,23 ± 0,61 a A
CL ₁₀	4,63 ± 0,31a A	5,45 ± 0,32 b B	7,21 ± 0,61 b B	7,21 ± 0,61 a B	4,46 ± 0,66 b A	4,06 ± 0,31 b A
CL ₂₅	4,63 ± 0,31a A	6,32 ± 0,67b B	8,03 ± 0,58 c B	8,03 ± 0,58 a B	4,18 ± 0,68 b A	3,84 ± 0,63 b A

- Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les temps d'exposition, tandis que les moyennes d'un même temps d'exposition suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les traitements.

3.2.2. Effet chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* en période d'activité sexuelle durant l'exposition aigüe et la dépuración

3.2.2.1. Variation des taux de protéines carbonylées

Le contenu des gonades en protéines carbonylées est évalué au cours de la phase d'exposition (CL₁₀ et CL₂₅-96h) et de dépuración toute les 48h pour chaque sexe séparément.

Chez les mâles, l'ANOVA à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de PCs démontre un effet traitement ($F_{2, 71} = 28,54$; $p = 0,001$), une interaction temps x phase ($F_{2, 71} = 14,64$; $p = 0,001$), et traitement x temps x phase ($F_{4, 71} = 6,00$; $p = 0,001$). En phase d'exposition, les mâles traités présentent une induction très importante des taux de PCs par rapport aux témoins dès 48h du traitement (CL₁₀; $p < 0,05$ et CL₂₅; $p \leq 0,001$), avec un effet concentration ($p < 0,05$), et où l'induction maximale des taux de PCs (120,20 %) est enregistrée chez les traités avec la CL₂₅. De plus, une différence dans les valeurs de PCs en fonction de la concentration du Cd est enregistrée à 48h. Après 96h on observe une augmentation très significative ($p \leq 0,01$) uniquement chez les traités avec la CL₂₅ (114,79 %). Les résultats de l'expérimentation de dépuración, montre qu'il n'existe pas de différences significatives ($p > 0,05$) entre les témoins et les traités avec la CL₁₀ et la CL₂₅ à partir de 48h, ce qui montre un excellent système de détoxication chez les mâles (**Tableau 25**).

Chez les femelles, l'ANOVA 3 des concentrations de PCs révèle un effet traitement ($F_{2, 71} = 39,69$; $p = 0,001$) et une interaction temps x phase ($F_{2, 71} = 18,09$; $p = 0,001$), ainsi qu'un effet phase ($F_{2, 71} = 4,42$; $p = 0,017$). L'exposition des femelles au Cd entraîne une augmentation très significative ($p \leq 0,01$) des taux de PCs après 48h uniquement avec la concentration la plus forte (CL₂₅). En effet, un effet traitement est révélé par l'analyse statistique ($p \leq 0,001$). Par contre, à 96h une induction significative est observée chez les individus traités avec les deux concentrations testées (CL₁₀; $p \leq 0,01$) et la CL₂₅; $p \leq 0,001$) comparativement aux témoins. C'est à la fin de l'expérimentation (96h) que le l'induction maximale des PCs est enregistrée chez la série exposé à la CL₂₅ avec un pourcentage de 104,91 %. Durant la phase de dépuración, on remarque qu'il y'a un retour rapide chez les traités avec la concentration la plus faible (CL₁₀) à des valeurs comparables à celle des témoins dès 48h, alors que les traités avec la CL₂₅ nécessite plus de temps (96h) pour restaurer leurs contenus en PCs (**Tableau 26**).

Tableau 25. Taux de **protéines carbonylées** (nmol/mg de protéines) au niveau des gonades des adultes **mâles** de *D. trunculus* durant la **période d'exposition et de restauration** (m ± SD, n=4).

Traitement	Période d'exposition (heures)			Période de dépuración (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	2,01 ± 0,71 a A	1,93 ± 0,56 a A	2,23 ± 0,78 a A	2,23 ± 0,78 a A	2,56 ± 0,95 a A	2,73 ± 0,92 a A
CL ₁₀	2,01 ± 0,71 a A	3,03 ± 0,66 ab B	3,51 ± 0,67 b AB	3,51 ± 0,67 a AB	3,02 ± 0,91 a A	2,60 ± 0,61 a A
CL ₂₅	2,01 ± 0,71 a A	4,25 ± 0,41 b C	4,79 ± 0,52 b B	4,79 ± 0,52 a B	3,77 ± 0,62 ab A	3,26 ± 0,60 b A

Tableau 26. Taux de **protéines carbonylées** (nmol/mg de protéines) au niveau des gonades des adultes **femelles** de *D. trunculus* durant la **période d'exposition et de restauration** (m ± SD, n=4).

Traitement	Période d'exposition (heures)			Période de dépuración (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	2,27 ± 0,54 a A	2,81 ± 0,53 a A	2,44 ± 0,64 a A	2,44 ± 0,64 a A	2,70 ± 0,62 a A	2,64 ± 0,96 a A
CL ₁₀	2,27 ± 0,54 a A	3,33 ± 0,68 ab A	4,24 ± 0,52 b B	4,24 ± 0,52 b B	3,04 ± 0,62 a AB	3,12 ± 0,93 a A
CL ₂₅	2,27 ± 0,54 a A	5,14 ± 0,66 b B	5,00 ± 0,70 b B	5,00 ± 0,70 b B	4,19 ± 0,89 a B	4,44 ± 0,93 a A

- Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les temps d'exposition, tandis que les moyennes d'un même temps d'exposition suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les traitements.

3.2.2.2. Variation des taux de métallothionéines

Le taux de métallothionéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines) est analysé au niveau des gonades de *D. trunculus* durant l'exposition au Cd (CL_{10} et CL_{25} -96h), et la dépuración (0, 48, et 96h) pour les mâles et les femelles séparément.

Chez les mâles, l'ANOVA réalisée sur les données obtenues démontre un effet traitement ($F_{2, 71} = 43,35$; $p = 0,001$), et une interaction traitement x temps x phase ($F_{4, 71} = 10,24$; $p = 0,001$). En phase d'exposition, la comparaison témoins/traités permet de constater qu'à 48h, le groupe exposé à la concentration la plus importante (CL_{25}) est le seul à présenter une induction significative des MTs ($p < 0,05$; 61,70 %), alors qu'à 96h l'induction est plus marquée et se manifeste pour les deux groupes des traités (CL_{10} ; $p \leq 0,01$ avec un pourcentage d'induction de 65,09 %, et CL_{25} ; $p \leq 0,001$ avec un pourcentage d'induction de 90,09 %). En ce qui concerne la phase de dépuración, un retour à l'état initial est constaté à la fin de l'expérimentation (96h) (**Tableau 27**).

Chez les femelles, L'ANOVA des valeurs de MTs chez les femelles de *D. trunculus* montre un effet traitement ($F_{2, 71} = 93,26$; $p = 0,001$), temps ($F_{2, 71} = 34,71$; $p = 0,001$) et phase ($F_{1, 71} = 32,57$; $p = 0,001$), et une interaction traitement x temps x phase ($F_{4, 71} = 4,06$; $p = 0,006$). Durant l'exposition des femelles, une induction très significative ($p \leq 0,01$) est remarquée à 48h avec les deux concentrations sublétales du Cd (CL_{10} et CL_{25}) en comparaison avec les témoins. A 96h l'induction est plus importante ($p \leq 0,001$), elle est de l'ordre de 47,61 % chez les individus traités avec la CL_{10} , et de 51,37 % chez le groupe exposé à la CL_{25} . En ce qui concerne la phase de dépuración, on constate l'absence de restauration chez l'ensemble de séries traitées à 48 et 96h. Cependant, malgré la présence d'une différence très hautement significative ($p \leq 0,001$) entre les traités et les témoins à 48h, et très significative ($p \leq 0,01$) à 96h, on observe une légère diminution dans les valeurs de MTs au cours du temps de dépuración (**Tableau 28**).

Tableau 27. Taux de **métallothionéines** ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines) au niveau des gonades des adultes **mâles** de *D. trunculus* durant la **période d'exposition et de restauration** ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)			Temps de restauration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	3,48 \pm 0,71 a A	4,23 \pm 0,71 a A	4,24 \pm 0,97 a A	4,24 \pm 0,97 a A	3,57 \pm 0,46 a A	3,68 \pm 0,67 a A
CL ₁₀	3,48 \pm 0,71 a A	5,15 \pm 0,75 b AB	7,00 \pm 0,88 c B	7,00 \pm 0,88 a B	6,06 \pm 0,94 ab B	4,31 \pm 0,96 b A
CL ₂₅	3,48 \pm 0,71 a A	6,84 \pm 1,47 b B	8,06 \pm 0,75 b B	8,06 \pm 0,75 a B	5,94 \pm 0,46 b B	4,17 \pm 0,78 c A

Tableau 28. Taux de **métallothionéines** ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines) au niveau des gonades des adultes **femelles** de *D. trunculus* durant la **période d'exposition et de restauration** ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)			Temps de restauration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	2,15 \pm 0,50 a A	3,97 \pm 0,34 a A	3,99 \pm 0,44 a A	3,99 \pm 0,44 a A	3,13 \pm 0,24 ab A	2,81 \pm 0,70 b A
CL ₁₀	2,15 \pm 0,50 a A	4,96 \pm 0,27 b B	5,89 \pm 0,33 c B	5,89 \pm 0,33 a B	5,20 \pm 0,52 ab B	4,77 \pm 0,59 b B
CL ₂₅	2,15 \pm 0,50 a A	5,07 \pm 0,29 b B	6,04 \pm 0,32 c B	6,04 \pm 0,32 a B	5,32 \pm 0,32 ab B	4,54 \pm 0,54 b B

- Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les temps d'exposition, tandis que les moyennes d'un même temps d'exposition suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les traitements.

3.2.3. Comparaison des résultats entre sexe et période

Pour les PCs, une ANOVA à 3 critères de classifications (sexe, traitement, et temps) est appliquée sur les taux de PCs, pour chacune des deux phases séparément. L'effet sexe est révélé en phase d'exposition ($F_{1, 71} = 9,07$; $p = 0,004$) et de dépuration ($F_{1, 71} = 4,67$; $p = 0,035$). De plus, durant la dépuration une interaction temps x sexe ($F_{2, 71} = 4,12$; $p = 0,022$), et une interaction traitement/sexe ($F_{2, 71} = 12,93$; $p = 0,001$) sont mise en évidence.

Dans l'optique de révéler l'effet du Cd en fonction de la période (repos/reproduction), une ANOVA à 3 critères de classifications (période, temps et traitement) est réalisée sur les taux de PCs. Nos résultats indiquent un effet période pour les deux phases; l'exposition ($F_{1, 107} = 26,72$; $p = 0,001$) et la dépuration ($F_{1, 107} = 21,75$; $p = 0,001$).

Pour les MTs, l'ANOVA à 3 critères de classifications (sexe, traitement, et temps) révèle en phase d'exposition, un effet sexe ($F_{1, 71} = 42,79$; $p = 0,001$) et une interaction traitement x sexe ($F_{2, 71} = 4,12$; $p = 0,022$), tandis qu'en phase de dépuration, elle indique un effet sexe ($F_{1, 71} = 15,01$; $p = 0,001$), et des interactions temps x sexe ($F_{2, 71} = 4,41$; $p = 0,017$) et traitement x temps x sexe ($F_{4, 71} = 3,13$; $p = 0,022$).

Enfin, l'effet du Cd en fonction de la période (repos/reproduction) est examiné par une ANOVA 3. Elle révèle un effet période et une interaction temps x période pour la phase d'exposition ($F_{1, 107} = 29,99$; $p = 0,001$ et $F_{2, 107} = 7,96$; $p = 0,001$ respectivement). Concernant la phase de dépuration, nos résultats indiquent l'absence de l'effet période ($F_{1, 107} = 0,03$; $p = 0,852$), la présence d'une interaction temps x période très hautement significative ($F_{2, 107} = 7,56$; $p = 0,001$), et d'une interaction traitement x temps x période ($F_{4, 107} = 2,85$; $p = 0,028$).

3.3. EFFET SUBLETAL DU CADMIUM SUR LES COMPOSANTS BIOCHIMIQUES DES GONADES DE *D. trunculus*

3.3.1. Effet sur les réserves énergétiques

Les variations des teneurs des réserves énergétiques (glucides, lipides et protéines) ont été mesurées chez les bivalves en période de repos et d'activité sexuelle, à l'issue du traitement sublétal au Cd (CL₁₀ et CL₂₅) et la dépuración.

3.3.1.1. Effet en période de repos sexuel durant l'exposition aiguë et la dépuración

3.3.1.1.1. Variation des taux de glucides

L'ANOVA à trois critères de classification sur les données des taux de glucides, révèle un effet traitement ($F_{2, 71} = 37,62$; $p = 0,001$) et un effet temps ($F_{2, 71} = 3,90$; $p = 0,026$), ainsi que des interactions temps x phase ($F_{2, 71} = 10,88$; $p = 0,001$), et traitement x temps x phase ($F_{4, 71} = 9,15$; $p = 0,001$).

Durant la **phase d'exposition**, l'application du Cd se traduit par une baisse très significative à 48h ($p \leq 0,01$) avec la CL₂₅ et à 96h ($p \leq 0,001$) avec les deux concentrations sublétales (CL₁₀ et CL₂₅), et ce avec des effets concentrations (48h; $p < 0,05$ et 96h; $p \leq 0,001$). En effet, à la fin de l'expérimentation le pourcentage de diminution des glucides après traitement avec la CL₁₀ est de 5,66 % ($p < 0,05$), et avec la CL₂₅ de 11,16 % ($p \leq 0,001$). En **phase de dépuración**, la comparaison des moyennes des teneurs en glucides montre qu'il n'existe pas de différences significatives ($p > 0,05$) entre les témoins et les traités à partir de 48h, suggérant un potentiel de restauration rapide chez les *D. trunculus* (**Tableau 29**).

3.3.1.1.2. Variation des taux de lipides

L'ANOVA 3 (traitement/temps/phase) sur les taux de lipides chez les individus de *D. trunculus* révèle un effet traitement ($F_{2, 71} = 7,62$; $p = 0,001$), temps ($F_{2, 71} = 9,11$; $p = 0,001$), phase ($F_{1, 71} = 40,71$; $p = 0,001$) et une interaction temps x phase ($F_{2, 71} = 7,94$; $p = 0,001$). Le **tableau 30** ci-dessous représente la variation des taux de lipides obtenue au cours des deux phases étudiées (exposition et dépuración).

Les résultats relatifs à la **phase d'exposition** révèlent une baisse significative ($p < 0,05$) uniquement à la fin de l'exposition (96h) chez le groupe exposés à la CL₂₅. Dans ce cas, le pourcentage de diminution des taux de lipides est de 19,94 %. Lors de la **phase de restauration**, on constate un retour à l'état initial des taux de lipides; les valeurs des lipides chez les traités sont significativement ($p > 0,05$) comparables à celles des témoins.

3.3.1.1.3. Variation des taux de protéines

L'ANOVA 3 sur les données des taux de protéines mesurés en période de repos sexuel, révèle un effet traitement ($F_{2, 71} = 85,30$; $p = 0,001$), temps ($F_{2, 71} = 8,16$; $p = 0,001$), phase ($F_{1, 71} = 38,77$; $p = 0,001$) et une interaction traitement x phase ($F_{2, 71} = 7,55$; $p = 0,001$).

Durant **la phase d'exposition**, les résultats montrent que les teneurs en protéines augmentent significativement chez l'ensemble des traités en comparaison avec les témoins. Après 96h d'exposition au Cd, le taux de protéines a augmenté de 34,12 % chez le groupe exposé à la CL₁₀, et de 24,87 % chez le groupe exposé à la CL₂₅ ($p \leq 0,001$ dans les deux cas). A la fin de la phase de **dépuration** (96h), une augmentation très significative ($p \leq 0,01$) est observée avec les deux concentrations testées par rapport aux témoins (CL₁₀ et CL₂₅) (**Tableau 31**).

Tableau 29. Taux de **glucides** ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades de *D. trunculus* en période de **repos sexuel** durant la phase **d'exposition et de dépuración** ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Période d'exposition (heures)			Période de dépuración (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	95,24 \pm 2,34 a A	93,44 \pm 1,26 a A	96,41 \pm 2,47 a A	96,41 \pm 2,47 a A	94,69 \pm 2,62 a A	93,61 \pm 2,52 a A
CL ₁₀	95,24 \pm 2,34 a A	93,91 \pm 1,82 a A	90,96 \pm 2,34 a B	90,96 \pm 2,34 a B	92,76 \pm 2,25 a A	91,03 \pm 1,77 a A
CL ₂₅	95,24 \pm 2,34 a A	87,43 \pm 1,89 b B	85,66 \pm 1,76 b C	85,66 \pm 1,76 a B	91,67 \pm 2,88 b A	90,13 \pm 2,92 ab A

Tableau 30. Taux de **lipides** ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades de *D. trunculus* en période de **repos sexuel** durant la phase **d'exposition et de dépuración** ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Période d'exposition (heures)			Période de dépuración (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	13,30 \pm 0,97 a A	14,21 \pm 1,13 a A	12,59 \pm 1,11 a A	12,59 \pm 1,11 a A	11,86 \pm 1,25 a A	12,26 \pm 1,90 a A
CL ₁₀	13,30 \pm 0,97 ab A	15,23 \pm 1,31 a A	11,70 \pm 0,85 b AB	11,70 \pm 0,85 a AB	10,89 \pm 1,14 a A	9,94 \pm 2,08 a A
CL ₂₅	13,30 \pm 0,97 a A	13,76 \pm 0,91 a A	10,08 \pm 1,07 b B	10,08 \pm 1,07 a B	10,27 \pm 1,13 a A	10,75 \pm 1,96 a A

- Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les temps d'exposition, tandis que les moyennes d'un même temps d'exposition suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les traitements.

Tableau 31. Taux de **protéines** ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades de *D. trunculus* en période de **repos sexuel** durant la phase **d'exposition et de dépuración** ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Période d'exposition (heures)			Période de dépuración (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	22,29 \pm 1,09 a A	20,43 \pm 1,07 a A	20,22 \pm 1,07 a A	20,22 \pm 1,07 a A	21,44 \pm 1,39 a A	21,99 \pm 1,38 a A
CL ₁₀	22,29 \pm 1,09 a A	23,45 \pm 1,19 a B	27,12 \pm 1,38 b B	27,12 \pm 1,38 a B	26,75 \pm 1,68 a B	27,63 \pm 1,33 a B
CL ₂₅	22,29 \pm 1,09 a A	23,81 \pm 1,60 ab B	25,25 \pm 1,23 b B	25,25 \pm 1,23 a B	27,86 \pm 1,68 a B	26,66 \pm 1,79 a B

- Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les temps d'exposition, tandis que les moyennes d'un même temps d'exposition suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les traitements.

3.3.1.2. Effet chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* en période d'activité sexuelle durant l'exposition aiguë et la dépuración

3.3.1.2.1. Variation des taux de glucides

Le contenu en glucides est déterminé chaque 48h au niveau des gonades de *D. trunculus*, durant la phase d'exposition aux deux concentrations sublétales du Cd (CL₁₀ et CL₂₅-96 h), et la phase de restauration (0, 48, 96h) pour les deux sexes séparément.

Chez les mâles, l'ANOVA à trois critères de classification (traitement, temps et phase) révèle des effets traitement et temps ($F_{2, 71} = 27,49$; $p = 0,001$ et $F_{2, 71} = 9,48$; $p = 0,001$ respectivement), et un effet phase ($F_{1, 71} = 9,56$; $p = 0,003$).

Au cours de la phase d'exposition des mâles, et en comparaison avec les témoins, le taux de glucides diminue significativement ($p < 0,05$; 7,00 %) uniquement avec la concentration la plus élevée (CL₂₅) à 48h d'exposition. A la fin de l'expérience (96h), les teneurs en glucides chutent de manière très significative ($p \leq 0,01$; 7,79 %) avec la concentration la plus faible (CL₁₀), et très hautement significative ($p \leq 0,001$; 10,58%) avec la concentration la plus forte (CL₂₅). Concernant la phase de restauration, la comparaison des moyennes des taux de glucides des mâles, montre qu'il y a un retour à l'état initial à partir de 48h; en effet, il n'y a pas de différence significative entre les témoins et les traités avec les deux concentrations du Cd (CL₁₀ et CL₂₅-96h) ($p > 0,05$) (**Tableau 32**).

Chez les femelles, l'ANOVA à 3 critères de classifications (traitement, temps et phase) des taux de glucides chez les individus femelles de *D. trunculus* révèle un effet traitement ($F_{2, 71} = 21,22$; $p = 0,001$), une interaction temps x phase ($F_{2, 71} = 52,00$; $p = 0,000$), ainsi qu'une interaction traitement x temps x phase ($F_{4, 71} = 5,01$; $p = 0,002$).

L'application du Cd se traduit après 48h d'exposition par une diminution significative ($p < 0,05$) chez les deux groupes des traités (CL₁₀ et la CL₂₅) par rapport aux témoins. Après 96h d'exposition on observe une diminution très significative ($p \leq 0,01$) de l'ordre 6 % chez les traités (CL₁₀ et CL₂₅). Au cours de la phase de dépuración, les femelles restaurent rapidement leur taux initial de glucides dès 48h. En effet, on remarque que pour l'ensemble des groupes traités avec les deux concentrations sublétales (CL₁₀ et CL₂₅-96 h), il n'y a pas de différences significatives ($p > 0,05$) en comparaison avec les témoins (**Tableau 33**).

Tableau 32. Taux de **glucides** ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes **mâles** de *D. trunculus* durant la période d'exposition et de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)			Temps de restauration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	67,02 \pm 1,56 a A	66,03 \pm 1,78 a A	64,70 \pm 1,85 a A	64,70 \pm 1,85 a A	64,12 \pm 0,93 a A	64,46 \pm 1,82 a A
CL ₁₀	67,02 \pm 1,56 a A	64,32 \pm 2,50 a AB	59,66 \pm 1,23 b B	59,66 \pm 1,23 a B	63,99 \pm 1,22 b A	63,30 \pm 0,86 b A
CL ₂₅	67,02 \pm 1,56 a A	61,41 \pm 1,86 b B	57,86 \pm 1,96 b B	57,86 \pm 1,96 a B	63,54 \pm 0,87 b A	62,78 \pm 1,55 b A

Tableau 33. Taux de **glucides** ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes **fémmelles** de *D. trunculus* durant la période d'exposition et de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)			Temps de restauration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	74,64 \pm 1,26 a A	73,63 \pm 1,71 a A	71,99 \pm 1,74 a A	71,99 \pm 1,74 a A	72,14 \pm 1,51 a A	74,05 \pm 2,22 a A
CL ₁₀	74,64 \pm 1,26 a A	69,91 \pm 1,87 b B	67,61 \pm 1,15 b B	67,61 \pm 1,15 a B	73,12 \pm 1,48 b A	72,49 \pm 1,13 b A
CL ₂₅	74,64 \pm 1,26 a A	69,68 \pm 1,57 b B	67,30 \pm 1,55 b B	67,30 \pm 1,55 a B	70,22 \pm 1,55 ab A	71,55 \pm 2,75 b A

- Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les temps d'exposition, tandis que les moyennes d'un même temps d'exposition suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les traitements.

3.3.1.2.2. Variation des taux de lipides

Chez les mâles, l'ANOVA à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de lipides indique l'absence des effets traitement ($F_{2, 71} = 1,48$; $p = 0,238$), et phase ($F_{1, 71} = 2,10$; $p = 0,153$), et révèle un effet temps ($F_{2, 71} = 4,37$; $p = 0,017$).

Au cours de la phase d'exposition et également durant la restauration, la comparaison des moyennes des lipides des témoins avec les traités (CL_{10} et CL_{25}) montre l'absence de différences significatives ($p > 0,05$) (**Tableau 34**).

Chez les femelles, l'ANOVA 3 révèle des effets traitement ($F_{2, 71} = 40,48$; $p = 0,001$), temps ($F_{2, 71} = 23,00$; $p = 0,001$) et phase ($F_{1, 71} = 58,56$; $p = 0,001$).

Le traitement induit uniquement après 96h d'exposition une diminution des taux de lipides, elle est de manière très significative ($p \leq 0,01$) chez la série exposée à la CL_{10} de 24,15 %, et très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez la série exposée à CL_{25} de 31,60 %. Lors de la phase de dépuración, la diminution des taux de lipides persiste à la fin de l'expérimentation (96h; $p > 0,05$) (**Tableau 35**).

Tableau 34. Taux de lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes mâles de *D. trunculus* durant la période d'exposition et de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)			Temps de restauration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	8,65 \pm 0,69 a A	7,53 \pm 0,77 a A	7,26 \pm 0,83 a A	7,26 \pm 0,83 a A	7,06 \pm 0,60 a A	8,49 \pm 0,83 a A
CL ₁₀	8,65 \pm 0,69 a A	7,29 \pm 0,88 ab A	6,66 \pm 0,48 b A	6,66 \pm 0,48 a A	7,79 \pm 0,81 a A	7,17 \pm 0,96 a A
CL ₂₅	8,65 \pm 0,69 a A	6,88 \pm 0,56 b A	7,07 \pm 0,59 b A	7,07 \pm 0,59 ab A	6,59 \pm 0,84 a A	8,26 \pm 0,88 b A

Tableau 35. Taux de lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes femelles de *D. trunculus* durant la période d'exposition et de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)			Temps de restauration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	9,25 \pm 0,50 a A	8,01 \pm 0,50 a A	8,83 \pm 0,82 a A	8,83 \pm 0,82 a A	7,71 \pm 0,88 a A	8,16 \pm 0,57 a A
CL ₁₀	9,25 \pm 0,50 a A	7,97 \pm 0,79 a A	6,61 \pm 0,63 b B	6,61 \pm 0,63 a B	5,41 \pm 0,97 a B	6,13 \pm 0,98 a B
CL ₂₅	9,25 \pm 0,50 a A	7,16 \pm 0,82 b A	6,04 \pm 0,66 b B	6,04 \pm 0,66 b B	5,13 \pm 0,70 a B	6,47 \pm 0,84 a B

- Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les temps d'exposition, tandis que les moyennes d'un même temps d'exposition suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les traitements.

3.3.1.2.3. Variation des taux de protéines

Chez les mâles, l'ANOVA à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de protéines gonadiques révèle un effet traitement ($F_{2, 71} = 67,47$; $p = 0,001$), temps ($F_{2, 71} = 16,25$; $p = 0,001$) et phase ($F_{1, 71} = 21,73$; $p = 0,001$).

Seule la CL_{25} provoque une diminution très hautement significative à 48h (15,41 %) et à 96h (18,49 %) ($p \leq 0,001$) chez les mâles comparativement aux témoins, et ce avec un effet concentration (48h; $p < 0,05$ et 96h; $p \leq 0,01$). En phase de dépuración, les taux de protéines gonadiques ne sont pas restaurés, vu que la diminution notée avec la concentration la plus forte (CL_{25}) persiste à 48h ($p \leq 0,01$) et à 96h ($p \leq 0,001$), avec également un effet concentration (48h; $p \leq 0,001$ et 96h; $p \leq 0,01$) (**Tableau 36**).

Chez les femelles, l'ANOVA à 3 critères de classifications (traitement, temps et phase) des valeurs des protéines révèle un effet traitement ($F_{2, 71} = 36,78$; $p = 0,001$), temps ($F_{2, 71} = 19,88$; $p = 0,001$), phase ($F_{1, 71} = 14,43$; $p = 0,001$), et une interaction temps x phase ($F_{2, 71} = 39,53$; $p = 0,001$).

On constate à 48h une diminution très significative ($p \leq 0,01$) des teneurs en protéine uniquement chez le lot exposé à la CL_{25} (14,32 %), en comparaison avec les témoins. A l'issu de l'expérimentation (96h), on note une diminution significative ($p > 0,05$; 13,91 %) chez le lot traité avec la concentration la plus faible (CL_{10}), et très hautement significative ($p \leq 0,001$; 23,14%) chez le lot traité avec la concentration la plus importante (CL_{25}). Concernant la phase de dépuración, on a remarqué un retour rapide (48h) à l'état initial des valeurs des protéines gonadiques (**Tableau 37**).

Tableau 36. Taux de protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes mâles de *D. trunculus* durant la période d'exposition et de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)			Temps de restauration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	18,51 \pm 1,06 a A	17,53 \pm 0,73 a A	17,15 \pm 0,39 a A	17,15 \pm 0,39 a A	16,04 \pm 0,55 b A	17,84 \pm 0,63 a A
CL ₁₀	18,51 \pm 1,06 a A	16,52 \pm 0,87 b A	16,12 \pm 0,89 b A	16,12 \pm 0,89 a A	16,94 \pm 0,70 a A	17,26 \pm 0,77 a A
CL ₂₅	18,51 \pm 1,06 a A	14,83 \pm 0,20 b B	13,98 \pm 0,12 b B	13,98 \pm 0,12 a B	14,22 \pm 0,55 a B	14,96 \pm 0,80 a B

Tableau 37. Taux de protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes femelles de *D. trunculus* durant la période d'exposition et de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)			Temps de restauration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	22,49 \pm 0,77 a A	21,94 \pm 1,32 a A	20,49 \pm 1,42 a A	20,49 \pm 1,42 a A	21,78 \pm 1,04 a A	20,65 \pm 1,45 a A
CL ₁₀	22,49 \pm 0,77 a A	20,14 \pm 0,52 b AB	17,64 \pm 1,38 c B	17,64 \pm 1,38 c B	20,09 \pm 1,21 a A	18,55 \pm 1,42 a A
CL ₂₅	22,49 \pm 0,77 a A	18,80 \pm 1,27 b B	15,75 \pm 0,47 c B	15,75 \pm 0,47 c B	19,94 \pm 1,06 a A	17,84 \pm 1,90 b A

- Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les temps d'exposition, tandis que les moyennes d'un même temps d'exposition suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les traitements.

3.3.1.3. Comparaison des résultats entre sexe et période

Pour les glucides, afin de comparer la réponse des bivalves en fonction du sexe, l'ANOVA à 3 critères de classifications (traitement, temps et sexe) est réalisée sur les pour chacune des deux phases étudiées. Nos résultats révèlent un effet sexe pour la phase d'exposition ($F_{1, 71} = 384,25$; $p = 0,001$), et également de dépuration ($F_{1, 71} = 505,55$; $p = 0,001$).

Dans le but de révéler la différence de l'effet du Cd en fonction de la période de repos ou de reproduction, l'ANOVA à 3 critères de classifications (périodes, temps et traitement) est appliquée sur les taux de glucides pour chacune des deux phases (exposition et dépuration) séparément. Nos résultats révèlent un effet période pour les phases d'exposition ($F_{1, 107} = 997,78$; $p = 0,001$), et de dépuration ($F_{1, 107} = 841,38$; $p = 0,001$).

Pour les lipides, on observe un effet sexe au cours de la phase d'exposition ($F_{1, 71} = 6,78$; $p = 0,012$), et également la phase de dépuration ($F_{2, 71} = 12,25$; $p = 0,001$). L'effet du Cd en fonction de la période (repos/reproduction) est examiné par une ANOVA à 3 critères de classifications (période, temps et traitement). Elle révèle un effet période pour chacune des phases d'exposition ($F_{1, 107} = 902,88$; $p = 0,001$) et de dépuration ($F_{2, 107} = 295,14$; $p = 0,001$).

Pour les protéines, en phase d'exposition l'ANOVA 3 révèle un effet sexe ($F_{1, 71} = 244,57$; $p = 0,001$), et une interaction temps x sexe ($F_{2, 71} = 7,45$; $p = 0,001$), et en phase de dépuration elle montre également un effet sexe ($F_{1, 71} = 165,25$; $p = 0,001$), une interaction temps x sexe ($F_{2, 71} = 12,68$; $p = 0,001$), et une interaction traitement x sexe ($F_{2, 71} = 5,94$; $p = 0,005$). Dans l'optique d'évaluer l'effet du Cd en fonction de la période (repos/reproduction), une ANOVA à 3 critères de classifications (période, temps et traitement) est appliquée sur les taux des protéines. Nos résultats montrent un effet période ($F_{1, 107} = 138,96$; $p = 0,001$), une interaction temps x période ($F_{1, 107} = 17,92$; $p = 0,001$) et traitement x période ($F_{1, 107} = 17,77$; $p = 0,001$) pour la phase d'exposition. Concernant la phase de dépuration, un effet période ($F_{1, 107} = 350,31$; $p = 0,001$) et une interaction traitement x période ($F_{2, 107} = 43,36$; $p = 0,001$) sont signalés.

3.3.2. Effet sur les oméga-3

Les résultats concernant les oméga-3; eicosapentaénoïque (EPA) et docosahéxaénoïque (DHA) des séries témoins et traités au Cd (CL₁₀ et CL_{25-96h}), durant la phase d'exposition et de dépuration (0 et 96h), et en fonction de la période de repos et d'activité sexuelle sont présentés ci-dessous.

3.3.2.1. Effet en période de repos sexuel durant l'exposition aigüe et la dépuration

3.3.2.1.1. Variation des taux de l'acide eicosapentaénoïque (EPA)

Concernant la **phase d'exposition**, L'ANOVA à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des teneurs en EPA, révèle un effet traitement ($F_{2, 47} = 15,21$; $p = 0,001$), un effet temps ($F_{1, 47} = 4,86$; $p = 0,034$) et une interaction temps x phase ($F_{1, 47} = 4,86$; $p = 0,034$).

L'analyse statistique des moyennes des concentrations d'EPA indique également une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les séries traitées avec les deux concentrations de Cd (CL₁₀ et CL₂₅) comparativement aux témoins. En effet, le taux d'EPA baisse

de 40,96 % après traitement avec la CL₁₀, et de 46,67 % après traitement avec la CL₂₅. En **phase de restauration**, on remarque qu'il n'existe pas de différences significatives ($p > 0,05$) entre les témoins et les traités avec la CL₁₀, ce qui démontre une restauration rapide chez les *D. trunculus* exposés à la concentration la plus faible, alors qu'elle nécessite plus de temps chez le groupe exposé à la concentration la plus forte, car une récupération est observé mais de manière non significative (**Tableau 38**).

3.3.2.1.2. Variation des taux de l'acide docosahéaénoïque (DHA)

L'ANOVA à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des teneurs en EPA chez les bivalves en période de repos sexuel, révèle un effet traitement ($F_{2, 47} = 11,76$; $p = 0,001$), un effet temps ($F_{1, 47} = 7,27$; $p = 0,011$), et un effet phase ($F_{1, 47} = 7,27$; $p = 0,011$).

Durant la **phase d'exposition**, le traitement au Cd entraîne une diminution significative ($p < 0,05$) des concentrations de DHA uniquement chez la série des traitées avec la CL₂₅, et ce avec un pourcentage de 48,68 %. En **phase de restauration**, après 4 jours on remarque que la tendance à la baisse observée précédemment avec la concentration la plus forte du Cd (CL₂₅) persiste ($p \leq 0,01$) (**Tableau 39**).

Tableau 38. Taux d'EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades de *D. trunculus* en période de **repos sexuel** durant la phase **d'exposition et de dépuración** ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)		Temps de restauration (heures)	
	0	96	0	96
Témoins	$1,86 \pm 0,36$ a A	$2,10 \pm 0,25$ a A	$2,10 \pm 0,25$ a A	$2,02 \pm 0,26$ a A
CL ₁₀	$1,86 \pm 0,36$ a A	$1,24 \pm 0,18$ b B	$1,24 \pm 0,18$ a B	$1,69 \pm 0,24$ b AB
CL ₂₅	$1,86 \pm 0,36$ a A	$1,12 \pm 0,15$ b B	$1,12 \pm 0,15$ a B	$1,38 \pm 0,35$ a B

Tableau 39. Taux d'DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades de *D. trunculus* en période de **repos sexuel** durant la phase **d'exposition et de dépuración** ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)		Temps de restauration (heures)	
	0	96	0	96
Témoins	$2,90 \pm 0,63$ a A	$2,28 \pm 0,51$ a A	$2,28 \pm 0,51$ a A	$2,74 \pm 0,49$ a A
CL ₁₀	$2,90 \pm 0,63$ a A	$1,26 \pm 0,60$ b AB	$1,26 \pm 0,60$ a AB	$1,95 \pm 0,34$ a AB
CL ₂₅	$2,90 \pm 0,63$ a A	$1,17 \pm 0,49$ b B	$1,17 \pm 0,49$ a B	$1,51 \pm 0,35$ a B

- Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les temps d'exposition, tandis que les moyennes d'un même temps d'exposition suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les traitements.

3.3.2.2. Effet chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* période d'activité sexuelle durant l'exposition aigüe et la dépuration

3.3.2.2.1. Variation des taux de l'acide eicosapentaénoïque (EPA)

Chez les mâles, l'ANOVA à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des concentrations d'EPA révèle un effet traitement ($F_{2, 47} = 12,66$; $p = 0,001$), ainsi qu'une interaction temps x phase ($F_{1, 47} = 16,17$; $p = 0,001$).

En phase d'exposition, la comparaison des teneurs en EPA indique l'absence de différences significatives ($p > 0,05$) entre les témoins et les séries traitées avec la concentration la plus faible (CL_{10}). Cependant, l'exposition à la CL_{25} provoque une baisse très significative ($p \leq 0,01$) de 33,34 % comparativement aux témoins. En phase de dépuration, les taux d'EPA sont restaurés après 96h du transfert des spécimens dans de l'eau de mer propre, vu que la diminution notée avec la concentration la plus forte (CL_{25}) est rétabli ($p > 0,05$) (**Tableau 40**).

Chez les femelles, l'analyse de la variance (ANOVA) à 3 critères de classifications (traitement, temps et phase) des taux d'EPA révèle un effet traitement ($F_{2, 47} = 11,51$; $p = 0,001$), une interaction temps x phase ($F_{1, 47} = 18,55$; $p = 0,001$).

La comparaison des teneurs en EPA chez les individus femelles met en évidence le même profil observé chez les mâles, avec une baisse significative ($p > 0,05$) de 36,74 % uniquement chez le groupe exposé à la concentration la plus importante (CL_{25}), et un retour à l'état initiale avec une restauration rapide, étant donnée que les teneurs en EPA des traités (CL_{25}) ont atteint des valeurs très proches de celles des témoins ($p > 0,05$) (**Tableau 41**).

Tableau 40. Taux d'EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes mâles de *D. trunculus* durant la période d'exposition et de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)		Temps de restauration (heures)	
	0	96	0	96
Témoins	$0,36 \pm 0,02$ a A	$0,39 \pm 0,04$ a A	$0,39 \pm 0,04$ a A	$0,48 \pm 0,06$ a A
CL ₁₀	$0,36 \pm 0,02$ a A	$0,33 \pm 0,03$ a AB	$0,33 \pm 0,03$ a AB	$0,36 \pm 0,08$ a A
CL ₂₅	$0,36 \pm 0,02$ a A	$0,26 \pm 0,04$ b B	$0,26 \pm 0,04$ a B	$0,38 \pm 0,08$ b A

Tableau 41. Taux d'EPA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes femelles de *D. trunculus* durant la période d'exposition et de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)		Temps de restauration (heures)	
	0	96	0	96
Témoins	$0,46 \pm 0,03$ a A	$0,49 \pm 0,09$ a A	$0,49 \pm 0,09$ a A	$0,60 \pm 0,08$ a A
CL ₁₀	$0,46 \pm 0,03$ a A	$0,41 \pm 0,06$ a AB	$0,41 \pm 0,06$ a AB	$0,52 \pm 0,09$ a A
CL ₂₅	$0,46 \pm 0,03$ a A	$0,31 \pm 0,08$ b B	$0,31 \pm 0,08$ a B	$0,47 \pm 0,08$ b A

- Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les temps d'exposition, tandis que les moyennes d'un même temps d'exposition suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les traitements.

3.2.3.2.2. Variation des taux de l'acide docosahéaénoïque (DHA)

Chez les mâles, l'ANOVA à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des teneurs en DHA révèle un effet temps, et un effet phase ($F_{1, 47} = 9,78$; $p = 0,003$ pour chaque cas), ainsi qu'une interaction traitement x temps x phase ($F_{2, 47} = 5,37$; $p = 0,009$).

L'exposition à la CL₂₅ provoque une baisse très hautement significative ($p \leq 0,001$) de 36,36 % en comparaison avec les témoins. Un effet concentration est également signalé ($p \leq 0,001$). En phase de dépuración, les concentrations de DHA chez les traités avec la concentration la plus forte (CL₂₅) retrouvent des valeurs très proches des témoins à la fin de l'expérimentation (96h) ($p > 0,05$) (**Tableau 42**).

Chez les femelles, l'ANOVA 3 (traitement, temps et phase) des taux de DHA indique un effet traitement ($F_{2, 47} = 7,43$; $p = 0,002$), un effet temps ($F_{1, 47} = 71,87$; $p = 0,001$) et un effet phase ($F_{1, 47} = 71,87$; $p = 0,001$).

La comparaison des moyennes de DHA entre témoins et traités, nous permet de constater une baisse significative ($p > 0,05$) de 25,22 % chez la série traitée avec la CL₁₀, et très significative ($p \leq 0,01$) de 42,02 % en ce qui concerne la série traitée avec la CL₂₅. En phase de dépuración on remarque une restauration rapide des teneurs en DHA après 96h de purification des bivalves (**Tableau 43**).

Tableau 42. Taux de DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes mâles de *D. trunculus* durant la période d'exposition et de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)		Temps de restauration (heures)	
	0	96	0	96
Témoins	$0,75 \pm 0,04$ a A	$0,77 \pm 0,04$ a A	$0,77 \pm 0,04$ a A	$1,02 \pm 0,29$ a A
CL ₁₀	$0,75 \pm 0,04$ a A	$0,73 \pm 0,05$ a A	$0,73 \pm 0,05$ a A	$0,96 \pm 0,24$ a A
CL ₂₅	$0,75 \pm 0,04$ a A	$0,49 \pm 0,03$ b B	$0,49 \pm 0,03$ a B	$1,08 \pm 0,33$ b A

Tableau 43. Taux de DHA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes femelles de *D. trunculus* durant la période d'exposition et de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)		Temps de restauration (heures)	
	0	96	0	96
Témoins	$1,05 \pm 0,11$ a A	$1,19 \pm 0,14$ a A	$1,19 \pm 0,14$ a A	$2,14 \pm 0,14$ b A
CL ₁₀	$1,05 \pm 0,11$ a A	$0,89 \pm 0,17$ a B	$0,89 \pm 0,17$ a B	$2,08 \pm 0,59$ b A
CL ₂₅	$1,05 \pm 0,11$ a A	$0,69 \pm 0,07$ b B	$0,69 \pm 0,07$ a B	$2,02 \pm 0,07$ b A

- Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les temps d'exposition, tandis que les moyennes d'un même temps d'exposition suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les traitements.

3.3.2.3. Comparaison des résultats entre sexe et période

Pour l'EPA, l'ANOVA à 3 critères de classifications (sexe, traitement, temps) révèle un effet sexe pour chacune des phases d'exposition ($F_{1, 47} = 36,28$; $p = 0,001$) et de dépuración ($F_{1, 47} = 21,51$; $p = 0,001$).

L'ANOVA à 3 critères de classifications (période, temps et traitement) démontre un effet période ($F_{1, 71} = 921,86$; $p = 0,001$), et une interaction période x traitement x temps ($F_{2, 71} = 10,03$; $p = 0,001$) pour la phase d'exposition. En phase de dépuración, l'analyse statistique révèle un effet période ($F_{1, 71} = 826,51$; $p = 0,001$), et une interaction traitement x période ($F_{2, 71} = 10,56$; $p = 0,001$).

Pour le DHA, l'ANOVA à 3 critères de classifications (sexe, traitement, temps) montre un effet sexe pour chacune des deux phases; l'exposition ($F_{1, 47} = 108,39$; $p = 0,001$) et la dépuración ($F_{1, 47} = 90,56$; $p = 0,001$). Les résultats obtenus indiquent la présence d'un effet période ($F_{1, 71} = 243,32$; $p = 0,001$), et une interaction période x temps ($F_{1, 71} = 47,37$; $p = 0,001$) pour la phase d'exposition. En phase de dépuración, les résultats rapportent un effet période ($F_{1, 71} = 29,69$; $p = 0,001$) et une interaction période x traitement ($F_{2, 71} = 6,20$; $p = 0,004$).

3.3.3. Effet sur les acides nucléiques

Les acides nucléiques (acide ribonucléique; ARN et ADN; acide désoxyribonucléique) sont quantifiés au niveau des gonades de *D. trunculus* en période de repos sexuel (sexe non séparé), et de reproduction (sexe séparé) en fonction du temps d'exposition (0, 48, 96h) aux deux concentrations sublétales du Cd, et de dépuración (0, 48, 96h).

3.3.3.1. Effet en période de repos sexuel durant l'exposition aigüe et la dépuración

3.3.3.1.1. Variation des taux d'ARN

L'ANOVA à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'ARN indique un effet traitement ($F_{2, 89} = 28,77$; $p = 0,001$), temps ($F_{2, 89} = 14,80$; $p = 0,001$), et phase ($F_{1, 89} = 37,28$; $p = 0,001$).

Durant la **phase d'exposition**, la comparaison des taux d'ARN entre les témoins et les traités, ne montre aucune différence significative ($p > 0,05$) après 48h de traitement. Cependant, après 96h d'exposition nous avons enregistré une baisse très significative ($p \leq 0,01$) de 27,19 % avec la CL₁₀ et très hautement significative ($p \leq 0,001$) de 34,37 % avec la CL₂₅.

Durant la **phase de restauration** les valeurs d'ARN continuent de décroître, la comparaison (témoins/traités) des moyennes révèle à 48h des différences significatives ($p < 0,05$) entre les témoins et les traités avec la CL₁₀, et très significative ($p \leq 0,01$) pour les

traités avec la CL₂₅. Une baisse très hautement significative ($p \leq 0,001$) est observée à 96h avec les deux concentrations testées (**Tableau 44**).

3.3.3.1.2. Variation des taux d'ADN

L'ANOVA à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'ADN chez les individus de *D. trunculus* en période de repos sexuel révèle l'absence des effets traitements, temps, phase, et de toutes interactions ($p > 0,05$).

En **phase d'exposition**, les taux d'ADN restent stables durant toute la durée de l'expérimentation (0, 48, 96h), aucune différence significative n'est observée ($p > 0,05$).

En **phase de restauration**, la stabilité observée lors du traitement persiste, les valeurs d'ADN ne présentent pas de différences significatives ($p > 0,05$) entre les témoins et les traités avec la CL₁₀ et la CL₂₅ durant toute l'expérience (**Tableau 45**).

Tableau 44. Taux d'ARN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades de *D. trunculus* en période de **repos sexuel** durant la phase **d'exposition et de déuration** ($m \pm \text{SD}$, $n=5$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)			Temps de déuration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	5,94 \pm 0,58 a A	5,32 \pm 0,39 a A	5,15 \pm 0,59 a A	5,15 \pm 0,59 a A	5,47 \pm 0,84 a A	5,70 \pm 0,72 a A
CL ₁₀	5,94 \pm 0,58 a A	4,86 \pm 0,81 ab A	3,75 \pm 0,57 b B	3,75 \pm 0,57 a B	3,98 \pm 0,83 a B	3,39 \pm 0,41 a B
CL ₂₅	5,94 \pm 0,58 a A	5,13 \pm 0,51 a A	3,38 \pm 0,48 b B	3,38 \pm 0,48 a B	3,69 \pm 0,51 a B	2,98 \pm 0,76 a B

Tableau 45. Taux d'ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades de *D. trunculus* en période de **repos sexuel** durant la phase **d'exposition et de déuration** ($m \pm \text{SD}$, $n=5$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)			Temps de déuration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	13,32 \pm 0,97 a A	12,68 \pm 0,99 a A	12,78 \pm 0,78 a A	12,78 \pm 0,78 a A	13,37 \pm 0,55 a A	12,97 \pm 0,89 a A
CL ₁₀	13,32 \pm 0,97 a A	12,35 \pm 0,97 a A	12,25 \pm 0,56 a A	12,25 \pm 0,56 a A	12,67 \pm 0,87 a A	12,82 \pm 0,65 a A
CL ₂₅	13,32 \pm 0,97 a A	13,09 \pm 0,80 a A	12,09 \pm 0,64 a A	12,09 \pm 0,64 a A	12,53 \pm 0,80 a A	12,69 \pm 0,62 a A

- Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les temps d'exposition, tandis que les moyennes d'un même temps d'exposition suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les traitements.

3.3.3.2. Effet chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* en période d'activité sexuelle durant l'exposition aigüe et la dépuración

3.3.3.2.1. Variation des taux d'ARN

Chez les mâles, l'ANOVA 3 (traitement, temps et phase) révèle un effet traitement ($F_{2, 89} = 50,07$; $p = 0,001$), temps ($F_{2, 89} = 12,14$; $p = 0,001$), et phase ($F_{1, 89} = 8,33$; $p = 0,005$).

En phase d'exposition, le traitement avec la concentration la plus faible (CL₁₀) du Cd, n'entraîne pas d'effet sur les teneurs en ARN ($p > 0,05$). Cependant, l'exposition à la CL₂₅ provoque une baisse très hautement significative à 48h et à 96h ($p \leq 0,000$) comparativement aux témoins. Le taux d'ARN le plus bas enregistré durant l'expérimentation des mâles est observé après 48h d'exposition avec la CL₂₅, avec un pourcentage de diminution de 29,29 %. De plus, un effet traitement est observé au cours des deux temps d'exposition ($p \leq 0,01$). En phase de dépuración, les taux d'ARN ne sont restaurés qu'après 96h ($p > 0,05$) du transfert des *D. trunculus* dans de l'eau de mer propre, vu que les diminutions notées avec la concentration la plus forte (CL₂₅) persistent à 48h ($p \leq 0,001$), avec un effet concentration ($p \leq 0,01$) (**Tableau 46**).

Chez les femelles, l'ANOVA à 3 critères de classifications des taux d'ARN met en évidence un effet traitement ($F_{2, 89} = 33,68$; $p = 0,001$), temps ($F_{2, 89} = 18,65$; $p = 0,001$), phase ($F_{1, 89} = 55,61$; $p = 0,001$), et une interaction traitement x temps x phase ($F_{4, 89} = 5,43$; $p = 0,001$).

L'exposition aigüe au Cd entraîne une diminution très significative ($p \leq 0,01$; 16,66 %) des teneurs en ARN uniquement chez la série exposée à la CL₂₅ à 96h. En plus, un effet concentration est observé (96h; $p \leq 0,01$). A la fin de la phase de dépuración (96h), on a remarqué l'absence de restauration des taux d'ARN (CL₁₀ et CL₂₅; $p < 0,05$) (**Tableau 47**).

Tableau 46. Taux d'ARN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes mâles de *D. trunculus* durant la période d'exposition et de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n=5$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)			Temps de restauration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	8,60 \pm 0,77 a A	8,16 \pm 0,69 a A	8,32 \pm 0,39 a A	8,32 \pm 0,39 a A	8,46 \pm 0,78 a A	7,72 \pm 0,42 a A
CL ₁₀	8,60 \pm 0,77 a A	7,91 \pm 0,95 a A	7,87 \pm 0,50 a A	7,87 \pm 0,50 a A	7,35 \pm 0,79 a A	8,02 \pm 0,94 a A
CL ₂₅	8,60 \pm 0,77 a A	5,77 \pm 0,61 b B	6,32 \pm 0,63 b B	6,32 \pm 0,63 ab B	5,23 \pm 1,13 a B	6,96 \pm 0,59 b A

Tableau 47. Taux d'ARN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes femelles de *D. trunculus* durant la période d'exposition et de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n=5$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)			Temps de restauration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	12,50 \pm 0,49 a A	12,02 \pm 0,53 a A	11,77 \pm 0,66 a A	11,77 \pm 0,66 a A	12,24 \pm 0,97 a A	11,10 \pm 0,54 a A
CL ₁₀	12,50 \pm 0,49 a A	11,60 \pm 0,63 a A	11,47 \pm 0,72 a A	11,47 \pm 0,72 a A	10,21 \pm 0,67 b B	9,60 \pm 0,75 b B
CL ₂₅	12,50 \pm 0,49 a A	11,34 \pm 0,63 b A	9,81 \pm 0,76 c B	9,81 \pm 0,76 a B	9,23 \pm 0,96 a B	9,93 \pm 0,69 a B

- Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les temps d'exposition, tandis que les moyennes d'un même temps d'exposition suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les traitements.

3.3.3.2.2. Variation des taux d'ADN

Chez les mâles, l'ANOVA à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'ADN indique l'absence de tout effet significatif ($p > 0,05$).

Nos résultats montrent une stabilité des teneurs en ADN durant la phase d'exposition et de restauration, les taux d'ADN ne varient pas significativement ($p > 0,05$) entre témoins et traités (CL₁₀ et CL₂₅), ni au cours du temps, ce qui suggère que le Cd à des concentrations sublétales CL₁₀ et CL₂₅ n'a pas d'effet (**Tableau 48**).

Chez les femelles, l'ANOVA à 3 critères de classifications des teneurs d'ADN chez les femelles met en valeur un effet traitement ($F_{2, 89} = 17,49$; $p = 0,001$), un effet temps ($F_{2, 89} = 3,25$; $p = 0,045$), et un effet phase ($F_{1, 89} = 5,98$; $p = 0,017$).

La comparaison des taux d'ADN entre témoins et traités révèle une baisse très significative ($p \leq 0,01$) de 26,67 % à 48h chez le groupe exposé à la CL₂₅ uniquement. De plus, un effet concentrations est signalé ($p < 0,05$). Des diminutions significatives ($p < 0,05$) après 4 jours d'exposition (96h) chez les deux séries de traités (CL₁₀; 18,18 % et CL₂₅; 15,40 %) sont également rapportées. Durant la phase de dépuración, les taux d'ADN restent affectés chez les bivalves exposés à la CL₂₅ ($p < 0,05$) à 48h et 96h. Cependant, nous avons observé un retour à l'état initiale chez le groupe traité avec la concentration la plus faible (CL₁₀) à la fin de l'expérience avec des moyennes d'ADN similaires à celles des témoins ($p > 0,05$) (**Tableau 49**).

Tableau 48. Taux d'ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes mâles de *D. trunculus* durant la période d'exposition et de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n=5$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)			Temps de restauration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	37,38 \pm 2,03 a A	38,51 \pm 3,12 a A	36,69 \pm 2,43 a A	36,69 \pm 2,43 a A	37,98 \pm 3,07 a A	34,78 \pm 3,17 a A
CL ₁₀	37,38 \pm 2,03 a A	36,89 \pm 3,01 a A	34,30 \pm 2,71 a A	34,30 \pm 2,71 a A	34,29 \pm 2,46 a A	37,44 \pm 2,22 a A
CL ₂₅	37,38 \pm 2,03 a A	36,07 \pm 2,06 a A	35,11 \pm 1,80 a A	35,11 \pm 1,80 a A	36,87 \pm 1,87 a A	38,05 \pm 2,63 a A

Tableau 49. Taux d'ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des gonades des adultes femelles de *D. trunculus* durant la période d'exposition et de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n=5$).

Traitement	Temps d'exposition (heures)			Temps de restauration (heures)		
	0	48	96	0	48	96
Témoins	23,57 \pm 4,04 a A	24,34 \pm 2,65 a A	22,67 \pm 1,84 a A	22,67 \pm 1,84 a A	25,10 \pm 2,65 a A	22,16 \pm 1,83 a A
CL ₁₀	23,57 \pm 4,04 a A	23,10 \pm 2,50 ab A	18,55 \pm 1,78 b B	18,55 \pm 1,78 a B	17,91 \pm 2,01 a B	20,37 \pm 1,33 a AB
CL ₂₅	23,57 \pm 4,04 a A	17,85 \pm 1,92 b B	19,18 \pm 2,43 ab B	19,18 \pm 2,43 a B	20,13 \pm 2,58 a B	18,23 \pm 2,93 a B

- Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les temps d'exposition, tandis que les moyennes d'un même temps d'exposition suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les traitements.

3.3.3.3. Comparaison des résultats entre sexe et période

Pour l'ARN, elle révèle un effet sexe en phase d'exposition ($F_{1, 89} = 805,49$; $p = 0,001$), et en phase de déuration ($F_{1, 89} = 434,70$; $p = 0,001$).

Nos résultats permettent de constater un effet période pour chacune des phases d'exposition ($F_{1, 134} = 191,51$; $p = 0,00$) et de déuration ($F_{1, 134} = 269,13$; $p = 0,001$).

Pour l'ADN, un effet sexe est rapporté durant l'exposition ($F_{1, 89} = 667,58$; $p = 0,001$), et la déuration ($F_{1, 89} = 998,70$; $p = 0,001$), en plus d'une interaction sexe x traitement ($F_{2, 89} = 7,60$; $p = 0,001$).

Enfin, nos résultats montrent un effet période concernant les teneurs d'ADN ($F_{1, 117} = 170,74$; $p = 0,001$) durant la phase d'exposition et de déuration ($F_{1, 117} = 140,42$; $p = 0,001$).

Discussion

4. DISCUSSION

4.1. Toxicité aiguë du cadmium chez *D. trunculus*

La toxicité a été largement utilisée comme outil pour identifier les organismes appropriés en tant que bioindicateurs et déterminer les normes de qualité de l'eau pour les produits chimiques (Chiodi Boudet *et al.*, 2015; Piazza *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). Les tests de toxicité sont un outil essentiel pour évaluer l'effet et le devenir des substances toxiques dans les écosystèmes aquatiques (Shuhaimi-Othman *et al.*, 2011). Les bioessais de toxicité réalisés sur les adultes de *Donax trunculus* exposés au Cd en période de repos et de reproduction à différentes concentrations (5, 7,6 et 10 mg/L) ont été effectués afin d'estimer les concentrations sublétales (CL₁₀ et CL₂₅) et létales (CL₅₀ et CL₉₀) ainsi que leurs intervalles de confiances à 95 % à différents temps d'exposition (24, 48, 72, et 96h). Les résultats obtenus témoignent de la toxicité du Cd à l'égard de *D. trunculus*. Une relation concentration et durée d'exposition significative a été établie. La concentration létale médiane (CL₅₀) exprimée en mg/L est de **7,86** (5,90-10,45) en période de repos sexuel, **3,78** (2,95-4,83) chez les mâles et **2,87** (2,77-3,61) chez les femelles en période de reproduction.

À notre connaissance, la toxicité des métaux lourds chez les mollusques bivalves en fonction de la période d'activité sexuelle et du sexe n'a pas encore été abordée dans la littérature. On signale seulement une étude sur les changements de comportement du bivalve *Lamellidens marginalis* en fonction de la toxicité aiguë du Cd, et qui révèle une sensibilité au Cd plus marquée en été par rapport à l'hiver (Yasmeen *et al.*, 2012).

Nos données sont proches de celles de Neuberger-Cywiak *et al.* (2002), et de Belabed & Soltani (2013) obtenues chez la même espèce après une exposition de 96h au Cd (CL₅₀-96h: 3,8 mg/L; intervalle de confiance de 1,0-5,6 et CL₅₀-96h: 2,59 mg/L; intervalle de confiance de 2,25-2,97 respectivement) en période de reproduction (sexe confondu).

Plusieurs études ont rapporté des valeurs importantes de CL₅₀ chez les bivalves après 96h d'exposition au Cd. Par exemple, elle est de l'ordre de 8,16 mg/L chez *Perna canaliculus* (Chandurvelan *et al.*, 2012), 8 mg/L chez *Ruditapes decussatus* (Vincente *et al.*, 1988), 9,19 mg/L chez *Cerithedia cingulata* (Ramakritiman *et al.*, 2012) et 11,04 mg/L chez *L. marginalis* (Venkata Chandrudu *et al.*, 2007). Cependant, pour d'autres espèces de bivalves, des résultats contradictoires ont été signalés. Par exemple, Keller *et al.* (1991) sur les juvéniles de la moule *Anodonta imbecilis*, mettent en évidence une CL₅₀-96h du Cd de 0,107 mg/L, et Uma-Devi *et al.* (1996) ont obtenu chez *Mytilopsis sallei* dont la longueur de la coquille varie entre 1,9 à 2,6 cm une CL₅₀-96h de 0,71 mg/L.

Le Cd est plus facilement absorbé par les organismes aquatiques lorsqu'il est présent sous sa forme ionique libre (Cd²⁺) (Di Toro *et al.*, 2001). Les niveaux de toxicité du Cd observés dans les organismes aquatiques peuvent être liés aux caractéristiques du milieu, la concentration du calcium, et le pH. La présence de

matière organique dissoute a également une influence sur la toxicité du Cd chez les organismes aquatiques (Penttinen *et al.*, 2011). Les différences dans les valeurs des CL₅₀ aiguës pour le Cd sont liées à l'âge et à la taille des organismes testés; la tolérance au Cd a été observée avec une augmentation de la taille de l'organisme (US EPA, 2001). Les facteurs chimiques de l'eau tels que l'alcalinité et la température, ainsi que les différences inhérentes dans les voies de défense (Rana & Singh, 1996) pourraient également influencer les réponses de toxicité du Cd chez les bivalves.

Les recherches sur d'autres modèles aquatiques telles que le crustacé copépode *Stenocypris major* ont rapporté une CL_{50-96h} du Cd de 13,15 mg/L (Shuhaimi-Othman *et al.*, 2011), et sur des poissons ont indiqué des valeurs de concentrations létales médianes de 24,66 mg/L chez *Oreochromis niloticus* (Garcia Santo *et al.*, 2006), et de 32 mg/L chez *Channa punctata* (Tiwari *et al.*, 2011). On se basant sur ces données *D. trunculus* semble être relativement plus sensible au Cd par rapport aux autres espèces aquatiques citées.

Contrairement aux bivalves, les crustacés ont fait l'objet de quelques essais toxicologiques afin d'estimer la CL_{50-96h} du Cd en fonction du sexe. L'amphipode *Gammarus roeseli* montre une CL_{50-96h} du Cd de 0,107 mg/L chez les femelles et 0,05 mg/L chez les mâles (Gismondi *et al.*, 2012). Inversement, pour le copépode calanoïde *Eurytemora affinis*, les femelles sont plus sensibles à ce métal lourd avec une CL_{50-96h} de 0,09 mg/L contre 0,128 mg/L pour les mâles (Kadiene *et al.*, 2016), ce qui est en accord avec nos résultats. En effet, à la différence des mâles, nos données révèlent une sensibilité plus importante au Cd chez les femelles.

Des voies différentielles nombreuses en fonction du sexe ont été rapportées pour l'élimination des contaminants environnementaux chez les mollusques (McClellan-Gree *et al.*, 2007). L'état physiologique est un facteur important pour déterminer le niveau de sensibilité au Cd chez les organismes aquatiques (Kadiene *et al.*, 2016). L'effet sexe rapporté dans notre étude peut être dû à des différences (1) entre l'induction ou l'efficacité des mécanismes de compensation comme l'osmorégulation expliquant les différences dans les concentrations de l'hémolymphe en [Na⁺] et [Cl⁻] observées chez des organismes exposés à la pollution (2) les limites de tolérance cellulaire par lesquelles ces processus sont induits, ou/et (3) les ressources énergétiques nécessaires/disponibles pour fournir de tels mécanismes (McClellan-Gree *et al.*, 2007). Selon Sornom *et al.* (2010), la différence de sensibilité entre les deux sexes pourrait s'expliquer en partie par une augmentation du métabolisme énergétique pendant l'ovogenèse et l'incubation des œufs, ainsi que l'augmentation qui en résulte dans la mobilisation lipidique chez les femelles. En comparaison avec les processus de spermatogenèse qui sont moins exigeants en termes d'énergies, cette répartition des ressources pourrait conduire à un meilleur état physiologique pour les mâles lorsque les deux sexes sont exposés à un stress. En effet, le Cd induit une reprotoxicité importante chez les femelles de nombreuses espèces aquatiques (réduit la production des oeufs, la fécondité, affecte la ponte, l'expression de la vitellogénine et d'œstradiol) (Driessnack *et al.*, 2017).

4.2. Effet sublétaI du cadmium sur les biomarqueurs

La toxicité avérée du Cd impose un principe de précaution limitant au minimum les contaminations par ce métal et une stratégie de surveillance du niveau de pollution. Dans cette optique, la recherche d'organismes sentinelles comme *D. trunculus* et la mise au point de biomarqueurs permettant de détecter de façon précoce une pollution par le Cd est très importante (Achard-Joris, 2005). Deux biomarqueurs spécifiques au stress oxydant et à la contamination métallique (les protéines carbonylées et les métallothionéines) non utilisés auparavant dans nos programmes de biosurveillance ont été testés.

4.2.1. Effet sur les protéines carbonylées

Les protéines carbonyles (PCs) représentent un marqueur de l'oxydation globale des protéines, car elles sont générées par de multiples espèces réactives d'oxygène dans le sang, les tissus et les cellules (Weber *et al.*, 2015), et un bon biomarqueur de l'exposition des organismes aquatiques aux contaminants environnementaux (Wei *et al.*, 2015; Falfushynska *et al.*, 2016; Joachim *et al.*, 2017). Ces protéines carbonylées affectent la structure, la fonction et l'intégrité des protéines. Une augmentation de ce biomarqueur indiquerait une altération du métabolisme normal des protéines. Ainsi, la carbonylation peut représenter un mécanisme régulateur permettant d'ajuster finement la réponse au stress oxydatif chez les organismes (Fagan *et al.*, 1999). L'attaque des protéines par les ERO ou un sous-produit du stress oxydatif entraîne des modifications spécifiques de certains acides aminés, avec notamment la formation des groupements carbonyles (Levine *et al.*, 1994; Soladoye *et al.*, 2015). Les groupes carbonylés (aldéhydes et cétones) sont produits sur les chaînes latérales des protéines (en particulier de Pro, Arg, Lys) quand ils sont oxydés (Fig. 27). Les protéines carbonylées sont des protéines d'oxydation qui ont tendance à être hydrophobes et résistantes à la protéolyse (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2014).

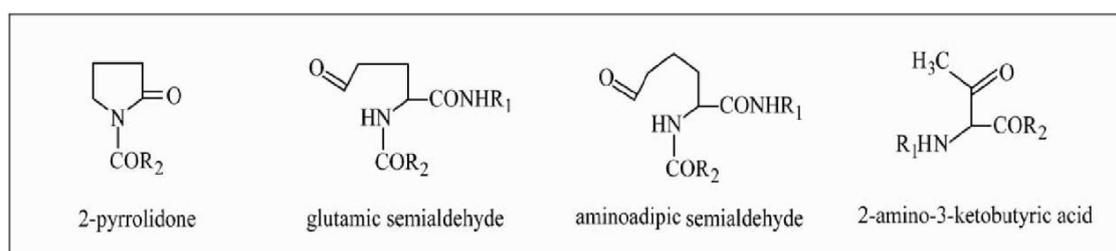


Figure 26. La structure des dérivés carbonylés produits par oxydation directe de chaînes latérales d'acides aminés: 2-pyrrolidone à partir de résidu prolyle, glutamique semialdéhyde d'arginyle et résidu prolyle, un aminoadipic semialdéhyde de résidu lysyle, résidu, et de l'acide 2-amino-3-cétobutyrique de thréonyle (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

La présente étude a révélé que l'exposition de *D. trunculus* aux deux concentrations sublétales du Cd entraîne une induction significative dans les niveaux de PCs. Les réponses observées varient en fonction de la concentration, du sexe et du temps d'exposition. Ainsi, l'effet est relativement plus marqué avec la plus forte concentration. Nos résultats concordent avec les données antérieures rapportées dans les hématocytes du Crabe *Sinopotamon henanense* exposés au Cd pendant 7 jours (Zhou *et al.*, 2017), et dans les tissus des bivalves tels que *Laternula elliptica* contaminés par le cuivre et le fer pendant la période de reproduction (Husmann *et al.*, 2012), ainsi que chez la palourde *Anodontites trapesialis* durant une expérience de transplantation près d'une mine (Oliveira *et al.*, 2016). De même, une induction dans les PCs a été démontrée avec d'autres types de polluants dans d'autres espèces de bivalves comme la moule *Limnoperna fortunei* exposée à des nanoparticules de dioxyde de titane pendant une durée de 2 et 4h (Girardello *et al.*, 2016), et la moule *Mytilus galloprovincialis* échantillonnée le long de deux champs de gaz dans le Nord de la mer Adriatique (Gomiero *et al.*, 2015).

L'induction des PCs a été étudiée chez les bivalves récemment suite à l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Le pédoncule *Chlamys farreri* traité avec le benzopyréne, le chrysène et un mélange des deux montre un effet significatif pour tous les traitements à partir d'1 jour d'exposition (Guo *et al.*, 2017). Une autre étude sur cette même espèce *C. farreri* exposé au chrysène, est la seule à notre connaissance qui prend en considération les périodes du cycle sexuel (avant et après la ponte) et l'effet sexe. En accord avec nos résultats, les femelles présentent une induction plus marquée des taux de PCs par rapport aux mâles, et cette induction baisse après la période de ponte des gamètes, c'est-à-dire durant la période de repos sexuel (Xiu *et al.*, 2016).

L'induction de certains biomarqueurs comme la GST, GSH ou la SOD (Superoxyde dismutase) après la ponte était beaucoup moins significative par rapport à la période d'avant la ponte. Ces observations peuvent être dues à une réduction importante du fardeau corporel de la pollution lors de la ponte. Une perte des contaminants dans les tissus ou les organes a été rapportée dans la période d'après le frai chez les bivalves. La ponte a servi de mécanisme important pour l'élimination des polluants pour les organismes aquatiques pendant le processus de reproduction, vu la transformation importante des polluants dans les tissus après la libération des gamètes mûrs (Amira *et al.*, 2011; Bensouda & Soltani-Mazouni, 2014; Xiu *et al.*, 2016). Ceci pourrait expliquer la baisse des taux de PCs observée dans notre étude en période de repos sexuel.

Durant la période de reproduction, les femelles semblent plus sensibles au Cd comparativement aux mâles. Cet effet sexe peut s'expliquer par la différence dans la demande d'énergie entre les gamètes mâles et femelles. En effet, les bivalves mâles produisent des spermatozoïdes petits avec peu de réserve énergétique en comparaison avec les femelles qui produisent la vitelline pour le développement des ovocytes (Beninger *et al.*, 2003). Cette énergie disponible pour la reproduction peut être

détournée pour faire face au stress subi, ce qui induit une réponse physiologique différente entre les deux sexes dans les gonades des bivalves (Widdows & Donkin, 1992; Meistertzheim *et al.*, 2009).

L'utilisation des PCs comme biomarqueurs du stress oxydatif possède certains avantages par rapport à la mesure d'autres produits d'oxydation en raison de la formation précoce relative et à la stabilité des PCs. La plupart des méthodes de dosages pour la détection des PCs impliquent une dérivation du groupe carbonyle de la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH), ce qui conduit à la formation d'un produit d'hydrazone stable dinitrophényle (DNP). Cela peut ensuite être détecté par divers moyens, notamment le dosage spectrophotométrique utilisé lors de notre étude (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

4.2.2. Effet sur les métallothionéines

Les métallothionéines (MTs) appartiennent au groupe des biomarqueurs qui contribuent à limiter la toxicité des xénobiotiques. De nombreux travaux ont montré que ces marqueurs sub-cellulaires peuvent être induits par les ions métalliques cytosoliques libres et permettraient ainsi l'élaboration d'une réponse physiologique aux métaux lourds comme par le Cd, Cu, Zn, Pb, et cela, pour de nombreux invertébrés marins y compris les bivalves (McComb *et al.*, 2014; Oaten *et al.*, 2015; Lavradas *et al.*, 2016; Pedrosa *et al.*, 2017).

Les MTs sont des protéines non enzymatiques, thermostables et à faible poids moléculaire (4-20 kDa) (Jenny *et al.*, 2004). Elles ne possèdent aucun acide aminé aromatique, histidine ou méthionine, mais elles sont exceptionnellement riches en résidus de cystéine (20 à 30 % de la totalité des acides aminés). La distribution étant fixe dans la molécule (Cis-Cis, Cis-X-Cis ou Cis-X-Y-Cis où X et Y sont des acides aminés différents de la cystéine), ceci leur confère une structure particulière dans laquelle il existe deux domaines (α et β) (Langston *et al.*, 1998) (Fig. 28). De ce fait, ils ont une importante capacité de liaison aux métaux. En effet, les concentrations des thiols (soufre-hydrogène) des résidus de cystéines tendent à augmenter avec l'exposition aux métaux ayant une affinité pour le soufre (Jenny *et al.*, 2004).

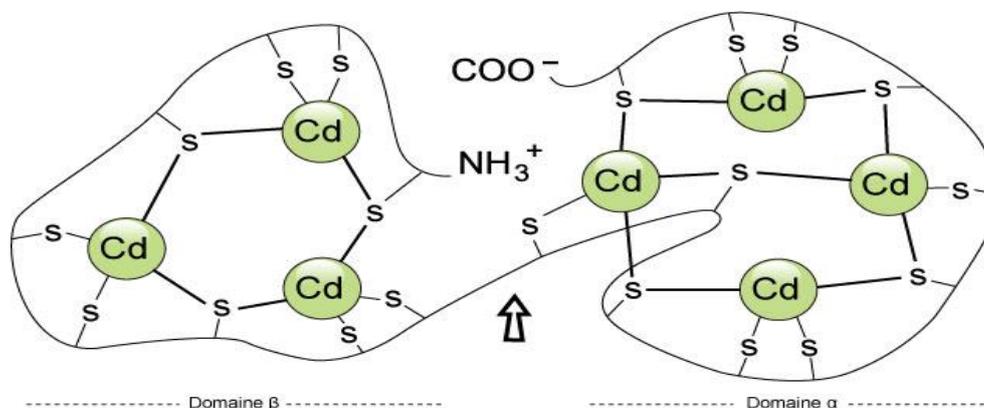


Figure 27. Structure des métallothionéines liés au cadmium (Langston *et al.*, 1998).

Nos résultats révèlent une induction des MTs chez les individus de *D. trunculus* au niveau des gonades, après traitement aux deux concentrations sublétales du Cd. Des effets concentrations, temps et sexe ont été rapportés, ainsi qu'un effet période d'activité sexuelle. Ceci est en accord avec les travaux de Scudiero *et al.* (2014) réalisés sur la moule *M. galloprovincialis* exposée au Cd et au Pb. La quantité de MTs est corrélée avec l'état reproducteur des gonades, étant maximum avant la ponte, et minimum après le frai. Des données similaires ont été également observées chez d'autres espèces de bivalves provenant d'autres endroits géographiques, par exemple chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* les gonades matures présentent l'induction la plus importante de MTs comparativement aux autres organes et au stade de repos sexuel (Meistertzheim *et al.*, 2009). Chez la moule d'eau douce *Anodonta woodiana*, la teneur en MTs de la masse viscérale (y compris les gonades et les intestins) montre une induction significative et rapide dès 48h d'exposition à différentes concentrations de Cd (4,21, 8,43, 16,86, 33,72 et 67,45 mg/L) (Li *et al.*, 2015). Une étude récente a également montré que les MTs sont induites avec un effet concentrations du Cd au niveau de plusieurs tissus (muscle adducteur, branchie, glande digestive) après 96h d'exposition à diverses concentrations (0, 10, 100, 1000 µg/L) (Moncaleano-Niño *et al.*, 2017). Sur le même modèle biologique, Tlili *et al.* (2013) ont noté une augmentation des taux de MTs de la glande digestive chez *D. trunculus* en période de reproduction (Mars) au niveau d'un site proche des industries chimiques et métallurgiques.

L'induction des concentrations des MTs chez les individus traités au Cd indique non seulement l'entrée du contaminant dans les organismes, mais aussi que *D. trunculus* se protège des cations divalents toxiques (Cd^{2+}) et tente la séquestration de ce métal en réduisant leur biodisponibilité pour les sites biochimiques critiques de la cellule. Les Mts joueraient donc un rôle complémentaire à celui des lysosomes et des granules observés chez les invertébrés (Rainbow, 2002; Amiard *et al.*, 2006). En effet, les MTs possèdent des ligands Cd à haute affinité, et jouent un rôle très important dans l'absorption, le transport et la détoxification du Cd (Ladhar-Chaabouni, *et al.*, 2008). Ils ont un potentiel antioxydant élevé, et protègent les cellules contre les effets cytotoxiques des ERO (Viarengo *et al.*, 2000; Isani & Carpené, 2014). Il semble que les MTs soient impliquées dans la protection contre le stress oxydant (Fabisiak *et al.*, 1999). Viarengo *et al.* (1999) ont montré que les moules (*Mytilus edulis*) intoxiquées par le Cd résistent mieux au stress oxydant que celles qui sont non exposées. Les MTs semblent être capables de protéger les cellules vis-à-vis du stress oxydant (Regoli & Giuliani, 2014). En plus, il a été prouvé que la réponse des MTs chez les bivalves suite à une exposition du Cd est dépendante de la température, du pH du milieu, ainsi que du tissu (Nardi *et al.*, 2017).

L'influence de la période d'activité sexuelle sur les MTs suggère un rôle important pour ces protéines de stress pendant la reproduction et le développement. Une étude conduite sur le bivalve *A. woodiana* a montré que les taux de MTs augmentent avec le développement des gonades. De plus, chez les femelles, les niveaux ont continué à augmenter jusqu'à la maturation des ovocytes, qui sont

naturellement arrêtés à la première division de la méiose, et ont diminué précipitamment après la ponte (Meistertzheim *et al.*, 2009). Quand la gonade est mature, elle est presque entièrement composée d'ovocytes (Lubet, 1959) suggérant la présence de MTs dans les ovocytes par opposition à d'autres tissus (Kang *et al.*, 2003). Les niveaux élevés de MTs chez les gonades femelles et mâles indiquent des activités cytoprotectrices pour ces protéines (Scudiero *et al.*, 2014) et un rôle pendant les méioses (Meistertzheim *et al.*, 2009). Le haut niveau de MTs dans les ovocytes des bivalves suggère également un rôle protecteur dans la mitose au cours des stades embryon-larvaires. Il a été démontré que les MTs étaient localisés dans les noyaux d'ovocytes et les embryons des huîtres (Ringwood & Brouwer, 1995; Moraga *et al.*, 2001). Des niveaux élevés de MTs dans les ovocytes pourraient augmenter leurs chances de survie dans un environnement variable. Les stades larvaires des mollusques bivalves sont très sensibles aux polluants, en particulier aux métaux (Hamdoun & Epel, 2007).

Dans notre étude, le sexe affecte les concentrations de MTs. L'influence du sexe sur les MTs a déjà été rapportée chez les bivalves (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999; Smaoui-Damak *et al.*, 2007), et pourrait être expliquée par le rôle joué par ces protéines dans l'homéostasie des métaux essentiels (Isani *et al.*, 2000).

4.3. Effet subléthal du cadmium sur les réserves énergétiques

Les réserves énergétiques constituent un précieux outil de diagnostic pour évaluer la qualité de santé des écosystèmes aquatiques et sont très intéressantes dans l'étude de la réponse d'un organisme soumis à un stress puisque la synthèse, la mobilisation et l'utilisation de défenses antitoxiques ont un coût énergétique pour l'organisme (Yeung *et al.*, 2017). Ainsi, il est important de prendre en compte les réserves énergétiques dans les études écotoxicologiques.

Le stress subi lors d'une exposition à un toxique induit des changements métaboliques conduisant à un épuisement des réserves d'énergie (Calown & Sibly, 1990). En général, dans les organismes contaminés, le budget de l'énergie a été utilisé pour les processus de détoxification afin de maintenir l'homéostasie au détriment de la croissance et de la reproduction. La présente étude appuie cette hypothèse. En effet, nos résultats ont révélé que l'exposition aiguë de *D. trunculus* au Cd à des concentrations sublétales induit une diminution significative des composantes biochimiques (hormis les lipides chez les mâles) et que les réponses observées variaient en fonction de la concentration, du temps, du sexe, et de la période. Cependant, une augmentation significative de la teneur en protéine est observée en période de repos sexuel, ce constat n'est donc probablement pas en lien avec le traitement au Cd, car une mobilisation de ces dernières, en réponse au stress provoqué par le métal, aurait été observée.

Les bivalves emmagasinent l'énergie essentiellement sous forme de glucides et de lipides dont la concentration varie en fonction de ce que l'organisme a préalablement ingéré et assimilé (Picard, 2009) au niveau du manteau et d'autres tissus. Les glucides et les lipides sont ensuite transférées aux gonades pour être

consommés durant la gamétogénèse (Mouneyrac *et al.*, 2008) et l'émission des gamètes (Marobin *et al.*, 2007). En cas de stress sévère, les protéines peuvent aussi être mobilisées comme source d'énergie, ceci s'opère cependant au détriment de leur rôle structural et fonctionnel, car ces molécules ne sont pas initialement synthétisées et stockées dans le but de fournir de l'énergie (Le Gal *et al.*, 1997; Hamdani & Soltani-Mazouni, 2011).

Les glucides sont des composants métaboliques majeurs chez les bivalves (Chalabi, 2001) qui agissent comme des blocs de construction des cellules. Ils sont les premiers nutriments organiques à être dégradés en réponse au stress (Maharajan *et al.*, 2012), les niveaux de glucides mobilisés peuvent fluctuer largement et rapidement avec la variation des conditions (Idayachandiran *et al.*, 2014). L'épuisement des glucides observé dans notre étude a également été rapporté dans la même espèce *D. trunculus* recueilli pendant les deux périodes de repos et de reproduction à partir d'un site contaminé par le Cd dans le golfe d'Annaba (Beldi *et al.*, 2006; Hamdani & Soltani-Mazouni, 2011; Sifi *et al.*, 2013), et d'autres espèces aquatiques comme le bivalve *M. sallei* (Uma Devi, 1996), ou le poisson *C. punctatus* (Kawade & Khillare, 2014) exposées à des concentrations sublétales de Cd.

Le glycogène est le glucide le plus important dans les espèces de bivalves et l'épuisement enregistré dans les niveaux de glucides suggère une activité élevée de glycogénolyse (Ngo *et al.*, 2012; Lacroix *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2017). La mobilisation du glycogène chez les bivalves est connue pour contrer les effets toxiques des métaux comme le Cd, le Pb, et le Cu (Ji *et al.*, 2015; Aru *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2017), et elle est régulée par un facteur neurohormonal le facteur hyperglycémique (Abdraba & Saleuddin, 2000) dont la sécrétion est induite par le Cd (Reddy *et al.*, 1989). Chez les bivalves, le glycogène est stocké pendant le stade de repos sexuel dans les cellules vésiculeuses et adipogranulaires, qui en constituent une réserve spéciale. Ces réserves sont consommées pendant la gamétogénèse où elles jouent un rôle central dans l'approvisionnement énergétique et métabolique (Bacca *et al.*, 2005). De nombreux auteurs ont rapporté une teneur maximale en glycogène immédiatement avant et pendant la prolifération des gamètes. Cette teneur diminue ensuite progressivement pendant la maturation et la première émission des gamètes (Kopp *et al.*, 2005; Dridi *et al.*, 2007; Pronker *et al.*, 2008). Ceci conforte nos résultats relatifs à l'effet période. En effet, des teneurs plus importantes en glucide ont été constatées, durant la période de repos sexuel.

Les lipides ont une influence marquée sur la reproduction des mollusques, et jouent un rôle important durant le développement larvaire et embryonnaire (Signa *et al.*, 2015). De plus, le Cd tend à s'accumuler dans les lipides en raison de ses caractéristiques lipophiles (Chiffolleau *et al.*, 1999).

Nos résultats ont montré une réduction dans le contenu en lipides au niveau des gonades des individus de *D. trunculus* exposés au Cd lors de la période de repos sexuel. De plus, une sensibilité au Cd différente en fonction du sexe des bivalves en période de reproduction a été notée. Les concentrations des lipides ont diminué de

manière significative chez les femelles de *D. trunculus* après traitement aux deux concentrations testées, alors qu'elles restent stables chez les mâles. Des données similaires ont été rapportées chez la même espèce *D. trunculus*, qui a été collectée pendant les deux périodes de repos et de reproduction à Sidi Salem (Annaba), un site contaminé par le Cd (Beldi *et al.*, 2006; Sifi *et al.*, 2013).

Des travaux concernant l'effet sublétal des métaux ont rapporté des résultats semblables. Comme l'effet sur les larves de la moule *M. galloprovincialis* après 48h d'exposition à une concentration de 0,005 mg/L de Cd (Wu *et al.*, 2016) et sur la moule *Perna viridis* exposée au Cu (0,005 mg/L) (Yeung *et al.*, 2016). Les femelles d'autres espèces aquatiques ont montré le même résultat après une exposition au Cd. On peut citer la crevette *Macrobrachium rosenbergii* traitée à une concentration de 0,025 mg/L (Revathi *et al.*, 2011), et le crabe *Chiromantes dehaani* traité aux concentrations de 0,1, 0,5 et 1 mg/L (Liu *et al.*, 2016).

La diminution des lipides gonadiques observée lors de la période de repos, et chez les femelles en période de reproduction peut être due à l'activité accrue de la lipase, l'enzyme responsable de la décomposition des lipides en acides gras libres et donc de l'hydrolyse des triglycérides en glycérol (Steals & Auwerx, 1992). Les lipides constituent les rares réserves d'énergie de rechange et leur mobilisation peut être due à des demandes énergétiques élevées pour contrer le stress toxique (Reddy *et al.*, 1989).

Les lipides ont une importance considérable dans le stockage et l'utilisation saisonnière de l'énergie qui est étroitement liée aux conditions environnementales et au cycle annuel de la gamétogénèse (Lafont & Mathieu, 2007). Une étude sur *D. trunculus* a signalé un effet sexe dans la composition des classes lipidiques des gonades aux derniers stades de la gamétogénèse (Martinez-Pita *et al.*, 2011) avec des niveaux élevés des phospholipides chez les mâles comparativement aux femelles, et des niveaux plus importants de triglycéride et d'ester de stérol chez les femelles. Les niveaux élevés de triglycéride trouvés dans les femelles de *D. trunculus* correspondent probablement à l'incorporation des lipides neutres dans les ovocytes qui se produit dans les dernières phases de leur développement (Duinker *et al.*, 2004). Cependant, les mâles incorporent des lipides principalement sous forme de phospholipides et comme stérols libres qui sont ajoutés dans les membranes des spermatozoïdes (Soudant *et al.*, 1996). D'autre part, le travail d'Evtusjenko *et al.* (1984) suggère que le Cd n'a aucun effet sur la synthèse des phospholipides, ce qui pourrait expliquer l'absence de l'effet du Cd sur les lipides chez les mâles vu leur faible teneur en triglycéride dans les gonades.

Les protéines sont impliquées dans l'architecture des cellules et intensivement dans la formation des gamètes, en particulier au cours de l'ovogenèse chez les femelles, jouant également un rôle important dans la réparation et la protection des organismes contre les dommages environnementaux (Umminger, 1977; Ansell *et al.*, 1980; Maharajan *et al.*, 2012). En effet, la production et l'expression des protéines reflètent les réponses physiologiques aux conditions environnementales changeantes ou stressantes (Gotelli *et al.*, 2012; Pedrosa *et al.*, 2017). Dans des conditions de

stress, les protéines fournissent de l'énergie dans les voies métaboliques et les réactions biochimiques pour contrer cette agression (Maharajan *et al.*, 2012; Do Nascimento *et al.*, 2016).

Dans notre étude *D. trunculus* présente des diminutions très importantes des taux de protéines au cours des deux périodes étudiées. Puisque les bivalves ont une quantité limitée de glucides et de lipides, la prochaine source alternative d'énergie pour répondre à la demande accrue est les protéines (Le Gal *et al.*, 1997; Xuan *et al.*, 2011; Yeung *et al.*, 2017). De nombreuses espèces de bivalves ont montré une réduction des protéines pour surmonter le stress induit par le Cd: *M. sallei* exposé à la concentration de 0,71 mg/L (Uma-Devi *et al.*, 1996), *A. anatine* nourri avec des algues contenant la dose de 0,0059 µg/g de poids sec (Ngo *et al.*, 2012) ou *M. edulis* traité à la concentration de 0,2 mg/L (Geret *et al.*, 2002). Une analyse protéomique réalisée sur le bivalve *Saccostrea cucullata* a révélé onze protéines dans les gonades, dont les niveaux d'expression ont été significativement modifiés par le Cd (1 mg/L) après seulement 48h, et a indiqué que les principales fonctions de ces protéines sont comme suit: liaison, translocation des protéines, catalyse, la fonction de reproduction, la structure du squelette, et la régulation du métabolisme énergétique (Zhu *et al.*, 2012). La déplétion des niveaux de protéines totales suggère une protéolyse accrue et une utilisation possible de leurs produits de dégradation à des fins métaboliques, elle peut être due à une augmentation du catabolisme et à une diminution de l'anabolisme des protéines, comme l'ont rapporté les études sur le bivalve d'eau douce *Parrysia corrugata* (Deshmukh & Lomte, 1998). Une autre hypothèse a été émise, la réduction des taux de protéines a été attribuée également à une utilisation des acides aminés dans la synthèse du glucose par néoglucogénèse pour fournir de l'énergie requise durant une exposition aux polluants (Vijayavel *et al.*, 2006).

Les protéines sont fortement mobilisées durant la reproduction pour la vitellogénèse (Gautier-Clerc *et al.*, 2002), alors que Moncaleano-Níno *et al.* (2017) ont démontré récemment que l'exposition aigüe (96h) à des concentrations sublétales de Cd réduit significativement le taux de vitellogénines (Vtg) qui sont des glycophospholipoprotéines contenant des ligands spécifiques aux métaux tels que le Cd et Zn (Wallace, 1985) et sont les principaux précurseurs des vitellines. De plus, il est connu que les niveaux de Vtg peuvent varier considérablement au cours de la vie d'un bivalve et ont tendance à être beaucoup plus élevés chez les femelles adultes, alors que les juvéniles et les mâles ont tendance à avoir des niveaux inférieurs (Moncaleano-Níno *et al.*, 2017). Ces données concordent avec nos résultats, et pourraient expliquer la plus grande sensibilité des femelles à l'égard de ce toxique, probablement par son interférence avec le système endocrinien (Ketata *et al.*, 2007). En effet, le Cd est classé comme un produit chimique perturbateur endocrinien (Iavicoli *et al.*, 2009).

4.4. Effet sublétal du cadmium sur les oméga 3

Les acides gras (AG) sont nécessaires pour la production et la perméabilité de la membrane cellulaire; ils sont les principaux composants des lipides et utilisés

comme combustible dans tous les systèmes métaboliques, jouant un rôle important dans la réponse biochimique et physiologique (Neves *et al.*, 2015). Au cours des dernières années, une recherche intensive a montré les avantages des acides gras oméga-3 (Swanson *et al.*, 2012, De Camargo Talon *et al.*, 2015, Drudi *et al.*, 2017); les plus importants sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), ce sont des AG essentiels qui ont un rôle clé dans la santé humaine; ils servent de précurseurs d'eicosanoïdes (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes) qui présentent une large gamme d'actions physiologiques comme la réponse immunitaire, la réponse inflammatoire, la fonction neurale, la reproduction et l'amélioration de l'adaptation des organismes au stress environnemental (Vance & Vance, 2002; Merzouk *et al.*, 2008; Nani *et al.*, 2015). Les acides gras oméga-3 réduisent le taux de cholestérol et l'incidence des maladies cardiaques, des accidents vasculaires cérébraux et de l'accouchement prématuré (Daviglius *et al.*, 2002, Patterson, 2002). Selon les recherches récentes, le DHA devrait être considéré comme un candidat potentiel dans la prévention de la prolifération tumorale et l'angiogenèse (Berger *et al.*, 2013). Les oméga-3 ont un rôle également dans les grandes fonctions de tous les animaux à tous les niveaux trophiques, y compris les invertébrés planctoniques, les poissons, et les bivalves. Ils ne peuvent pas être synthétisés *de novo*, ou du moins pas en quantité suffisante (Saito and Aono, 2014). *D. trunculus* a été identifié comme une excellente source de ces AGPI à longue chaîne (Boussoufa *et al.*, 2011).

Il a été rapporté que les quantités d'EPA et de DHA diminuaient généralement avec l'augmentation des niveaux de contamination et sont souvent associées à la peroxydation ou à la diminution de la perméabilité de la membrane (Signa *et al.*, 2015; Filimonova *et al.*, 2016). Notre étude a montré que le Cd à des concentrations sublétales peut réduire les niveaux des AGPI oméga-3 significativement suite à une exposition aiguë confirmant les rapports précédents. Par exemple, les bivalves *M. edulis* exposés à 0,05 mg/L du Cu pendant 24h et 72h (Fokina *et al.*, 2013), et *Mizuhopecren yessoensis* exposés à 0,25 ppm de CdCl₂ (Chelomin & Belcheva, 1991), ont montré une faible teneur d'EPA et de DHA en comparaison avec les témoins. De plus, la moule *M. galloprovincialis* transplantée d'un site de référence vers un site touché par la contamination métallique et par les HAP, montre une réduction à la fois de l'EPA et de DHA (Signa *et al.*, 2015). Le même effet a été observé chez les espèces de poissons comme *Lates calcarifer* traité avec du nickel et du mercure pendant 96h (Senthamilselvan *et al.*, 2016), et chez *O. niloticus* collecté sur un site contaminé par les activités humaines et en particulier les métaux lourds (Muinde *et al.*, 2013).

La réduction des oméga-3 observée dans notre étude peut être due à l'activation du mécanisme de peroxydation lipidique, puisque les AGPI sont des cibles primaires de l'ERO, lorsque le processus de formation des radicaux lipidiques commence, une saturation plus élevée des lipides, et des concentrations élevées d'oxygène provoquent l'augmentation de la rapidité des réactions en chaîne des radicaux lipidiques (Anacleto *et al.*, 2014). Cependant, il existe chez les bivalves des

acides gras particuliers, dits « non-methylene-interrupted » (NMI diénoïques, à deux doubles liaisons), qui se distinguent par la présence de plus d'un groupement méthyle entre chaque double liaison (Ojea *et al.*, 2004), ce qui les rend plus résistants au stress oxydatif. De plus, ces AG particuliers peuvent être synthétisés *de novo* par les bivalves et utilisés pour remplacer les AG les plus sensibles (Barnathan, 2009). La diminution observée pour les AGPI, en particulier pour le DHA couplé à l'augmentation des AG NMID, est un mécanisme compensatoire rapporté chez les bivalves pour réduire la susceptibilité à la peroxydation lipidique (Munro & Blier 2012, Signa *et al.*, 2015) tout en maintenant une fluidité adéquate de la membrane, la proportion élevée de ces NMID réduit la susceptibilité à la peroxydation lipidique.

La reproduction des bivalves intertidaux comprend la gamétogénèse, le développement et la métamorphose, qui sont tous des processus consommateurs d'énergie (Martinez *et al.*, 2000). Le succès de ces processus dépend de l'état physiologique et surtout de l'état pré-ponte de l'adulte (Hendriks, 2004). Une relation directe a été observée entre l'EPA et le DHA avec la gamétogénèse chez *D. trunculus* (Boussoufa *et al.*, 2011). L'EPA sera utilisée de manière préférentielle pendant le développement embryonnaire en tant que source d'énergie (Freites *et al.*, 2010; Martínez-Pita *et al.*, 2012), tandis que le DHA jouera un rôle important aux niveaux structural et fonctionnel des membranes cellulaires impliquées dans l'ovogenèse et l'embryogenèse, et influencera la survie des larves (Soudant *et al.*, 1999; Pazos *et al.*, 2003).

Le profil obtenu des oméga-3 montre des différences entre le sexe chez *D. trunculus*. En effet, les mâles présentent des valeurs plus élevées d'EPA et de DHA. Le contenu en 20: 5n-3 et 22: 6n-3 diffère entre les espèces de bivalves. Chez *M. galloprovincialis* (Martínez-Pita *et al.*, 2012) et *Patella depressa* (Morais *et al.*, 2003) le taux de ces deux AGPI était plus élevé chez les mâles par rapport aux femelles, confirmant nos constatations sur *D. trunculus*. Les différences dans la composition des AG entre les deux sexes pourraient être liées aux différences dans la composition lipidique. Nous avons précédemment précisé que des niveaux élevés des phospholipides ont été trouvés chez les mâles, contrairement aux femelles qui présentaient de leur part, des niveaux plus importants de triglycéride et d'ester de stérol. Puisque les AGPI sont principalement situés dans les phospholipides, alors que les lipides neutres tels que le TG et l'ester des stérols accumulent le 14: 0 et les acides gras mono-insaturés (Saito, 2004), ceci pourrait expliquer nos résultats.

Des études antérieures ont montré que le Cd peut affecter fortement le métabolisme énergétique à de faible concentration en supprimant la fonction mitochondriale et en augmentant la demande d'énergie basale d'un organisme pour couvrir les coûts énergétiques de la détoxification et la réparation des dommages (Ivanina *et al.*, 2009; Cannino *et al.*, 2009). De plus, il existe une différence dans la demande énergétique des gamètes mâles et femelles. Il a été démontré que la bioaccumulation de plusieurs métaux lourds, y compris le Cd, dépend du sexe pendant

la gamétogénèse chez *M. galloprovincialis*; cette bioaccumulation est plus élevée chez les femelles (Richir & Gobert, 2014).

4.5. Effet sublétalet du cadmium sur les acides nucléiques

La majorité de l'ADN est contenu dans le noyau de la cellule, et une partie infime est présente dans les mitochondries et les centrioles. La synthèse de l'ARN à partir de l'ADN est assurée par l'ARN polymérase, l'enzyme dirigeant la transcription, tandis que l'ADN polymérase intervient dans la réplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire, mais aussi dans des processus de réparation et de recombinaison de l'ADN (Lodish, 2000). La quantité d'ADN est constante pour les individus de la même espèce et représente le nombre de cellules, alors que l'ARN (principalement ribosomique) représente le degré de synthèse des protéines (Varo *et al.*, 2007). Les méthodes basées sur les acides nucléiques sont récemment devenues un outil important dans la détermination de l'état physiologique des organismes marins. Les acides nucléiques ont été appliqués avec succès en tant qu'indicateurs de l'état nutritionnel, ainsi que de la croissance des organismes marins, ils sont également utiles en tant qu'indicateurs d'impacts naturels ou anthropiques dans la population et les communautés aquatiques (Chícharo & Chícharo, 2008; Laflamme *et al.*, 2012; Yeung *et al.*, 2017).

Dans notre étude, les taux des acides nucléiques chez les individus de *D. trunculus* varient en fonction de l'activité sexuelle et du sexe au cours de l'exposition au Cd. Le taux d'ADN est significativement réduit uniquement chez les femelles en période de reproduction, suggérant l'inhibition de l'accumulation de l'ADN dans leurs gonades, et l'altération de l'ovogenèse. Pour les taux d'ARN, une diminution après traitement est observée chez l'ensemble des groupes traités (en période de repos et de reproduction).

Chez le bivalve *Placopecten magellanicu* en période de différenciation des gamètes, et exposé à de faibles concentrations de Cu et de Cd, une diminution des concentrations d'ARN chez les deux sexes a été observée, confirmant ainsi nos résultats. De plus, contrairement à nos données, l'effet sur l'ADN a été signalé uniquement chez les mâles (Gould *et al.*, 1988). Toutefois, l'étude menée par Acosta & Lodeiros (2001) sur la moule *P. viridis* traitée avec différentes concentrations de Cu (0,05, 0,1, 0,2 et 0,8 mg/L), n'indique pas de variation significative des niveaux d'ADN après une exposition de 96h. Chez le bivalve *L. marginalis*, l'ADN et l'ARN ont diminué considérablement dans différents organes (branchies, pied, glande digestive) après traitement avec le nickel par rapport aux témoins (Andhale & Zambare, 2011). Ceci confirme ainsi nos résultats.

En milieu naturel, l'évolution saisonnière des taux d'ADN et d'ARN montre qu'ils sont étroitement liés au cycle reproducteur de *D. trunculus*. La comparaison entre sites, par rapport au degré de pollution montre que la quantité d'ADN au niveau du manteau des bivalves n'est pas affectée au mois d'Avril et d'Octobre, tandis qu'une diminution des taux d'ARN est signalée uniquement en période de

reproduction à Sidi Salem, un site touché par la pollution métallique (Hamdani, 2007).

Les conditions environnementales peuvent exercer un contrôle sur la synthèse, l'activité et la dégradation des acides nucléiques, il est donc important d'étudier périodiquement les niveaux d'ADN et d'ARN dans les différents tissus des organismes subissant des conditions de stress (Andhale & Zambare, 2011). En effet, les taux d'acides nucléiques varient en fonction du cycle reproducteur, et de la température de l'eau de mer dans laquelle se trouvent les individus (Norkko *et al.*, 2005). La température est un facteur important ayant un impact direct sur la fonction des enzymes, et *D. trunculus* n'a pas la capacité de réguler sa température et dépend entièrement de celle de son environnement, ce qui peut modifier sa physiologie et sa biochimie. De plus, la température modifie également les caractéristiques chimiques des métaux (Dame, 1996; Mubiana & Blust, 2007). Ceci pourrait expliquer la différence dans la réponse des acides nucléiques au Cd en fonction des périodes de repos (Novembre) et de reproduction (Mars).

Une fois dans la cellule, les métaux vont rapidement s'accumuler dans le noyau. À ce niveau, ils vont stimuler la synthèse d'ARNm codant pour les métallothionéines (MTs), inhiber l'activité de l'ARN polymérase I et II responsable de la synthèse de l'ARNr et l'ARNm respectivement, notant que l'ARNr forme 85-90 % de l'ARN totale du noyau et du cytoplasme. Les métaux peuvent altérer la structure et le métabolisme de l'ADN et causer des anomalies au niveau des chromosomes (Young, 1970; Bryan & Hidalgo, 1976; Viarengo *et al.*, 1982). La génotoxicité du chlorure de Cd à de faibles concentrations a été démontrée chez les organismes aquatiques (Lemoine *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2010; Nardi *et al.*, 2017). Plusieurs hypothèses ont été avancées concernant le mécanisme d'action du Cd; par exemple, il pourrait produire des dommages à l'ADN en créant des cassures dans ses brins, ou par une inhibition des enzymes de réparation de l'ADN (Michel & Vincent-Hubert, 2015), ou encore indirectement par la production de radicaux libres qui peuvent attaquer les acides nucléiques, et entraîner ainsi une destruction et un dysfonctionnement de leurs fonctions (Bertin & Averbek, 2006; Hsu *et al.*, 2010; Yannick *et al.*, 2017).

L'effet sexe du Cd mis en évidence au niveau des acides nucléiques en période de reproduction, et où les femelles semblent être plus sensibles peut s'expliquer par l'état physiologique particulier des femelles au cours de l'ovogenèse, et par la différence entre les deux sexes en ce qui concerne la demande énergétique.

4.6. Dépuration du cadmium

Lorsque le Cd contamine l'écosystème aquatique, il peut pénétrer dans la chaîne alimentaire par la consommation directe d'eau ou de biote, et par des voies non alimentaires telles que l'absorption par l'épithélium (Ruangsomboon & Wongrat, 2006). Les bivalves font partie de la chaîne alimentaire aquatique et peuvent amasser une quantité importante de Cd en consommant des algues, des microorganismes, ou de l'eau. Ensuite, les humains peuvent amasser une plus grande quantité de Cd par le biais de l'alimentation. Des études indiquent que les bivalves ont une grande capacité

d'accumulation du Cd, avec des concentrations qui augmentent linéairement avec la période d'exposition (Company *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2015; Perić *et al.*, 2017). De plus, chez les mollusques bivalves, il existe une indication claire que les ERO induisent dans les tissus un stress oxydatif endommageant les compartiments intracellulaires à différents niveaux (Chelomin *et al.*, 2005; Belabed & Soltani, 2013; Pedrosa *et al.*, 2017). Pour ces raisons, la dépuraction du Cd chez les bivalves doit être prise en considération pour réduire l'exposition des mollusques aux métaux lourds (Zhang *et al.*, 2015). En effet, beaucoup d'études ont porté sur la dépuraction et l'élimination des microorganismes pathogènes chez les espèces comestibles comme *D. trunculus* (Çolakoglu *et al.*, 2014). Cependant, l'effet de la dépuraction en contamination chimique a été négligé, et l'état biochimique des organismes après cette période est pratiquement inconnu. La façon dont les différentes espèces aquatiques répondent à la dépuraction est également mal comprise (Freitas *et al.*, 2012).

Dans cette étude, la dépuraction des animaux exposés au Cd pendant 96h puis transférés dans de l'eau de mer propre dépend des concentrations sublétales testées (CL₁₀ et CL₂₅), de la période étudiée (repos/reproduction), et du sexe. Nos résultats démontrent un potentiel de purification important chez *D. trunculus*, puisque ce filtreur retrouve des valeurs de composants biochimiques gonadiques relativement proches de celles des témoins.

La diminution des composants biochimiques constatée après la période de dépuraction peut résulter de l'activation du système de détoxification (Belabed & Soltani, 2013), et des voies métaboliques pour éliminer activement les différentes formes d'agressions subies par les tissus. Par exemple, il a été rapporté que la restauration des niveaux de PCs chez les bivalves serait due au processus des systèmes protéolytiques (Hofmann & Somero, 1995, 1996) ou par des fonctions carbonyle réductase (Gebel *et al.*, 1991; Forrest & Gonzalez, 2000; Walker *et al.*, 2000; Andrys *et al.*, 2015). La réduction des PCs est particulièrement évidente dans le muscle adducteur de la moule *M. edulis* exposée à un stress oxydatif (Walker *et al.*, 2000). Comme ce muscle doit fonctionner de manière anaérobie pendant de longues périodes d'immersion (Chantler, 1983), il semble être impliqué dans la réduction des effets de l'oxygène et les espèces réactives liées à celui-ci.

Dans l'étude d'El-Shenawy (2004), qui porte sur la dépuraction des métaux lourds chez la coque *R. decussatus* et ses effets physiologiques, il a été démontré que des interactions synergiques ont eu lieu dans la réponse de la consommation d'oxygène et de l'excrétion d'ammoniac pendant la dépuraction. La respiration croissante est indicative des besoins énergétiques accrus, alors que l'augmentation de l'excrétion d'ammoniac est révélatrice d'une augmentation du catabolisme des protéines (Moore *et al.*, 1984). La diminution de la consommation de l'oxygène associée à l'utilisation des protéines pendant l'exposition aux métaux lourds suggère que les bivalves pourraient passer au métabolisme anaérobie lors de l'exposition aux métaux dans l'environnement (Widdows & Donkin, 1992; Devi, 1996). De plus, l'augmentation de l'absorption d'oxygène est corrélée à l'augmentation de l'activité des

valves après 4 jours de dépuración. La période de restauration pourrait améliorer les paramètres physiologiques en diminuant le stress oxydatif des métaux sur les branchies (El-Shenawy, 2002), qui est le site initial de l'absorption des polluants.

La diminution des niveaux de MTs en période de dépuración observée dans notre étude, et confirmée par Freitas *et al.* (2012) sur le bivalve *R. decussatus* exposé aux métaux lourds. En effet, ces chercheurs ont rapporté qu'en période de dépuración, la majeure partie de l'élément est attribuée à la fraction insoluble contenue dans les granules riches en métal, débris cellulaires et organelles, diminuant le pourcentage d'élément dans la fraction soluble au niveau du cytosol. Comme indiqué par l'hypothèse de Ng & Wang (2004) pour *Ruditapes philippinarum*, les niveaux élevés d'éléments dans la fraction insoluble jouent un rôle dans la détoxification, entraînant une indisponibilité d'éléments pour les MTs.

Freitas *et al.* (2012) ont également rapporté une diminution des niveaux de la peroxydation lipidique et de quelques enzymes antioxydantes comme la catalase, la SOD, et la GST en condition de dépuración, révélant que ces biomarqueurs réduisent le stress oxydatif dans un environnement pollué. Enfin, dans une étude sur la restauration des métaux lourds (Cd, Cu, Pb, Zn, Br...) chez trois espèces de mollusque bivalve (*R. philippinarum*, *M. galloprovincialis* et *Scrobicularia plana*), Anacleto *et al.* (2015) indiquent clairement que l'efficacité de la dépuración des éléments toxiques dépend de l'espèce, le temps de dépuración, l'élément, et les niveaux initiaux du polluant chez le bivalve.

Conclusion et perspectives

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le présent travail a pour objectif de contribuer à la compréhension du mécanisme de toxicité du cadmium (Cd), un métal lourd très toxique dont la présence a été détectée dans le golfe d'Annaba, à travers l'analyse biochimique des gonades d'une espèce bioindicatrice de la pollution, *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia), en fonction de l'activité sexuelle, et du sexe pendant l'exposition aigüe, et la dépuraton. Plusieurs aspects ont été envisagés:

- **Paramètres de létalité du Cd:** la toxicité aigüe du Cd chez ce mollusque comestible, a été évaluée par la détermination des concentrations sublétales (CL₁₀ et CL₂₅) et létales (CL₅₀ et la CL₉₀) de ce xénobiotique additionné à l'eau de l'élevage à différentes concentrations (5, 7,6 et 10 mg/L) pour une durée d'exposition de 24, 48, 72 et 96h. La létalité de Cd a été évaluée en fonction du cycle sexuel du mollusque (période de repos et de reproduction) et du sexe (durant la période d'activité). Les résultats obtenus ont mis en évidence une toxicité du Cd, avec une relation dose-réponse. L'effet est relativement marqué chez les femelles.
- **Impact sur les taux des métallothionéines et des protéines carbonylées:** l'impact subléta du Cd a été examiné sur les réponses de deux biomarqueurs non testés dans notre laboratoire; les métallothionéines, impliquées dans la séquestration des métaux, et les protéines carbonylées, marqueur de l'oxydation des protéines. On a enregistré une induction de ces deux biomarqueurs suite au stress oxydatif provoqué par l'exposition au Cd, et ce avec un effet sexe, concentration et période.
- **Impact sur la biochimie des gonades:** une étude de la composition biochimique des gonades portant sur les principaux constituants (glucides, lipides et protéines), les AGPI de la famille des oméga 3 (EPA et DHA) et les acides nucléiques (ARN et ADN) a été réalisée suite à une exposition sublétale au Cd. Dans un premier temps, nous avons pu mettre en évidence l'importance des réserves énergétiques dans la réponse au stress, à travers la diminution des glucides, lipides et protéines. En effet, les mécanismes de défense impliquent des coûts énergétiques qui diffèrent en fonction du sexe, de la concentration du polluant et de la période étudiée pouvant correspondre à des compromis entre reproduction, détoxification, survie et métabolisme énergétique. Les variations des AGPI de la famille des oméga 3 (EPA et DHA) reflètent l'état de la santé affecté des bivalves exposés à des concentrations sublétales du Cd. Les résultats obtenus montrent une baisse dans les concentrations des deux AG essentiels pour les bivalves et pour la santé humaine, au vu de la valeur nutritionnelle accordée à cette espèce comestible. La diminution du taux d'ADN observé uniquement chez les femelles traitées témoigne de la diminution des nombres des ovocytes, alors que la baisse du taux d'ARN renseigne sur les atteintes portées à la synthèse des protéines.
- **Évaluation du potentiel de dépuraton de l'espèce:** la dépuraton des contaminants chimiques est encore mal connue. Les constats relatifs à la

dépuration effectués lors de notre étude peuvent être utiles dans la compréhension des mécanismes de réparation des dommages engendrés par le Cd. La dépuration dépend étroitement des concentrations testées, du sexe, du temps et de la période étudiée. La sensibilité accrue de l'espèce en période de reproduction et des femelles confirment l'importance de corréler les études avec la période du cycle sexuel et le sexe dans les études écotoxicologiques. Les stades du développement reproductif, la gamétogénèse, la ponte et les différences métaboliques entre les mâles et les femelles, sont des éléments physiologiques essentiels dans la réponse des bivalves au stress.

L'étude permet de projeter des perspectives intéressantes qui considèreraient les points suivants:

- La protection et/ou la réparation des protéines par le dosage de la HSP70.
- La mesure de la production d'ATP afin d'évaluer l'énergie nécessaire aux cellules pour tolérer une exposition au stress.
- La cytochrome C oxydase, représentée par le gène de sa sous-unité 1, est un marqueur mitochondrial dont la surexpression est liée au métabolisme énergétique dans la réponse au stress.
- Le dosage du cytochrome P450, responsable de la biotransformation des polluants en métabolites.
- Le dosage des enzymes, comme les élongases et les désaturases impliquées dans la synthèse des AGPI, ce qui permettrait de mieux élucider leur mode d'action dans la réduction des AG.
- La dépuration sur une durée plus longue afin d'apprécier la réversibilité de la toxicité sur les organismes exposés et ce, à tous les niveaux (organe, cellulaire et moléculaire).

Résumés

6. RESUMES

6.1. Résumé

Le Cadmium (Cd) est un métal lourd occupant le septième rang sur la liste des substances dangereuses prioritaires. Il se révèle être un polluant majeur dans la région du golfe d'Annaba. L'objectif de ce travail consiste à étudier, en conditions de laboratoire, la réponse biochimique d'une espèce bioindicatrice de la pollution, à savoir, *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Donacidae) au Cd, en prenant en considération, la période du cycle sexuel (repos/reproduction) et le sexe. L'étude s'est déroulée en deux phases: une première phase d'exposition aiguë au Cd d'une durée de 96h, suivie d'une seconde phase de dépuraction d'une même durée afin d'évaluer la capacité de cette espèce à restaurer un statut normal.

Les échantillons ont été prélevés à El Battah, un site éloigné des sources de pollution, et élevés au laboratoire. Les paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH, la salinité et l'oxygène dissout ont été mesurés. Le Cd a été additionné à l'eau d'élevage à différentes concentrations (5, 7,6 et 10 mg). Les tests de toxicité ont permis d'estimer les concentrations sublétales (CL₁₀ et CL₂₅) et létales (CL₅₀ et CL₉₀) pendant 24, 48, 72 et 96h d'exposition. Le Cd entraîne une mortalité de l'espèce étudiée avec une relation dose-réponse; les femelles sont plus sensibles par rapport aux mâles.

Deux types de stratégies de défense au niveau cellulaire ont été étudiées après exposition aiguë aux concentrations sublétales du Cd, dans l'organe reproducteur de *D. trunculus*. L'une consiste à étudier la réponse de deux biomarqueurs les protéines carbonylées (PCs), dérivées issus de l'oxydation des protéines, et les métallothionéines (MTs), impliquées dans la détoxification des métaux. La seconde consiste à analyser quelques composants biochimiques des gonades: les réserves énergétiques (glucides, lipides, protéines), les acides nucléiques (l'acide ribonucléique; ARN, et l'acide désoxyribonucléique; ADN), ainsi que les acides gras de la famille des oméga-3 (l'acide eicosapentaénoïque; EPA et l'acide docosahexaénoïque; DHA). Nos résultats sont en faveur d'un effet globalement pro-oxydant, puisque l'exposition des bivalves au Cd à de faibles concentrations durant 4 jours entraîne l'induction des PCs et des MTs d'une part, et une diminution des réserves énergétiques, des acides nucléiques, ainsi que des oméga-3 d'autre part. Le Cd a généralement un effet concentration, plus marqué chez les femelles, notamment durant la période de reproduction. L'état physiologique est donc un facteur important pour déterminer le niveau de sensibilité au Cd chez les organismes aquatiques. De plus, *D. trunculus* a révélé un potentiel de restauration relativement important qui témoigne de l'efficacité de la phase de dépuraction pour réduire le stress subit après une contamination chimique.

Mots clés: *Donax trunculus*, Toxicité, Cadmium, Biomarqueurs, Composition biochimique, Acides gras, Acides nucléiques, Dépuraction, Sexe, Gonade.

6.2. Abstract

Cadmium (Cd) is a heavy metal that ranks seventh on the priority list of hazardous substances, and a major pollutant in the Gulf of Annaba. The aim of this work is to study, in laboratory conditions, the biochemical response of a bioindicator species of pollution, namely, *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Donacidae) to Cd, taking into consideration the reproductive period and gender. The study was carried out in two phases: a first one of acute exposure to the Cd during 96h, followed by a second phase of depuration (96h), which consists of assessing the recovery pattern of normal status.

The samples were collected at El Battah, a relatively clean sea shore, and reared in the laboratory. Physico-chemical parameters such as temperature, pH, salinity, and dissolved oxygen were measured. Cd was added to the rearing water at different concentrations (5, 7.6 and 10 mg). Toxicity tests were used to estimate sublethal (CL₁₀ and CL₂₅) and lethal concentrations (LC₅₀ and CL₉₀) for 24, 48, 72 and 96 hours of exposure. Cd causes mortality of the species studied with a dose-response relationship, and females seems to be sensitive to males.

Two kinds of resistance strategies were mainly studied after acute exposure to sub-lethal concentrations of Cd. One concerned the response of two biomarkers: proteins carbonyls (PCs) derived from the oxidation of proteins, and metallothioneins (MTs), involved in the detoxification of metals. A second study consisted to analyse some biochemical components of the gonads: energy reserves (carbohydrates, lipids, and proteins), nucleic acids (ribonucleic acid; RNA, and deoxyribonucleic acid; DNA), as well as omega-3 fatty acids (eicosapentaenoic acid, EPA and docosahexaenoic acid, DHA). Our results are in general in favor of pro-oxidant effects, since the exposure of bivalves to Cd at low concentrations during 4 days leads to induce induction PCs and MTs levels on the one hand, and a decrease in energy reserves, nucleic acids, and omega-3 fatty acids on the other hand. Cd has generally concentration effect, and is more pronounced in females, especially during the reproductive period. The physiological state is an important factor in determining the level of sensitivity to Cd in aquatic organisms. In addition, *D. trunculus* has revealed a relatively large recovery potential that demonstrates the effectiveness of the depuration phase to reduce the stress due to chemical contamination.

Keywords: *Donax trunculus*, Toxicity, Cadmium, Biomarkers, Biochemical composition, Fatty acids, Nucleic acids, Depuration, Gender, Gonad.

3.6. الملخص

الكادميوم معدن ثقيل، يحتل حاليا المكانة السابعة في قائمة المواد الخطيرة ذات الأولوية. كما تبين أنه ملوث رئيسي في خليج عنابة. يتمثل هذا العمل في دراسة الاستجابة البيوكيميائية لكائن حيوي مؤشر للتلوث، ثنائي القوقعة، رخوي (*Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Donacida) اتجاه الكادميوم و هذا في شروط مخبرية مع أخذ كل من جنس المؤشر و دورته الجنسية (الراحة/التكاثر) بعين الاعتبار. تمت هذه الدراسة على مرحلتين: مرحلة التعرض الحاد للكادميوم و التي دامت 96 سا. تليها مرحلة نقاهة دامت نفس المدة بهدف تقييم القدرة على ترميم الوضع الطبيعي.

تم أخذ العينات من شاطئ "البطاح" و المتميز بكونه بعيدا عن مصادر التلوث. ثم تمت التربية في شروط مخبرية. تم قياس المعلمات الفيزيائية والكيميائية كدرجة الحرارة ودرجة الحموضة والملوحة والأكسجين المذاب. أضيف الكادميوم الى ماء التربية بتركيزات مختلفة (5، 6، 7، و 10 ملغ). مكنتنا اختبارات السمية من تحديد التراكيز دون المميتة للكادميوم على هذا الرخوي الثنائي القوقعة من خلال تعيين التراكيز القاتلة لعشرة بالمائة من الأفراد (CL_{10}) و القاتلة لخمس و عشرون بالمائة من الأفراد (CL_{25})، ثم القاتلة لخمسون بالمائة من الأفراد (CL_{50}) و لتسعون بالمائة من الأفراد (CL_{90}) و هذا بعد 24، 48، 72 ثم 96 ساعة من التعرض. يؤدي الكادميوم الى إماتة الكائن المدروس مع علاقة تراكيذ- استجابة. تبين كذلك أن الإناث أكثر عرضة من الذكور.

بعد هذا، تمت دراسة نوعين من استراتيجيات الدفاع على المستوى الخلوي بعد التعرض الحاد لتراكيز دون مميتة من الكادميوم على الغدد التناسلية لـ *D. trunculus*. تتمثل الأولى في دراسة مؤشرين حيويين، البروتينات المضاف اليها الكربونيل (PCs) و الناجمة عن أكسدة البروتينات، و بروتين الميتالوثيونين (MTs) التي لها دور هام في ازالة سمية المعادن الثقيلة. و تتمثل الاستراتيجية الثانية في تحليل المكونات الكيميائية الحيوية الرئيسية، مثل مصادر الطاقة (السكريات و الدهون والبروتينات)، الأحماض النووية (الحمض النووي الريبوزي ARN و الحمض الريبوزي المنزوع الأوكسجين أو حمض الديوكسي ريبونوكليك ADN) و أخيرا عائلة الأحماض الدهنية أوميغا 3 (EPA) *eicosapentaénoïque* و *l'acide docosaénoïque* (DHA).

تشير النتائج الى تأثير يميل الى انتاج العوامل المؤكسدة بكمية أكبر، حيث أن تعرض ثنائيات القوقعة الى تراكيز دون قاتلة و لمدة أربعة أيام كانت السبب في زيادة انتاج PCs و MTs من جهة و انخفاض في مصادر الطاقة، الأحماض النووية، وأوميغا 3، من جهة أخرى. يؤدي الكادميوم إلى تأثير وفق التراكيز، يكون أكثر حدة عند الإناث لا سيما خلال فترة التكاثر. الحالة الفسيولوجية عامل مهم في تحديد مستوى الحساسية اتجاه الكادميوم لدى الكائنات المانية. أظهر ثنائي القوقعة *D. trunculus* قدرة تطهير عالية نسبيا تدل على فعالية مرحلة النقاهة للتخفيف من التوتر الناجم عن التلوث الكيميائي.

الكلمات المفتاحية: *Donax trunculus*، السمية، الكادميوم، المؤشرات الحيوية، المركبات الكيمياء الحيوية، الأحماض الدهنية، الأحماض النووية، النقاهة، الجنس، الغدد التناسلية.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abbott, W.B., 1925.** A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, **18**: 265-267.
- Abdul Aziz, K.K., 2012.** The health status and genetic variations of the bivalve, *Pinctala radiata* affected by environmental pollution. *Environ. Anal. Toxicol.*, **2(4)**: 138-145.
- Abdraba, A.M. & Saleuddin, A.S.M., 2000.** A putative hyperglycemic factor from the cerebral ganglia of *Otala lactea* (Mollusca: Pulmonata). *J. Comp. Physiol. B.*, **170**: 219-24.
- Achard-Joris, M., 2005.** Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant. Thèse de Doctorat en sciences du vivant, géosciences et sciences de l'environnement, Spécialité écotoxicologie, Université Bordeaux 1. 216 p.
- Acosta, V. & Lodeiros, C., 2001.** Evaluación del efecto del cobre sobre juveniles del mejillón verde *Perna viridis* mediante la concentración de ADN, y relación ARN/ADN en el músculo abductor. *Rev. Cienc. FCV-LUZ.*, **11(6)**: 485-490.
- Adriano, D.C., 1986.** Trace elements in the environment. *New York, Springer Verlag.* 155 pp.
- Aguirre-Martínez, G.V., DelValls, T.A. & Martín-Díaz, M.L., 2016.** General stress, detoxification pathways, neurotoxicity and genotoxicity evaluated in *Ruditapes philippinarum* exposed to human pharmaceuticals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **124**:18-31.
- Ahmed, M.K., Parvin, E., Arif, M., Akter, M.S., Khan, M.S. & Islam, M.M., 2010.** Measurements of genotoxic potential of cadmium in different tissues of fresh water climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch), using the comet assay. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **30(1)**:80-4.
- Alexander, R.R., Stanton, R.J. & Dodd, J.R., 1993.** Influence of sediment grain size on the burrowing of bivalves: correlation with distribution and stratigraphic persistence of selected neogene clams. *Palaios*, **8**: 289-303.
- Aly Salem, D.M.S., El Sikaily, A. & El Nemr, A., 2014.** Organochlorines and their risk in marine shellfish collected from the Mediterranean coast, Egypt. *Egypt. J. Aquat. Res.*, **40**: 93-101.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J. & Rainbow, P.S., 2006.** Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.*, **76**:160–202.

- Amira, A., Sifi, K., & Soltani, N., 2011.** Measure of environmental stress biomarkers in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria). *Euro. J. Exp. Biol.*, **1(2)**: 7-16.
- Anacleto, P., Maulvault, A.L., Bandarra, N.M., Repolho, T., Nunes, M.L., Rosa, R. & Marques, A., 2014.** Effect of warming on protein, glycogen and fatty acid content of native and invasive clams. *Food. Res. Int.*, **64**: 439-445.
- Anacleto, P., Maulvault, A.L., Nunes, M.L., Carvalho, M.L., Ruisa, R. & Marques, A., 2015.** Effects of depuration on metal levels and health status of bivalve mollusks. *Food Control*, **47**: 493-501.
- Andhale, A.V. & Zambare, S.P., 2011.** Effect of nickel induced biochemical alterations in fresh water bivalve, *Lammellidens marginalis*. *J. Ecobiotechnol.*, **3(11)**: 18-24.
- Andreu, V., Gimeno-García, E., Pascual, J.A., Vazquez-Roig, P. & Picó, Y., 2016.** Presence of pharmaceuticals and heavy metals in the waters of a Mediterranean coastal wetland: Potential interactions and the influence of the environment. *Sci. Total. Environ.*, **540**: 278-286.
- Andrýs, R., Zemanova, L., Lenčo, J., Bílková, Z. & Wsól, V., 2015.** Carbonyl-reducing enzymes as targets of a drug-immobilised affinity carrier. *Chem. Biol. Interact.*, **234(5)**: 169-177.
- Ansell, A.D. & Lagardère, F., 1980.** Observations on the biology of *Donax trunculus* and *D. vittatus* at Ile d'Oléron (French Atlantic Coast). *Mar. Biol.*, **57(4)**: 287-300.
- Ansell, A.D., Frenkiel, L. & Mouëza, M., 1980.** Seasonal changes in tissue weight and biochemical composition for the bivalve *Donax trunculus* L. on the Algerian Coast. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **45**: 105-116.
- ANSES., 2010.** Impact des pratiques en alimentation animale sur la composition en acides gras des produits animaux destinés à l'homme. Rapport d'expertise collective. Edition scientifique. 274 p.
- Anushia, C., Sampath kumar, P. & Selva Prabhu, A., 2012.** A pilot study on effect of copper and cadmium toxicity in *Tilapia Mossambicus*. *J. Res. Anim. Sci.*, **1**: 20-27.
- Aouadene, A., 2003.** Evaluation spatio-temporelle de quelques paramètres biométriques et biochimiques chez *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) dans un environnement pollué (golfe d'Annaba). Mémoire de Magister, Université d'Annaba. 88 p.
- Aru, V., Sarais, G., Savorani, F., Engelsens, SB. & Cesare Marincola, F., 2016.** Metabolic responses of clams, *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*, to short-term exposure to lead and zinc. *Mar. Pollut. Bull.*, **107(1)**: 292-299.

ATSDR., 2015. Priority list of hazardous substances, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia, USA. (<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>), URL <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>(accessed 6.15.15.).

B

Bacca, H., Huvet, A., Fabioux, C., Daniel, J.Y., Delaporte, M., Pouvreau, S., Van Wormhoudt, A. & Moal, J., 2005. Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **140B**: 635-646.

Baillon, L., 2015. Etude de l'impact des contaminants métalliques et organiques chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) et américaine (*Anguilla rostrata*) au moyen d'approches transcriptomiques. Thèse de Doctorat en géochimie et écotoxicologie, Université de Bordeaux. 240 p.

Banaoui, A., El Hamidi, F., Kaaya, A., Bouhaimi, A., Zekhnini, A. & Moukrim, A., 2015. Assessment of multimarker responses in *Perna perna*, *Mytilus galloprovincialis* and *Donax trunculus* bivalves exposed to malathion and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticides. *J. Mater. Environ. Sci.*, **6(6)**: 1678-1683.

Barnathan, G., 2009. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties. *Biochimie*, **91**: 671-678.

Barranger, A., 2015. Étude chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, des anomalies génomiques provoquées par l'exposition à des concentrations environnementales de diuron: caractérisation des atteintes, étude de leur héritabilité et conséquences pour la survie et la croissance des naissains. Thèse de Doctorat en écotoxicologie génétique, Université de Nante. 227 p.

Bayed, A., 1998. Variabilité de la croissance de *Donax trunculus* sur le littoral marocain. CIHEAM – Cahiers Options Méditerranéennes. 23 p.

Belabed, B.E., Laffray, X., Dhib, A., Fertouna-Belakhal, M., Turki, S. & Aleya, L., 2013. Factors contributing to heavy metal accumulation in sediments and in the intertidal mussel *Perna perna* in the Gulf of Annaba (Algeria). *Mar. Pollut. Bull.*, **74**: 477-489.

Belabed, S. & Soltani, N., 2013. Acute toxicity of cadmium on *Donax trunculus*: acetylcholinesterase, glutathione S-transferase activities and pattern of recovery. *Europ. J. Exp. Biol.*, **3(2)**:54-61.

Belabed, S., 2013. Toxicité aigüe du cadmium à l'égard de *Donax trunculus* en condition de laboratoire : paramètres de létalité, pharmacocinétique et mesure de biomarqueurs durant l'exposition et la restauration. Thèse de Doctorat 3ème cycle en biologie animale environnementale, option: Physio-toxicologie, Université d'Annaba. 115 p.

- Belabed, S. & Soltani, N., 2016.** Effects of cadmium concentrations on bioaccumulation and depuration in the marine bivalve *Donax trunculus*. In: Proceedings of the 2nd ICIEM 2016, International Conference on Integrated Environmental Management for Sustainable Development (Sousse, Tunisia, 27-30 October 2016), Volume 1: Environmentally Sustainable Innovative Approches and Methods Assessment. Edited by Boubakker Elleuch. pp. 246-256.
- Beldi, H., Gimbert, F., Maas, S., Scheiffler, R. & Soltani, N., 2006.** Seasonal variations of Cd, Cu, Pb and Zn in the edible mollusc *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from gulf of Annaba, Algeria. *Afric. J. Agric. Res.*, **1(4)**: 85-90.
- Beldi, H., 2007.** Etude de *Gambusia affinis* (Poisson, Téléostéen) et *Donax trunculus* (Mollusque, Pélécyopode): écologie, physiologie et impacts de quelques altéragènes. Thèse de Doctorat d'état en Sciences de la Mer, option : Biologie et écologie marines, Université d'Annaba. 105 p.
- Beninger, P.G., Le Pennec, G. & Le Pennec, M., 2003.** Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L. *Biol. Bull*, **205**: 83-92.
- Bensouda-Talbi, L. & Soltani-Mazouni, N., 2014.** Measure of oxidative stress and neurotoxicity biomarkers in *Donax trunculus* from the gulf of Annaba (Algeria): Case of the year 2012. *Ann. Rev. Res. Biol.*, **4(12)**: 1902-1914.
- Bensouda-Talbi, L., 2015.** Etude biochimique, enzymologique et cytologique chez *Donax trunculus*: rapport avec le cycle biologique et la pollution dans le golfe de Annaba. Thèse de Doctorat 3ème cycle, Université d'Annaba, Algérie. 138 p.
- Benradia, H., 2016.** Impact d'un inhibiteur de la synthèse de la chitine, le novaluron, sur le développement et la croissance d'un crustacé: *Palaemon adspersus*. Thèse de Doctorat 3ème cycle, Université d'Annaba, Algérie. 123 p.
- Berger, H., Végran, F., Chikh, M., Gilardi, F., Ladoire, S., Bugaut, H., Mignot, G., Chalmin, F., Bruchard, M., Derangère, V., Chevriaux, A., Rébé, C., Ryffel, B., Pot, C., Hichami, A., Desvergne, B., Ghiringhelli, F. & Apetoh, L., 2013.** SOCS3 transactivation by PPAR γ prevents IL-17-driven cancer growth. *Cancer. Res.*, **73(12)**: 3578-3590.
- Berthet, B., 2013.** Sentinel Species. In: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S. (Eds.), Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects., New York: CRC Press. 155-185 pp.
- Bertin, G. & Averbeck, D., 2006.** Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, **88**: 1549-1559.

- Bertrand, C., Devin, S., Mouneyra, C. & Giambérini, L., 2017.** Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater marine continuum on two euryhaline bivalves: *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*. *Ecol. Indic.*, **74**: 334-342.
- Bial, M., 1902.** Deutsche med. Wochenschr. 28-253 pp.
- Bielen, A., Bošnjak, I., Sepčić, K., Jaklič, M., Cvitanić, M., Lušić, J., Lajtner, J., Simčić, T. & Hudina, S., 2016.** Differences in tolerance to anthropogenic stress between invasive and native bivalves. *Sci. Total. Environ.*, **543**: 449-459.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J., 1959.** A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**: 911-917.
- Boening, D.W., 1999.** An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. *Environ. Monit. Assess.*, **55**: 459-470.
- Boussoufa, D., Ghazali, N., Viciano, E., Navarro, J.C. & El Cafsi, M., 2011.** Seasonal variation in condition and fatty acid composition of coquina clam, *Donax trunculus* (Linnaeus 1758) (Mollusca: Bivalvia) from the Tunisian coast. *Cah. Biol. Mar.*, **52(1)**:47-56.
- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 278-254.
- Bryan, S.E. & Hidalgo, H.A., 1976.** Nuclear cadmium: uptake and disappearance correlated with cadmium-binding protein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**: 858-865.
- Byrne, R.H., Kemp, L.R. & Cantrell, K.J., 1988.** The influence of temperature and pH on trace metal speciation in seawater. *Mar. Chem.*, **25**: 163-181.
- Budge, S.M. & Parrish, C.C., 1998.** Lipid biogeochemistry of plankton, settling matter and sediments in Trinity Bay, Newfoundland. II. Fatty acids. *Org. Geochem.*, **29**: 1547-1559.
- Burton, A., 1956.** Study of the condition and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. *Biochim.*, **62**: 315-323.

C

- Cai, F., Granci, V., Sorg, O., Buchegger, F., Pichard, C. & Dupertuis, Y.M., 2013.** Vitamin E content in fish oil emulsion does not prevent lipoperoxidative effects on human colorectal tumors. *Nutrition*, **29**: 450-456.
- Calown, P. & Sibly, R.M. 1990.** A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Funct. Ecol.*, **4**: 283-288.

- Cannino, G., Ferruggia, E., Luparello, C. & Rinaldi, A.M., 2009.** Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion*, **9**: 377-384.
- Cao, C. & Wang, W.X., 2017.** Copper-induced metabolic variation of oysters overwhelmed by salinity effects. *Chemosphere*, **174**: 331-341.
- Capó, X., Tejada, S., Box, A., Deudero, S. & Sureda, A., 2015.** Oxidative status assessment of the endemic bivalve *Pinna nobilis* affected by the oil spill from the sinking of the Don Pedro. *Mar. Environ. Res.*, **110**: 19-24.
- Chalabi, I., 2001.** Cycle de reproduction et composition biochimique de la palourde *Ruditapes decussatus* dans la baie d'Alger. *Rapp. Com. Int. Mer. Medit.*, **36**: 370 p.
- Chandurvelan, R., Marsden, I.D., Gaw, S. & Glover, C.N., 2012.** Impairment of green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) physiology by waterborne cadmium: Relationship to tissue bioaccumulation and effect of exposure duration. *Aquat. Toxicol.*, **124-125**: 114-124.
- Chandurvelan, R., Marsden, I.D., Gaw, S. & Glover, C.N., 2013.** Biochemical biomarker responses of green-lipped mussel, *Perna canaliculus*, to acute and subchronic waterborne cadmium toxicity. *Aquat. Toxicol.*, **140-141**: 303-313.
- Chandurvelan, R., Marsden, I.D., Glover, C.N. & Gaw, S., 2015.** Assessment of a mussel as a metal bioindicator of coastal contamination: relationships between metal bioaccumulation and multiple biomarker responses. *Sci. Total. Environ.*, **511**: 663-675.
- Chantler, P.D., 1983.** Biochemical and structural aspects of molluscan muscle. In: Wilbur, K.M. (Eds.), *The mollusca*, vols. 4. Physiology, Academic Press, London.
- Chelomin, V.P. & Belcheva, N.N., 1991.** Alterations of microsomal lipid-synthesis in gill cells of bivalve mollusk *Mizuhopecten yessoensis* in response to cadmium accumulation. *Comp. Biochem. Physiol C.*, **99**:1-5.
- Chelomin, V.P., Zakhartsev, M.V., Kurilenko, A.V. & Belcheva, N.N., 2005.** An in vitro study of the effect of reactive oxygen species on subcellular distribution of deposited cadmium in digestive gland of mussel *Crenomytilus grayanus*. *Aquat. Toxicol.*, **73(2)**: 181-189.
- Chen, X., Li, H., Zhang, J., Ding, Y. & You, J., 2016.** Does cadmium affect the toxicokinetics of permethrin in *Chironomus dilutus* at sublethal level? Evidence of enzymatic activity and gene expression. *Environ. Pollut.*, **218**: 1005-1013.
- Chícharo, M.A. & Chícharo, L. 2008.** RNA: DNA Ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology. *Int. J. Mol. Sci.*, **9**:1453-1471.

- Chiffolleau, J.F., Gonzalez, J.L., Miramand, P. & Thouvenin, B., 1999.** Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire. Programme Scientifique Seine-Aval (France). 31 p.
- Chiffolleau, J.F., Claisse, D., Cossa, D., Ficht, A., Ganzalez, J.L., Guyot, T., Michel, P., Miramand, P., Oger, C. & Petit, F., 2001.** La contamination métallique, Ifremer. 39 p.
- Chiodi Boudet, L.N., Polizzi, P., Romero, M.B, Robles, A. & Gerpe, M.S, 2013.** Lethal and sublethal effects of cadmium in the white shrimp *Palaemonetes argentinus*: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **89**: 52-58.
- Chiodi Boudet, L.N., Polizzi, P., Romero, M.B, Robles, A., Marcovecchio, J.E. & Gerpe, M.S, 2015.** Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium in white shrimp, *Palaemonetes argentine*s. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **113**: 231-240.
- Choi, J.Y., Yang, D.B., Hong, G.H. & Shin, K.H., 2014.** Distribution and bioaccumulation of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides residues in sediments and Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) from along the Mid-Western coast of Korea. *Mar. Pollut. Bull.*, **85**: 672-678.
- Çolakoglu, F.A., Çardak, M., Çolakoglu, S. & Künili, I.E., 2014.** Depuration Times of *Donax trunculus* and *Tapes decussatus*. *Braz. J. Microbiol.* **45(3)**: 1017-1022.
- Company, R., Serafim, A., Cosson, R.P., Fiala-Médioni, A., Camus, L., Serrão-Santos, R. & João Bebianno, M., 2010.** Sub-lethal effects of cadmium on the antioxidant defence system of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **73(5)**: 788-95.
- Cossa, D. & Lassus, P., 1989.** Le cadmium en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie, Editions Ifremer, Plouzané, France. **16**: 111.

D

- Dagnelie, P., 1998.** Statistique théorique et appliqué: Inférence statistique à une et à deux dimensions. De Boeck & Larcier. Paris, Bruxelles. 181-186 pp.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R., 2003.** Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.*, **329**: 23-38.
- Dame, R.F., 1996.** Bivalves as components of ecosystem health. In: Dame, R.F. (Ed.), *The Ecology of Marine Bivalves. An Ecosystem Approach*. CRC Marine Science Series, CRC Press, Boca Raton, FL. 283 pp.

- Daviglius, M., Sheeshka, J. & Murkin, E., 2002.** Health benefits from eating fish. *Comment. Toxicol.*, **8**: 345-374.
- De Camargo Talon, L., de Oliveira, E.P., Moreto, F., Portero-McLellan, K.C. & Burini, R.C., 2015.** Omega-3 fatty acids supplementation decreases metabolic syndrome prevalence after lifestyle modification program. *J. Funct. Foods.*, **19**: 922-928.
- Degiovanni, C. & Mouëza, M., 1972.** Contribution a l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque, Lamellibranche), dans l'Algérois: écologie en Baie de Bou-Ismaïl. *Tethys*, **4(3)**: 729-744.
- Dekker, M., 2015.** Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Annu. Res. Rev. Biol.*, **4(12)**: 1902-1914.
- De la Huz, R., Lastra, M. & Lopez, J., 2002.** The influence of sediment grain size on burrowing, growth and metabolism of *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Donacidae). *J. Sea. Res.*, **47**: 85-95.
- Delaporte, M., 2005.** Modulation des paramètres hématologiques par la nutrition de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les mortalités estivales. Thèse de Doctorat. Université de Rennes 1. 365p.
- Deshmukh, R. & Lomte, A., 1998.** Effect of heavy metal (CuSO₄) on protein activity of fresh water bivalve, *Parrysia corrugata*. *J. Ecotox. Monit.*, **16(3)**: 704-708.
- De Souza Machado, A.A., Spencer, K., Kloas, W., Toffolon, M. & Zarfl, C., 2016.** Metal fate and effects in estuaries: A review and conceptual model for better understanding of toxicity. *Sci. Total. Environ.*, **541**: 268-281.
- Deval, M.C., 2009.** Growth and reproduction of the wedge clam (*Donax trunculus*) in the Sea of Marmara, Turkey. *J. Appl. Ichthyol.*, **25(5)**: 551-558.
- Devi, VU., 1996.** Changes in oxygen consumption and biochemical composition of the marine fouling dreissenid bivalve *Mytilopsis sallei* (Recluz) exposed to mercury. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **33(2)**: 168-174.
- Dewes, L.J., Sandrine, J.Z., Monserrat, J.M. & Yunes, J.S., 2006.** Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapod, Brachyura). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **65**: 201-208.
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R. & Santore, R.C., 2001.** Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 2383-2396.
- do Nascimento, L.F., da Silveira, L.C., Nisembaum, L.G., Colquhoun, A., Abe, AS., Mandarim-de-Lacerda, C.A. & de Souza, S.C., 2016.** Morphological and metabolic adjustments in the small intestine to energy demands of growth,

storage, and fasting in the first annual cycle of a hibernating lizard (*Tupinambis merianae*). *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.*, **195**:55-64.

Dowhan, W., Bogdanov, M. & Mileykovskaya, E., 2008. Functional roles of lipids in membranes. In: Vance, D.E., Vance, J.E. (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier. Amsterdam. 1-36 pp.

Dridi, S., Romdhane, M.S. & El cfsi, M., 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture.*, **263**: 238-248.

Driessnack, M.K., Jamwal, A. & Niyogi, S., 2017. Effects of chronic water borne cadmium and zinc interactions on tissue specific metal accumulation and reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **140**: 65-75.

Drifi, F. & Abdennour, C., 2010. Trace Metals in the mussel *Donax trunculus* Linnaeus 1758 from urban and industrial contaminated locations. *J. Appl. Sci. Res.*, **6(12)**: 2063-2067.

Drudi, L.M., Schaller, M.S., Hiramoto, J., Gasper, W., Harris, W.S., Hills, N.K. & Grenon, S.M., 2017. Predictors of change in omega-3 index with fish oil supplementation in peripheral artery disease. *J. Surg. Res.*, **210**: 124-131.

Duchateau, G. & Florkin, M., 1959. For trehalosemie of insects and its signification. *Arch. Insect. Physiol. Biochem.*, **67**: 306-314.

Duinker, A., Torstensen, B.E. & Lie, O., 2004. Lipid classes and fatty acid composition in female gonads of great scallops. A selective field study. *J. Shellfish. Res.*, **23**: 507-514.

Durkalec, M., Kolenda, R., Owczarek, T., Szkoda, J., Nawrocka, A., Grzegorzólka, J., Dzięgiel, P., Socha, P., Kołacz, R., Schierack, P., Żmudzki, J. & Posyniak, A., 2017. Expression of metallothionein in the liver and kidneys of the red deer (*Cervus elaphus L.*) from an industrial metal smelting area of Poland. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **137**:121-129.

Dutta, M., Rajak, P., Khatun, S. & Roy, S., 2017. Toxicity assessment of sodium fluoride in *Drosophila melanogaster* after chronic sub-lethal exposure. *Chemosphere.*, **166**:255-266.

E

Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**: 214-226.

- El Nemr, A. & El-Sadaawy, M.M., 2016.** Polychlorinated biphenyl and organochlorine pesticide residues in surface sediments from the Mediterranean Sea (Egypt). *Int. J. Sediment. Res.*, **31**: 44-52.
- El Shenawy, N.S. 2002.** The effects of metal bioaccumulation on glutathione and lipid peroxidation as biomarkers of aquatic ecosystem pollution of *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra* from Lake Timsah, Ismailia). *Egypt. J. Zool.*, **39**: 475-492.
- El Shenawy, N.S., 2004.** Heavy metal and microbial depuration of the Clam *Ruditapes decussatus* and its effect on bivalve behavior and physiology. *Environ. Toxicol.*, **19(2)**:143-53.
- Evariste, L., Rioult, D., Brousseau, P., Geffard, A., David, E., Auffret, M., Fournier, M. & Betoulle, S., 2017.** Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **137**:78-85.
- Evtusjenko, Z.S., Lukyanava, O.N. & Khristoforova, N.K., 1984.** Biochemical changes in selected body tissues of the scallop *Patinopecten venoensis* under long term exposure to low Cd concentrations. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **20**:165-170.

F

- Fabisiak, J.P., Pearce. L.L., Borisenko. G., Tyurina. Y., Tyurin. V.A., Razzak. J., Lazo. J.S., Pitt. B.R. & Kagan. V.E., 1999.** Bifunctional anti/prooxidant potential of metallothionein: redox signaling of copper binding and release. *Antiox. Redox. Sign.*, **1**: 349-364.
- Falfushynska, H., Gnatyshyna, L., Yurchak, I., Stoliar, O. & Sokolova, I.M., 2016.** Interpopulational variability of molecular responses to ionizing radiation in freshwater bivalves *Anodonta anatina* (Unionidae). *Sci. Total. Environ.*, **568**: 444-456.
- Fang, J.M., Slecicka, B.G. & Sohar, I., 1999.** Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **31**: 751-757.
- Fassett, D.W., 1975.** Cadmium: biological effects and occurrence in the environment. *Annu. Rev. Pharmacol.*, **15**: 425-35.
- Faubel, D., Lopes-Lima, M., Freitas, S., Pereira, L., Andrade, J., Checa, A., Frank, H., Matsuda, T. & Machado, J., 2008.** Effects of Cd²⁺ on the calcium metabolism and shell mineralization of bivalve *Anodonta cygnea*. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.*, **41(2)**: 93-108.
- Fernández-Iglesias, A., Quesada, H., Díaz, S., Pajuelo, D., Bladé, C., Arola L., Salvadó, M.J. & Mulero, M., 2014.** Combination of grape seed proanthocyanidin extract and docosahexaenoic acid-rich oil increases the

hepatic detoxification by GST mediated GSH conjugation in a lipidic postprandial state. *Food. Chem.*, **165**: 14-20.

Ferron, A. & Leggett, W., 1994. An appraisal of condition measures for marine fish larvae. *Adv. Mar. Biol.*, **30**: 217-303.

Filimonova, V., Gonçalves, F., Marques, J.C., De Troch, M. & Gonçalves, A.M. M., 2016. Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: A review. *Ecol. Indic.*, **67**: 657-672.

Finney, D.J., 1971. Probit analysis (3 rd edn). Cambridge University Press, London.

Fischer, W., Bauchot, M. & Schneider, M., 1987. Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Volume II. Vertébrés. Rome, FAO., **1**: 760.

Fisher, R.A. & Yates, F., 1957. Statical tables for biological agricultural and medical research. 5^{me} edition, Olivier et Boyd. London. 64-66 pp.

Fleischer, M.C. 1974. Environmental impact of cadmium: a review by the panel on hazardous trace substances. *Environ. Health. Perspect.*, **7**: 253-323.

Fokina, N.N., Ruokolainen, T.R., Nemova, N.N. & Bakhmet, I.N., 2013. Changes of blue mussels *Mytilus edulis* L. lipid composition under cadmium and copper toxic effect. *Biol. Trace. Elem. Res.*, **154**: 217-225.

Foleya, C.J., Bradley, D. L. & Höök, T.O., 2016. A review and assessment of the potential use of RNA: DNA ratios to assess the condition of entrained fish larvae. *Ecol. Indic.*, **60**: 346-357.

Forrest, G.L. & Gonzalez, B. 2000. Carbonyl reductase. *Chem. Biol. Interact.*, **129**: 21-40.

Freitas, R., Ramos Pinto, L., Sampaio, M., Costa, A., Silva, M., Rodrigues, A.M., Quintino, V. & Figueira, E., 2012. Effects of depuration on the element concentration in bivalves: Comparison between sympatric *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.*, **110**: 43-53.

Freites, L., García, N., Troccoli, L., Maeda-Martínez, A.N., Fernández-Reiriz, M.J., 2010. Influence of environmental variables and reproduction on the gonadal fatty acid profile of tropical scallop *Nodipecten nodosus*. *Comp. Biochem. Physiol B. Biochem. Mol. Biol.*, **4**: 408-14.

G

Gaspar, M.B., Ferreira, R. & Monteiro, C.C., 1999. Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Mollusca: Bivalvia) of Faro, southern Portugal. *Fish. Res.*, **41**: 309-316.

- Gaspar, M.B., Chicharo, L.M., Vasconcelos, P., Garcia, A., Santos, A.R. & Monteiro, C.C., 2002.** Depth segregation phenomenon in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) population of the Algarve coasts (Southern Portugal). *Sci. Mar.*, **66(2)**: 111-121.
- Gautier-Clerc, S., Pellerin, J., Blaise, C. & Gagné, F., 2002.** Delayed gametogenesis of (*Mya arenaria*) in the Saguenay Fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **131C**: 457-467.
- Gebel, T., Maser, E. & Netter, K., 1991.** The occurrence of carbonyl reduction in continuous cell lines emphasizes the essentiality of this, metabolic pathway. *FEBS Letters.*, **282(2)**: 359-362.
- Geng, N., Wang, C., Wang, P., Qi, N. & Ren, L., 2015.** Cadmium accumulation and metallothionein response in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* under hydrodynamic conditions. *Biol. Trace. Elem. Res.*, **165(2)**: 222-32.
- Géret, F., Jouan, A., Turpin, V., Bebianno, M.J. & Cosson R.P., 2002.** Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living. Resour.*, **15**: 61-66.
- Girardello, F., Custódio Leite, C., Vianna Villela, I., da Silva Machado, M. Luiz Mendes Juchem, A., Roesch-Ely, M., Neves Fernandes, A., Salvador, M. & Antonio Pêgas Henriques, J., 2016.** Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Aquat. Toxicol.*, **170**: 223-228.
- Gismondi, E., Cossu-Leguille, C., Beisel, J.N., 2012.** Acanthocephalan parasites: help or burden in gammarid amphipods exposed to cadmium? *Ecotoxicology*, **21**: 1188-1193.
- Gofas, S., 2017.** *Donax trunculus* Linnaeus, 1758. Accessed through: World Register of Marine Species at <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=139602>.
- Goldsworthy, G.J., Mordue, W. & Guthkelch, J., 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **18(3)**: 545-551.
- Gomiero, A., Volpato, E., Nasci, C., Perra, G., Viarengo, A., Dagnino, A., Spagnolo, A. & Fabi, G., 2015.** Use of multiple cell and tissue-level biomarkers in mussels collected along two gas fields in the northern Adriatic Sea as a tool for long term environmental monitoring. *Mar. Pollut. Bull.*, **93**: 228-244.
- Gonzalez, J.L., Chiffoleau, J.F., Miramand, P. & Thouvenin, B., 1999.** Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire, Programme scientifique Seine Aval, Editions Ifremer, Plouzané, France. p 31.

- Gonçalves, S.F., Davies, S.K., Bennett, M., Raab, A., Feldmann, J., Kille, P., Loureiro, S., Spurgeon, D.J. & Bundy, J.G., 2016.** Sub-lethal cadmium exposure increases phytochelatin concentrations in the aquatic snail *Lymnaea stagnalis*. *Sci. Total. Environ.*, **568**: 1054-1058.
- Gotelli, N.J., Ellison, A.M. & Ballif, A., 2012.** Environmental proteomics, biodiversity statistics and food-web structure. *Trends. Ecol. Evol.* **1522**: 1-7.
- Gould, E., Thompson, R.J., Buckley, L.J., Rusanowsky, D. & Sennefelder, G.R., 1988.** Uptake and effects of copper and cadmium in the gonad of the scallop *Placopecten magellanicus*: concurrent metal exposure. *Mar. Biol.*, **97**: 217-223.
- Gouletquer, P., 1997.** Natural reproduction cycle of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. La reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France. IFREMER, Nantes.
- Grimes, S., Ruellet, T., Dauvin, J.D. & Boutiba, Z., 2010.** Ecological quality status of the soft-bottom communities on the Algerian coast: general patterns and diagnosis. *Mar. Pollut. Bull.*, **60**: 1969-1977.
- Guerreño, M., López Armengol, M.F., Luquet, C.M. & Venturino, A., 2016.** Comparative study of toxicity and biochemical responses induced by sublethal levels of the pesticide azinphosmethyl in two fish species from North-Patagonia, Argentina. *Aquat. Toxicol.*, **177**: 365-372.
- Guillou, J. & Bayed, A., 1991.** Contraintes du milieu sur les populations de *Donax trunculus* L. et *Donax venustus* Poli du littoral atlantique marocain. *Oceanol. Acta.*, **14** (3): 291-298.
- Guo, R., Pan, L., Lin, P. & Zheng, L., 2017.** The detoxification responses, damage effects and bioaccumulation in the scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of benzo[a]pyrene and chrysene. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, **191**: 36-51.

H

- Hafsaoui, I., Bouaziz, R., Draredja, B. & Beldi, H., 2016.** Reproduction cycle of *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) in the gulf of Annaba (Northeast Algeria). *Adv. Environ. Biol.*, **10**(5): 82-95.
- Hafsaoui, I., 2017.** La reproduction chez un mollusque bivalve *Donax trunculus* L. dans le golfe d'Annaba. Rapport entre les aspects cytologiques et biochimiques et la pollution. Thèse de doctorat, option: Biologie Animale. Université d'Annaba. 365 p.
- Hamdani, A., 2007.** Caractérisation biochimique des populations de *Donax trunculus* vivant dans deux sites du golfe d'Annaba: analyse quantitative des acides nucléiques et qualitative et quantitative des protéines. Mémoire de magistère, option: Protection de l'environnement, Université d'Annaba. 76 p.

- Hamdani, A., 2013.** La reproduction chez un mollusque bivalve *Donax trunculus* L. dans le golfe d'Annaba. Rapport entre les aspects cytologiques et biochimiques et la pollution. Thèse de doctorat, option: Biologie Animale, Université d'Annaba. 365 p.
- Hamdani, A. & Soltani-Mazouni, N., 2011.** Changes in biochemical composition of the gonads of *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria) in relation to reproductive events and pollution. *J. J. Biol. Sci.*, **4 (3)**: 149-156.
- Hamdani, A., Soltani-Mazouni, N. & Soltani, N. 2014.** Quantitative and qualitative analysis of proteins in gonads of *Donax trunculus* from the Annaba Bay: Effects of site, season and sex. *Adv. Environ. Biol.*, **8(13)**: 740-749.
- Hamdoun, A. & Epel, D., 2007.** Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104(6)**: 1745-1750.
- Hamza-Chaffai, A., 2014.** Usefulness of bioindicators and biomarkers in pollution biomonitoring. *Int. J. Biotech. Well. Indus.*, **3**: 19-26.
- Hamza-Chaffai, A., Amiard, J.C. & Cosson, R.P., 1999.** Relation ship between metallothionein and metals in a natural population of the clam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast: a non linear model using Box-Cox transformation. *Com. Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.*, **123C**: 153-163.
- Hauser-Davis, R.A., Bastos, F.F., Dantas, R.F., Tobar, S.A.L., da Cunha Bastos Neto, J., da Cunha Bastos, V.L.F., Ziolli, R.L. & Arruda, M.A.Z., 2014.** Behaviour of the oxidant scavenger metallothionein in hypoxia-induced neotropical fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **103**: 24-28.
- He, Z.L., Yang, X.E. & Stoffella, P.J., 2005.** Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace. Elem. Med. Biol.*, **19**: 125-40.
- Hendriks, I.E., 2004.** Flow dependent processes in settlement of intertidal bivalve larvae s.n. Doctor of Philosophy, University of Groningen. 160 p.
- Hiatt, V.H. & Huff, J.E., 1975.** The environmental impact of cadmium: an overview. *Int. J. Environ.*, **7**: 277-285.
- Hofmann, G.E. & Somero, G.N., 1995.** Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *J. Exp. Biol.*, **198**: 1509-1518.
- Hofmann, G.E. & Somero, G.N., 1996.** Protein ubiquitination and stress protein synthesis in *Mytilus trossulus* occurs during recovery from tidal emersion. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, **5**: 175-184.
- Hsu, T., Tsai, H.T., Huang, K.M., Luan, M.C. & Hsieh, C.R., 2010.** Sublethal levels of cadmium down-regulate the gene expression of DNA mismatch

recognition protein MutS homolog 6 (MSH6) in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere.*, **81(6)**: 748-754.

Husmann, G., Abele, D., Monien, D., Monien, P., Kriews, M. & Philipp, E. 2012. The influence of sedimentation on metal accumulation and cellular oxidative stress markers in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Estuar. Coast. Shelf. S.*, **11**: 48-59.

J

IARC., 1993. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. In: International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans. *Scientific Publications, Lyon*, **58**: 119-237.

Iavicoli, I., Fontana, L. & Bergamaschi, A., 2009. The effects of metals as endocrine disruptors. *J. Environ. Sci. Health B.*, **12**: 206-223.

Idayachandiran, G., Muthukumar, A., Kumaresan, S. & Balasubramanian. T., 2014. Nutritional value of marine bivalve, *Donax cuneatus* (Linnaeus, 1758) from Cuddalore coastal waters, Southeast coast of India. *Inventi Impact: Life Style*, **1**:15-19.

Issani, G. & Carpené, E., 2014. Metallothioneins, unconventional proteins from unconventional animals: A long journey from nematodes to mammals. *Biomolecules.*, **4**: 435-457.

Isani, G., Andreani, G., Kindt, M. & Carpené, E., 2000. Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cell. Mol. Biol.*, **46(2)**: 311-330.

Ito, M., Ito, K., Ohta, K., Hano, T., Onduka, T. & Mochida, K., 2016. Transcription of a novel P450 gene varies with some factors (pollutant exposure, temperature, time, and body region) in a marine oligochaete (*Thalassodrilides sp.*). *Mar. Pollut. Bull.*, **109**: 344-349.

Ivanina, A.V. & Sokolova, I.M., 2015. Interactive effects of metal pollution and ocean acidification on physiology of marine organisms. *Curr. Zool.*, **61 (4)**: 653-668.

Ivanina, A.I., Taylor, C. & Sokolova, I.M., 2009. Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquat. Toxicol.*, **91**: 245-254.

J

Jarup, L., 2002. Cadmium overload and toxicity. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **17** Suppl 2; 35-9.

- Jarup, L., 2003.** Hazards of heavy metal contamination. *Brit. Med. Bull.*, **68**: 167-82.
- Jenny, M.J., Ringwood, A.H., Schey, K., Warr, G.W. & Chapman, R.W., 2004.** Diversity of metallothioneins in the American oyster, *Crassostrea virginica*, revealed by transcriptomic and proteomic approaches. *Eur. J. Biochem.*, **271(9)**: 1702-1712.
- Ji, C., Wu, H., Zhou, M. & Zhao, J., 2015.** Multiple biomarkers of biological effects induced by cadmium in clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish. Shellfish. Immunol.*, **44(2)**: 430-435.
- Joachim, S., Maria, H.T., Britt, W. & Bethanie, C.A., 2017.** Determining oxidative stress and EROD activity in dab (*Limanda limanda*) in the North and Baltic Seas. *Mar. Environ. Res.*, **124**: 46-53.
- Joseph, A., 2017.** Chapter 9 – Oceans: Abode of Nutraceuticals, Pharmaceuticals, and Biotoxins. Investigating Seafloors and Oceans, From Mud Volcanoes to Giant Squid. 493-554 p.

K

- Kadiene, E., Bialais, C., Ouddane, B., Souissi, S. & Hwang, J.S., 2016.** Difference in response between male and female calanoid copepod (*Eurytemora affinis*, Seine) to cadmium toxicity. In: Conference Hand book of ASEAN fisheries and aquaculture conference and exposition 2016 “ASEAN seafood for the world”, and 11th Asian fisheries and aquaculture forum “Asian food security for the world”, 04 – 03-07 August 2016, Bangkok– Thailand. 112-113 pp.
- Kang, S.G., Choi, K.S., Bulgakov, A.A., Kim, Y. & Kim, S.Y., 2003.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used in quantification of reproductive output in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Korea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **282**: 1-21.
- Karray, S., 2015.** Etude écotoxicologique et phylogéographique de la coque *Cerastoderma glaucum* issue du golfe de Gabès. Réponse adaptative (in situ et in vivo) au stress métallique et structure génétique. Thèse en Doctorat en Sciences Biologique, Université de Sfax et université du Maine. 173 p.
- Kawade, S. & Khillare, Y., 2014.** Impact of cadmium on the biochemical contents in certain tissues of freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *World. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **4(1)**: 1430-1441.
- Keller, A.E., 1991.** The acute toxicity of selected metals to the freshwater mussel, *Anodonta imbecilis*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **10**: 539-546.
- Ketata, I., Smaoui-Damak, W., Guermazi, F., Rebai, T. & Hamza-Chaffai, A., 2007.** In situ endocrine disrupting effects of cadmium on the reproduction of *Ruditapes decussates*. *Comp. Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.*, **146(3)**:415-430.

- Khammar, H., 2007.** Caractères chimiques des effluents urbains introduits au littoral d'Annaba. Mémoire de Magister, Université d'Annaba. 49 p.
- Khati Amira, A., 2014.** Utilisation de *Donax trunculus* pour l'évaluation de l'état de santé du golfe d'Annaba et impact de la pollution métallique. Thèse de doctorat en Biologie Animale, Université d'Annaba. 219 p.
- Khati Hadj Moussa, W., 2009.** Etude de la qualité des eaux du golfe d'Annaba par l'utilisation d'un mollusque sentinelle, la moule (*Perna perna* L): essai in vivo et in situ. Application à la biosurveillance de l'environnement marin. Thèse de doctorat en sciences de la mer, Université d'Annaba. 138 p.
- Khelifi-Touhami, M., Ounissi, M., Saker, I., Haridi, A., Djorfi, S. & Abdennour, C., 2006.** The hydrology of the Mafrag estuary (Algeria): transport of inorganic nitrogen and phosphorus to the adjacent coast. *J. Food. Agric. Environ.*, **4**: 340-346.
- Kimbrough, K.L., Johanson, W.E., Lauenstein, G.G., Christensen, J.D. & Apeti, D.A., 2008.** An assessment of two decades of contaminant monitoring in the Nation's Coastal Zone. Silver Spring, MD. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 74. 105 pp.
- Kodavanti, P.R. & Loganathan, B.G., 2017.** Organohalogen pollutants and human health reference. Module in biomedical sciences, International Encyclopedia of Public Health (Second Edition), 359-366.
- Kooijman, S.A.L.M., 2000.** Dynamic energy and mass budgets in biological systems. Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge, Royaume Uni. 424 p.
- Kopp, J., Cornette, F. & Simonne, C., 2005.** A comparison of growth and biochemical composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.) and *Mytilus edulis* (L.) in the West coast of Contentin, Normandy, France 1999–2000. *Aquac. Int.*, **13**(4): 327-340.
- Koutsogiannaki, S., Franzellitti, S., Kalogiannis, S., Fabbri, E., Dimitriadis, V. K. & Kaloyianni, M., 2015.** Effects of cadmium and 17 β -estradiol on *Mytilus galloprovincialis* redox status. Prooxidant-antioxidant balance (PAB) as a novel approach in biomonitoring of marine environments. *Mar. Environ. Res.*, **103**: 80-88.

L

- Ladhar-Chaouani, R., Machreki-Ajmi, M. & Hamza Chaffai, A., 2008.** Spatial distribution of cadmium and some biomarkers in *Cerastoderrna glaucum* living in a polluted area. *Mar. Biol. Res.*, **00**: 0-00.
- Lacroix, C., Richard, G., Segueineau, 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). *Aquat. Toxicol.*, **162**: 126-137.

Laflamme, S., Côté, C., Gagnaire, P.A., Castonguay, M. & Bernatchez, L., 2012. RNA/DNA ratios in American glass eels (*Anguilla rostrata*): evidence for latitudinal variation in physiological status and constraints to oceanic migration? *Ecol. Evol.*, **2(5)**: 875-884.

Lafont, R. & Mathieu, M., 2007. Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology*, **16**: 109-130.

Langston, W.J., Bebianno, M.J. & Burt, G.R., 1998. Metal Handling strategies in molluscs. In: Langston, W.J., Bebianno, M.J. (Eds.), *Metal metabolism in aquatic environments*, chap. 8. Chapman Hall, London. 219-284 pp.

Larba, R. & Soltani, N. 2014. Use of the land snail *Helix aspersa* for monitoring heavy metal soil contamination in Northeast Algeria. *Environ. Monit. Assess.*, **186(8)**: 4987-4995.

Lastra, M., Dugan, J.E. & Hubbard, D.M., 2002. Burrowing and swash behavior of the pacific mole crab, *Hippa pacifica* (Anomura, Hippidae) in tropical sandy beaches. *J. Crust. Biol.*, **22**: 53-58.

La Valle, P., 2005. *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) as a biological indicator of coastal dynamic and sedimentary balance. Thèse de doctorat. Spécialité: Sciences écologiques, Université de Rome. 232 p.

La Valle, P., Nicoletti, L., Finoia, M.G. & Ardizzone, G.D., 2011. *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) as a potential biological indicator of grain-size variations in beach sediment. *Ecol. Indic.*, **11**: 1426-1436.

Lavradas, R.T., Rocha, R.C., Bordon, I.C., Saint'Pierre, T.D., Godoy, J.M. & Hauser-Davis, R.A., 2016. Differential metallothionein, reduced glutathione and metal levels in *Perna perna* mussels in two environmentally impacted tropical bays in south eastern Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **129**: 75-84.

Le Gal, Y.L., Lagadic, L., Le Bras, S. & Caquet, T., 1997. Charges énergétiques en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*. Masson (Eds.). Paris: 1-9.

Le, T.T., Zimmermann, S. & Sures, B., 2016. How does the metallothionein induction in bivalves meet the criteria for biomarkers of metal exposure? *Environ. Pollut.*, **212**: 257-268.

Lee, R., Lovatelli, K. & Ababouch, A., 2010. Purification des coquillages bivalves: aspects fondamentaux et pratiques, FAO document technique du les pêche 511. ISBN: 978-92-5-206006-2. pp 155.

Lemoine, S., Bigot, Y., Sellos, D., Cosson, R.P. & Lauhier, M., 2000. Metallothionein isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia):

- complementary DNA characterization and quantification of expression in different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper. *Mar. Biotechnol.*, **2**: 195-203.
- Levine, R.L., 1994.** Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods. Enzymol.*, **186**: 346-357.
- Levine, R.L., Garland, D., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S. & Stadtman, E.R., 1990.** Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods. Enzymol.*, **186**: 464-478.
- Li, X., Peng, W., Jiang, Y., Duan, Y., Ren, J., Liu, Y. & Fan, W., 2017.** The *Daphnia magna* role to predict the cadmium toxicity of sediment: Bioaccumulation and biomarker response. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **138**: 206-214.
- Li, Y., Yang, H., Na, L., Jixian, L., Qian, W. & Lan, W., 2015.** Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in cadmium-treated freshwater mussel *Anodonta woodiana*. *PLoS One.*, 10(2): e0117037. doi:10.1371/journal.pone.0117037.
- Liu, Z., Lv, W., Huang, Y., Fan, B., Li, Y. & Zhao, Y., 2016.** Effects of cadmium on lipid metabolism in female estuarine crab, *Chiromantes dehaani*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, **188**: 9-16.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore. & D, Darnell, J., 2000.** *Molecular Cell Biology, 4th edition.* W. H. Freeman, New York.
- López, A., Yusà, V., Muñoz, A., Vera, T., Borràs, E., Ródenas, M. & Coscollà, C., 2017.** Risk assessment of airborne pesticides in a Mediterranean region of Spain. *Sci. Total. Environ.*, **574**: 724-734.
- Louzán Pérez, A., 2015.** Desarrollo del cultivo integral de la coquina *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758). Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural. Especialidad de la biología, Université Santiago De compostela. 254 p.
- Love, R.M., 1980.** The chemical biology of Fishes. New York, Academic Press, 2, 547 p.
- Lubet, P., 1959.** Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilides et les Pectinides (Mollusques, Bivalves). *Rev. Trav. Inst. Pêches. Marit.*, **23**: 389-545.
- Lüchmann, K.H., Dafre, A.L., Trevisan, R., Craft, J.A., Meng, X., Mattos, J.J., Zacchi, F.L., Dorrington, T.S., Schroeder, D.C. & Bainy, A.C.D., 2014.** A light in the darkness: new biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. *Aquat. Toxicol.*, **152**: 324-334.

Luo, L., Zhang, Q., Kong, X., Huang, H. & Ke, C., 2017. Differential effects of bisphenol A toxicity on oyster (*Crassostrea angulata*) gonads as revealed by label-free quantitative proteomics. *Chemosphere*, **176**: 305-314.

M

Machreki-Ajmi, M., Ketata, I., Ladhar-Chaabouni, R. & Hamza-Chaffai, A., 2008. The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers in *Cerastoderma glaucum*. *Ecotoxicology*, **17**: 1-11.

Magni, S., Parolini, M., Della Torre, C., de Oliveira, L.F., Catani, M., Guzzinati R., Cavazzini, A. & Binelli, A., 2017. Multi-biomarker investigation to assess toxicity induced by two antidepressants on *Dreissena polymorpha*. *Sci. Total Environ.*, **578**: 452-459.

Maharajan, A., Rajalakshmi, S. & Vijayakumaran, M., 2012. Effect of copper in protein, carbohydrate and lipid contents of the juvenile lobster, *Panulirus homarus homarus* (Linnaeus, 1758). *Sri Lanka. J. Aquat. Sci.*, **17**: 19-34.

Manca-Zeichen, M., Agnesi, S., Mariani, A., Maccaroni, A. & Ardizzone, G.D., 2001. Biology and population dynamics of *Donax trunculus* L. (Bivalvia; Donacidae) in the south adriatic coast (Italy). *Estuar. Coast. Shelf. Sci.*, **56**: 345-358.

Manca-Zeichen, M., Agnesi, S., Mariani, A., Maccaroni, A. & Ardizzone, G.D., 2002. Biology and population dynamics of *Donax trunculus* L. (Bivalvia; Donacidae) in the South Adriatic coast (Italy). *Estuar. Coast. Shelf. Sci.*, **54**: 971-982.

Marcomini, S.C., Penchaszadeh, P., Lopez, R.A. & Luzzatto, D., 2002. Beach morphodynamics and clam (*Donax hanleyanus*) densities in Buenos Aires, Argentina. *J. Coast. Res.*, **18**: 601-611.

Marobin, D., Prat, M. & Jouvenel, J.Y., 2007. Etude globale sur la Telline *Donax trunculus* (Linné1767) en Camargue. Parc Naturel Régional de Camargue. Rapport Intermédiaire de la Campagne d'automne. Contrat BIOTOPE/P2A Développement.

Martinez, G., Brokordt, K., Aguilera, C., Soto, V. & Guderley, H., 2000. Effect of diet and temperature upon muscle metabolic capacities and biochemical composition of gonad and muscle in *Argopecten purpuratus* Lamarck 1819. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **247**:29-49.

Martínez-Pita, I., Hachero-Cruzado, I., Sánchez-Lazo, C. & Moreno, O., 2011. Effect of diet on the lipid of the commercial clam *Donax trunculus* (Mollusca: Bivalvia): sex related differences. *Aquac. Res.*, **43(8)**: 1134-1144.

Martínez-Pita, I., Sánchez-Lazo, C., Ruíz-Jarabo, I., Herrera, M. & Mancera, J.M., 2012. Biochemical composition, lipid classes, fatty acids and sexual

hormones in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from cultivated populations in south Spain. *Aquaculture*, **358–359**: 274-283.

Martin-Garin, A. & Simon, O., 2004. Fiche Radionucléide, Cadmium et environnement. Direction de l'environnement et de l'intervention-Service d'étude du comportement des radionucléides dans les écosystèmes (IRSN). 14 p.

McClellan-Greena, P., Romano, J. & Oberdörster, E., 2007. Does gender really matter in contaminant exposure? A case study using invertebrate models. *Environ. Res.*, **104**: 183-191.

McComb, J., Turquoise, C.A., Fengxiang, X.H. & Tchounwou, P.B. 2014. Understanding biogeochemical cycling of trace elements and heavy metals in estuarine ecosystems. *J. Bioremediat. Biodegrad.*, **5**:1000e148. doi:10.4172/2155-6199.1000e148.

McLachlan, A., 1996. Physical factors in benthic ecology: effects of changing particle size on beach fauna. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **131**: 205-217.

McLaughlin, M.J. & Singh, B.R., 1999. Cadmium in soils and plants. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 273 pp.

Meistertzheim, A.L., Lejart, M., Le Goic, N. & Thebault, M.T., 2009. Sex-, gametogenesis, and tidal height-related differences in levels of HSP70 and metallothioneins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integ. Physiol.*, **152 (2)**: 234-239.

Mejdoub, Z., Fahde, A., Loutfi, M. & Kabine, M., 2017. Oxidative stress responses of the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to emissary's pollution in coastal areas of Casablanca. *Ocean. Coast. Manage.*, **136**: 95-103.

Menéndez-Helman, R.J, Ferreyroa, G.V, dos Santos Afonso, M. & Salibián, A., 2015. Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotox. Environ. Saf.*, **111**: 236-241.

Merzouk, S.A., Saker, M., Briksi Reguig, K., Soulimane, N., Merzouk, H., Guermouche, B., Berrouiguet, A.Y., Hichami, A., Narce, M. & Khan, N.A., 2008. N-3 polyunsaturated fatty acids modulate in-vitro T cell function in type I diabetic patients. *Lipids*, **43**:485-497.

Mesquita, C.S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J.V. & Marcos, J. C., 2014. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal. Biochem.*, **458**: 69-71.

Michel, C. & Vincent-Hubert, F., 2015. DNA oxidation and DNA repair in gills of zebra mussels exposed to cadmium and benzo(a)pyrene. *Ecotoxicology*, **24(9)**: 2009-2016.

- Moncaleano-Niño, A.M., Barrios-Latorre, S.A., Poloche-Hernández, J.F., Becquet, V., Huet, V., Villamil, L., Thomas-Guyon, H., Ahrens, M.J. & Luna-Acosta, A., 2017.** Alterations of tissue metallothionein and vitellogenin concentrations in tropical cup oysters (*Saccostrea* sp.) following short-term (96h) exposure to cadmium. *Aquat. Toxicol.*, **185**: 160-170.
- Moore M.N., Widdows, J., Cleary, J.J., Pipe, R.K., Salkeld, P.N., Donkin, P., Farrar, S.V., Evans, S.V. & Thomson, P.E., 1984.** Responses of the mussel *Mytilus edulis* to copper and phenanthrene: interactive effects. *Mar. Environ. Res.*, **14**:167-183.
- Moraga, D., Meistertzheim, A.L., Tanguy-Royer, S., Boutet, I., Tanguy, A. & Donval, A., 2001.** Stress response in Cu²⁺ and Cd²⁺ exposed oysters (*Crassostrea gigas*): an immunohistochemical approach. *Comp. Biochem. Physiol C.*, **141**: 151-156.
- Morais, S., Boaventura, D., Narciso, L., Re, P. & Hawkins, S.J., 2003.** Gonad development and fatty acid composition of *Patella depressa* Pennant (Gastropoda: Prosobranchia) populations with different patterns of spatial distribution, in exposed and sheltered sites. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **294**: 61-80.
- Moraleda-Cibrián, N., Carrassón, M. & Rosell-Melé, A., 2015.** Polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in European hake (*Merluccius merluccius*) muscle from the Western Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.*, **95(1)**: 513-9.
- Moreira, A., Figueira, E., Pecora, I.L., Soares, A.M. & Freitas, R., 2017.** Biochemical alterations in native and exotic oyster species in Brazil in response to increasing temperature. *Comp. Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.*, **191**: 183-193.
- 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*. Thèse de Doctorat en Ecotoxicologie, Université de Metz. 275 p.
- Mouëza, M., 1971.** Contribution à l'étude de l'écologie et de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque Lamellibranche). Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques, Mention océanographie. 130 p.
- Mouëza, M. & Chessel, D., 1976.** Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque Lamellibranche) dans l'Algérois: analyse statistique de la dispersion le long d'une plage en baie de Bou-Ismaïl. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **21**: 211-221.
- Mouëza, M. & Frenkiel-Renault, L., 1973.** Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusques: Lamellibranches) dans l'Algérois: la reproduction. *Cah. Biol. Mar.*, **14**: 261-283.

- Moukrim, A., El Hamidi, F., Lagbouri, A., Kaaya, A., Zekhnini, A., Bouhaimi, A. & Narbonne, J.F., 2004.** Study of *Donax trunculus* as a sentinel species for environmental monitoring of sandy beaches on Moroccan coasts. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **73**: 674-681.
- Mouneyrac, C., Linot, S., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Métais, I., Durou, C., Minier, C. & Pellerin, J., 2008.** Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **157**: 133-141.
- Mubiana, V.K. & Blust, R., 2007.** Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* **63**: 219-235.
- Muinde, V.M., Nguu, E.K., Ogoyi, D.O. & Shiundu, P.M., 2013.** Effects of heavy metal pollution on omega-3 polyunsaturated fatty acids levels in Tilapia fish from Winam gulf of lake Victoria. *Open. Environ. Eng. J.*, **6**: 22-31.
- Munro, D. & Blier, P.U., 2012.** The extreme longevity of *Arctica islandica* is associated with increased peroxidation resistance in mitochondrial membranes. *Aging. Cell.*, **11**: 845-855.

N

- Nani, A., Belarbi, M., Ksouri-Megdiche, W., Abdoul-Azize, S., Benammar, C., Ghiringhelli, F., Hichami, A. & Khan, N.A., 2015.** Effects of polyphenols and lipids from *Pennisetum glaucum* grains on T-cell activation: modulation of Ca²⁺ and ERK1/ ERK2 signaling. *Complement. Altern. Med.*, **15**: 426.
- Nardi, A., Mincarelli, L.F., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G. & Regoli, F., 2017.** Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, **25**: 169:493-502.
- Narra, M.R., Rajender, K., Rudra Reddy, R., Rao J.V. & Begum G., 2015.** The role of vitamin C as antioxidant in protection of biochemical and haematological stress induced by chlorpyrifos in freshwater fish *Clarias batrachus*. *Chemosphere*, **132**:172-178.
- Neuberger-Cywiak, L., Aчитuv, Y. & Garcia, E.M., 2003.** Effects of Zinc and Cadmium on the Burrowing Behavior, LC₅₀, and LT₅₀ on *Donax trunculus* Linnaeus (Bivalvia- Donacidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **70**:713-722.
- Neves, M., Castro, B.B., Vidal, T., Vieira, R., Marques, J.C., Coutinho, J.A.P., Gonçalves, F. & Gonçalves, A.M.M., 2015.** Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra®Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecol. Indic.*, **53**: 220-230.

- Ng, Y.T. & Wang, W.X., 2004.** Detoxification and effects of Ag, Cd and Zn pre-exposure on metal uptake kinetics in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **268**: 161-192.
- Ngo, H.T.T., Gerstmann, S. & Frank H., 2012.** Subchronic effects of environment like cadmium levels on the bivalve *Anodonta anatina* (Linnaeus 1758): II. Effects on energy reserves in relation to calcium metabolism. *Toxicol. Environ. Chem.*, **93(9)**: 1802-1814.
- Ning, J., Li, C., Yang, G., Wan, A. & Sun, S., 2013.** Use of RNA: DNA ratios to evaluate the condition and growth of the copepod *Calanus sinicus* in the Southern Yellow Sea. *Deep. Sea. Res II.*, **97**:109-116.
- Norkko, J., Norkko, A., Thrush, S.F. & Cummings, V.G., 2005.** Seasonal variations in the nucleic acid content and ARN: DNA ratio of the gonad of the scallop *Pecten maximus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **326**: 144-156.
- Nzengue, Y., Candéias, S.M., Sauvaigo, S., Douki, T., Favier, A., Rachidi, W. & Guiraud, P., 2011.** The toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: its redox biomarkers. *J. Trac. Elem. Med. Biol.*, **25(3)**: 171-180.

O

- Oaten, J.F., Hudson, M.D., Jensen, A.C. & Williams, I.D., 2015.** Effects of organism preparation in metallothionein and metal analysis in marine invertebrates for biomonitoring marine pollution. *Sci. Total. Environ.*, **518-519**: 238-247.
- Oh, S.H., Choi, J.E. & Lim, S.C., 2006.** Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells. *Toxicology*, **220**: 1-12.
- Ojea, J., Pazos, A.J., Martínez, D., Novoa, S., Sánchez, J.L. & Abad, M., 2004.** Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussates* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture*, **238**: 451-468.
- Olivares-Rubio, H.F. & Vega-López, A., 2015.** Fatty acid metabolism in fish species as a biomarker for environmental monitoring. *Environ. Pollut.*, **218**: 297-312.
- Oliveira, L.F., Cabral, M.T., Vieira, C.E., Antoniazzi, M.H., Risso, W.E. & Martínez, C.B., 2016.** Metals bioaccumulation and biomarkers responses in the Neotropical freshwater clam *Anodontites trapesialis*: Implications for monitoring coal mining areas. *Sci. Total. Environ.*, **571**: 983-991.

Oruc, E.O. & Usta, D., 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **95**: 48-55.

Ounissi, M., 2007. Devenir et incidences des flux de matières continentales enrichissantes et polluantes dans le littoral d'Annaba. Bilan final du projet de recherche ONEDD/MATE/05/04. 11 p.

P

Part, P., Svanberg, O. & Kiessling, A., 1985. The availability of cadmium to perfused rainbow trout gills in different water qualities. *Water. Res.*, **19**: 427-434.

Patterson, J., 2002. Introduction-comparative dietary risk: balance the risks and benefits of fish consumption. *Comment. Toxicol.*, **8**: 337-344.

Paul-Pont, I., 2010. Sensibilité et adaptation de populations de bivalves marins soumis à des stress multiples: infestation parasitaire, contamination microbienne et pollution métallique. Thèse de doctorat en biogéochimie et écosystèmes, Université de Bordeaux. 339 p.

Pazos, A.J., Sánchez, J.L., Román, G., Pérez-Perellé, M.L. & Abad, M., 2003. Seasonal changes in lipid classes and fatty acid composition in the digestive gland of *Pecten maximus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **134B**: 367-380.

Pedrosa, J., Gravato, C., Campos, D., Cardoso, P., Figueira, E., Nowak, C., Soares, A.M.V.M., Barata, C. & Pestana, J.L.T., 2017. Investigating heritability of cadmium tolerance in *Chironomus riparius* natural populations: A physiological approach. *Chemosphere*, **170**: 83-94.

Pelletier, E., Campbell, P.G.C. & Denzeau, F., 2004. Ecotoxicologie moléculaire. Principes fondamentaux et perspectives de développement. 449 p.

Penchaszadeh, P.E. & Olivier, S.R., 1975. Ecología de una población de 'berberecho' (*Donax hanleyanus*) en Villa Gesell, Argentina. *Malacologia*, **15**: 133-146.

Penttinen, S., Malk, V., Väisänen, A. & Penttinen, O.P., 2011. Using the critical body residue approach to determine the acute toxicity of cadmium at varying levels of water hardness and dissolved organic carbon concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **74**: 1151-1155.

Pereira, A.M., Frange, P., Campoy, A., Oliveira, A.P., Joaquim, S., Matis, D., Chicharo, L. & Gaspar, M.B., 2015. Larval hatching and development of the wedge shell (*Donax trunculus* L.) under increased CO₂ in southern Portugal. *Reg. Environ. Change*. doi 10.1007/s10113-015-0803-4.

- Perez, J.R., Loureiro, S., Menezes, S., Palma, P., Fernandes, R.M. & Barbosa I.R., 2010.** Assessment of water quality in the Alqueva reservoir (Portugal) using bioassays. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **17(3)**: 688-702.
- Perić, L., Nerlović, V., Žurga, P., Žilić, L. & Ramšak, A., 2017.** Variations of biomarkers response in mussels *Mytilus galloprovincialis* to low, moderate and high concentrations of organic chemicals and metals. *Chemosphere*, **174**: 554-562.
- Picard, R., 2009.** Étude des indicateurs de stress et de vitalité chez les Mollusques bivalves comme outils diagnostiques en Conchyliculture, mémoire de maître ès sciences (océanographie), Université Du Québec A Rimouski. 157 p.
- Piazza, V., Gambardella, C., Canepa, S., Costa, E., Faimali, M. & Garaventa, F., 2016.** Temperature and salinity effects on cadmium toxicity on lethal and sublethal responses of *Amphibalanus amphitrite nauplii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **123**: 8-17.
- Pronker, A.E., Nevejan, N.M., Peene, F., Geijssen, P. & Sorgeloos, P., 2008.** Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758). Part I. Impact of different micro-algae mixtures on broodstock performance. *Aquac. Int.*, **16**: 297-307.

R

- Rainbow, P.S., 2002.** Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.*, **120**: 497-507.
- Ramakritiman, A.C., Rothishri, C. & Kumaraguru, A.K., 2012.** Acute toxicity of metals: Cu, Pb, Cd, Hg and Zn on marine Molluscs, *Cerithedia cingulata* G., and *Modiolus philippinarum* H. *Indian. J. Geo. Mar. Sci.*, **41(2)**: 141-145.
- Ramón, M., Abello, P. & Richardson, C.A., 1995.** Population structure and growth of *Donax trunculus* (Bivalvia : Donacidae) in the western Mediterranean. *Mar. Biol.*, **121**: 665-671.
- Rana, S.V.S. & Singh, R., 1996.** Species differences in glutathione-dependent enzymes in the liver and kidney of two fresh water fishes and their implications for cadmium toxicity. *Ichthyol. Res.*, **43**: 223-229.
- Razak, Z.K.A., Basri, M., Dzulkefly, K., Razak, C.A.N. & Salleh, A.B., 2001.** Extraction and characterization of fish oil from *Monopterus albus*. *Malaysian. J. Anal. Sci.*, **7**: 217-220.
- Reddy, S.L.N., Venugopal, N. & Ramana Rao, J.V., 1989.** In vivo effects of cadmium chloride on certain aspects of carbohydrate metabolism in the tissues

- of a freshwater field crab *Barytelphusa guerini*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **42**: 847-53.
- Regoli, F. & Giuliani, M.E., 2014.** Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.*, **93**: 106-117.
- Revathi, P., Vasanthi, L.A. & Munuswamy, N., 2011.** Effect of cadmium on the ovarian development in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **74(4)**: 623-9.
- Richir, J. & Gobert, S., 2014.** The effect of size, weight, body compartment, sex and reproductive status on the bioaccumulation of 19 trace elements in rope-grown *Mytilus galloprovincialis*. *Ecol. Indic.*, **36**: 33-47.
- Ringwood, A.H. & Brouwer, M., 1995.** Patterns of metallothionein expression in oyster embryos. *Mar. Environ. Res.*, **39**: 101-105.
- Rittschof, D. & McClellan-Green, P., 2005.** Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Mar. Pollut. Bull.*, **50**: 369-373.
- Rocha, T.L., Gomes, T., Pinheiro, J.P., Sousa, V.S., Nunes, L.M., Teixeira, M.R. & Bebianno, M.J., 2015.** Toxicokinetics and tissue distribution of cadmium-based Quantum Dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Pollut.*, **204**: 207-214.
- Ruangsomboon, S. & Wongrat, L., 2006.** Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moinamacrocopa*), and the predatory catfish *Clarias macrocephalus* x *C. Gariepinus*. *Aquat. Toxicol.*, **78**: 15-20.

S

- Saito, H., 2004.** Lipid and fatty acid composition of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*: influence of season and maturation. *Lipids*, **39**: 997-1005.
- Saito, H. & Aono, H., 2014.** Characteristics of lipid and fatty acid of marine gastropod *Turbo cornutus*: high levels of arachidonic and *n*-3 docosapentaenoic acid. *Food. Chem.*, **145**: 135-144.
- Saker, I.E., 2007.** Pollution chimiques par les effluents industriels directs introduits au littoral d'Annaba. Mémoire de Magister, Université d'Annaba. 34 p.
- Satarug, S. & Moore, M.R., 2004.** Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ. Health. Persp.*, **112**: 1099-1103.
- Schneider, W.C., 1957.** Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In methods in enzymology Vol. III. (Ed. by Colowick S. P. and Kaplan N. O.). Acad. Press, New York. 680-684 pp.

- Schoonover, C.M., Wieker, J., Pope, R., Brown, C., Cooper, E., DeWitt, J., Gunselman, S., Jensen, C., Stevens, W., Yri, J., Nezat, C. & Joyner-Matos, J., 2016. Development of functional trait biomarkers for trace metal exposure in freshwater clams (*Musculium spp.*). *Com. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, **200**: 21-34.
- Scudiero, R., Creti, P., Trinchella, F. & Esposito, M.G., 2014. Evaluation of cadmium, lead and metallothionein contents in the tissues of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Campania coast (Italy): levels and seasonal trends. *C. R. Biol.*, **337**: 451-458.
- Senthamilselvan, D., Chezian, A. & Suresh, E., 2016. Synergistic effect of nickel and mercury on fatty acid composition in the muscle of fish *Lates calcarifer*. *J. Fish. Aquat. Sci.*, **11(1)**: 77-84.
- Shaikh, Y., Suryawanshi G.D., Dama L.B. & Mane U.H., 2012. Behavioural changes of fresh water bivalve molluscs *Lamellidens marginalis* due to acute toxicity of cadmium. *DAV. Int. J. Sci.*, **1(2)**: 103-106.
- Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnyneck, C., Newhall, A. & Freidman, L., 1966. A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Anal. Biochem.*, **19**: 415-428.
- Shuhaimi-Othman, M., Yakub, N., Ramle, N.A. & Abas, A., 2011. Toxicity of Metals to a freshwater ostracod: *Stenocypris major*. *J. Toxicol.*, **136104**: 1-8. doi:10.1155/2011/136104.
- Siebert, M.N., Mattos, J.J., Piazza, C.E., de Lima, D., Gomes, C.H., de Melo, C. M. & Bainy, A.C., 2017. Characterization of ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD) in oyster *Crassostrea brasiliana*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol Biol.*, **203**: 115-121.
- Sifi, K., 2009. Biosurveillance de la qualite des eaux du golfe d'Annaba: croissance, composition biochimique et dosage de biomarqueurs du stress environnemental chez *Donax trunculus* (Mollusque, Bivalve). Thèse de Doctorat d'état en biologie animale, option: Ecotoxicologie, Université d'Annaba. 229 p.
- Sifi, K., Amira, A. & Soltani, N., 2013. Oxidative stress and biochemical composition in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria). *Adv. Environ. Biol.*, **7(4)**: 595-604.
- Signa, G., Di Leonardo, R., Vaccaro, A., Tramati, C.D., Mazzola, A. & Vizzini, S., 2015. Lipid and fatty acid biomarkers as proxies for environmental contamination in caged mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Ecol. Indic.*, **57**: 384-394.
- Smaoui-Damak, W., Berthet, B. & Hamza Chaffai, A., 2009. In situ potential use of metallothionein as a biomarker of cadmium contamination in *Ruditapes decussates*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **72**: 1489-1498.

- Soladoye, O.P., Juárez, M.L., Aalhus, J.L., Shand, P. & Estévez, M., 2015.** Protein Oxidation in Processed Meat: Mechanisms and Potential Implications on Human Health. *Compr. Rev. Food. Sci. Food. Saf.*, **14**: 106-122.
- Soltani, N., Amira, A., Sifi, K. & Beldi, H., 2012.** Environmental monitoring of the Annaba gulf (algeria): measure of biomarkers in *Donax trunculus* and metallic pollution. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **137(1-4)**: 47-56.
- Sornom, P., Felten, V., Médoc, V., Sroda, S., Rousselle, P. & Beisel, J.N., 2010.** Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environ. Pollut.*, **158**: 1288-1295.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Robert, R., Quéré, C., Le Coz, J.R. & Samain, J.F., 1996.** Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture*, **143**: 361-378.
- Soudant, P., Van Ryckeghem, K., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F. & Sorgeloos, P., 1999.** Comparison of the lipid class and fatty acid compositions between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol B.*, **123**: 209-222.
- Staels, B. & Auwerx, J., 1992.** Perturbation of developmental gene expression in rat liver by fibric acid derivatives: lipoprotein lipase and alpha-fetoprotein as models. *Development*, **115(4)**: 1035-1043.
- Sul, H.S. & Smith, S., 2008.** Fatty acid synthesis in eukaryotes. In: Vance, D.E., Vance, J.E. (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, fifth ed. Elsevier, The Netherlands. 156-190 pp.
- Suthers, I.M., Cleary, J.J., Battaglione, S.C. & Evans, R., 1996.** Relative RNA content as measure of condition in larval and juvenile fish. *Mar. Freshwater Res.*, **47**: 301-307.
- Swanson, D., Block, R. & Shaker, A.M., 2012.** Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. American Society for Nutrition. *Adv. Nutr.*, **3**: 1-7.
- Swaroop, S., Gilroy, A.B. & Uemura, K., 1966.** Statistical methods in Malaria eradication. World Health Organisation, *Geneva*, **51**: 1-164.

T

- Tiwari, M., Nagpure, N.S., Saksena, D.N., Kumar, R., Singh, S.P., Kushwaha, B. & Lakra, W.S., 2011.** Evaluation of acute toxicity levels and ethological responses under heavy metal cadmium exposure in freshwater teleost, *Channa punctata* (Bloch). *Int. J. Aquat. Sci.*, **2(1)**: 36-47.

Tlili, S., 2012. Approche multi-marqueurs pour l'évaluation de l'état de santé du golfe de Tunis: Etude des réponses biochimiques, physiologiques et cytologiques des mollusques bivalves exposés aux effluents des oueds. Thèse de Doctorat en sciences de la vie et de la santé. Mention: Ecotoxicologie, Université de Monastir. 250 p.

Tlili, S., Métais, I., Boussetta, H. & Mouneyrac, C., 2010. Linking changes at sub-individual and population levels in *Donax trunculus*: assessment of marine stress. *Chemosphere*, **81**: 692-700.

Tlili, S., Minguez, L., Giamberini, L., Geffard, A., Boussetta, H. & Mouneyraca, C., 2013. Assessment of the health status of *Donax trunculus* from the Gulf of Tunis using integrative biomarker indices. *Ecol. Indic.*, **32**: 285-293.

Trinchella, F., Riggio, M., Filosa, S., Volpe, M.G., Parisi, E. & Scudiero, R., 2006. Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, **144**: 272-288.

U

Uddin, S., Aba, A., Fowler, S.W., Behbehani, M., Ismaeel, A., Al-Shammari, H., Alboloushi, A., Mietelski, J.W., Al-Ghadban, A., Al-Ghunaim, A., Khabbaz, A. & Alboloushi, O., 2015. Radioactivity in the Kuwait marine environment-Baseline measurements and review. *Mar. Pollut. Bull.*, **100(2)**: 651-61.

Uma Devi, V., 1996. Bioaccumulation and metabolic effects of cadmium on marine fouling dressinid bivalve, *Mytilopsis sallei* (Reeluz). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **31**: 47-53.

Umminger, B.L., 1977. Relation of whole blood sugar concentration in vertebrate to standard metabolic rate. *Comp. Biochem. Physiol A.*, **56**: 457-460.

US EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2001. Uptake of ambient water quality criteria for cadmium. US Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC. EPA-822-R-OA-001.

US NTP., 2000. Ninth report on carcinogens. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC, USA.

V

Vance, D.E. & Vance, J.E., 2002. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. In: 4th ed. Elsevier, 624.

- Varo, I., Nunes, B., Amat, F., Torreblanca, A., Guilhermino, L. & Navarro, J.C., 2007.** Effect of sublethal concentrations of copper sulphate on seabream *Sparus aurata* fingerlings. *Aquat. Living. Resour.*, **20**: 263-270.
- Velma, V. & Tchounwou P.B., 2010.** Chromium induced biochemical, genotoxic and histopathologic effects in liver and kidney of Goldfish, *Carassius auratus*. *Mutat. Res.*, **698(1-2)**: 43-51
- Venkata Chandrudu, M., Sreenivasa Reddy, A. & Radhakrishnaiah, K., 2007.** Effect of subacute concentration of cadmium on the energetics of freshwater mussel *Lamellidens marginalis* (Lam.) and fish *Labeo rohita* (Ham.). *Nat. Environ. Pollut. Technol.*, **6(3)**: 387-392.
- Verge, G.G., 2006.** Evaluation et gestion du risque lié à l'ingestion de produits de la mer contaminés par le cadmium. Thèse de docteur vétérinaire, Université de Toulouse. 95 p.
- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Palmero, S. & Orunesu, M. 1982.** Effects of Cu⁺⁺ on nuclear RNA polymerase activities in mussel digestive gland. *Mar. Biol. Lett.*, **3**: 345-353.
- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Palmero, S., Zanicchi, G. & M. Orunesu., 1982.** Evaluation of general and specific stress indices in mussels collected from populations subjected to different levels of heavy metal pollution. *Mar. Environ. Res.*, **6**: 235-243.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F. & Fabbri, R., 1997.** A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.*, **44(1)**: 69-84.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E. & Blasco, J., 1999.** Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus edulis*. *Am. J. Physiol.*, **277**:1612-1619.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N. & Panfoli, I., 2000.** Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-legrand)*, **46**: 407-417.
- Vicente, N., Henry, M., Chabert, D. & Riva, A., 1988.** Contrôle de métaux lourds dans les écosystèmes littoraux et dans les chaînes alimentaires marines: expériences de contamination par un élément métallique, le cadmium. *Océanis*, **14** (1): 201-223.
- Vijayavel, K., Anbuselvam, C., Balasubramanian, M.P., Deepak-Samuel, V. & Gopalakrishnan, S., 2006.** Assessment of biochemical components and enzyme activities in the estuarine crab *Scylla tranquebarica* from naphthalene contaminated habitats. *Ecotoxicology*, **15(5)**: 469-476.

W

- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. & Beyersmann, D., 2003.** Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, **192**: 95-117.
- Walker, S.T., Mantle, D., Bythell, J.C. & Thomason, J.C., 2000.** Oxidative-stress: comparison of species specific and tissue specific effects in the marine bivalves *Mytilus edulis* (L.) and *Dosinia lupinus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.*, **127**: 347-355.
- Wallace, R.A. 1985.** Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates. In: Browder LW, editor. *Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis*, vol. 1. New York: Plenum Press. 127-77 p.
- Wang, W. & Rainbow, P.S., 2006.** Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. *Environ. Chem.*, **3**: 395-399.
- Weber, D., Davies, M.J. & Grune, T., 2015.** Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox. Biol.*, **5**: 367-380.
- Wei, K. & Yang, J., 2015.** Oxidative damage induced by copper and beta-cypermethrin in gill of the freshwater crayfish *Procambarus clarkia*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **113**: 446-453.
- Who., 1992.** Cadmium. Environmental Health Criteria. World Health Organization, Geneva. 280 pp.
- Widdows, J. & Donkin, P. 1992.** Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: Gosling Eeditor. *The mussels Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Press. 383-464 p.
- Wu, H., Xu, L., Ji, C. & Yu, D., 2016.** Proteomic and metabolomic responses in D-shape larval mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium and arsenic. *Fish. Shellfish. Immunol.*, **58**: 514-520.
- Wu, H., Xu, L., Yu, D. & Ji, C., 2016.** Differential metabolic responses in three life stages of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Ecotoxicology*, **26**(1): 74-80.

X

- Xia, L., Chen, S., Dahms, H.U., Ying, X. & Peng, X., 2016.** Cadmium induced oxidative damage and apoptosis in the hepatopancreas of *Meretrix meretrix*. *Ecotoxicology*, **25**: 959-969.

- Xiu, M., Pan, L. & Jin, Q., 2016.** Toxic effects upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **44**: 75-83.
- Xu, J., Cao, K., Li, Y., Zou, X., Chen, C., Szeto, I.M., Dong, Z., Zhao, Y., Shi, Y., Wang, J., Liu, J. & Feng, Z., 2014.** Bitter melon inhibits the development of obesity-associated fatty liver in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *J. Nutr.*, **144**: 475-483.
- Xuan, R., Wang, L., Sun, M., Ren, G. & Jiang, M., 2011.** Effects of cadmium on carbohydrate and protein metabolisms in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, **154(3)**: 268-74.

Y

- Yannick, G., Denis, S., Adrien, S., Kevin, M., Pierre, G., Solène, B., Marine, N., Patrick, B., Herehia, H., Serge, P. & Gilles, L.M., 2017.** Response of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* to cadmium and chromium: Identification of molecular biomarkers. *Mar. Pollut. Bull.*, **xxx**: xxx-xxx.
- Yeung, J.W.Y., Zhou, G.J. & Leung, K.M., 2016.** Sub-lethal effects of cadmium and copper on RNA/DNA ratio and energy reserves in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **132**: 59-67.
- Yeung, J.W.Y., Zhou, G.J. & Leung, K.M., 2017.** Spatiotemporal variations in metal accumulation, RNA/DNA ratio and energy reserve in *Perna viridis* transplanted along a marine pollution gradient in Hong Kong. *Mar. Pollut. Bull.*, **xxx**: xxx-xxx. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.01.024.

- Young, V.R. 1970.** The role of skeletal muscle and cardiac muscle in the regulation of protein metabolism. In: H.N. Munro [Ed.] Mammalian protein metabolism, Vol. N. Academic Press, New York, NY. 585-674 pp.

Z

- Zhang, B., Shi, Z.R., Wang, X.L., Deng, S.G. & Lin, H.M., 2015.** Depuration of cadmium from blue mussel (*Mytilus edulis*) by hydrolysis peptides and chelating metal elements. *Food. Res. Int.*, **73**: 162-168.
- Zhang, T., Yang, M., Pan, H., Li, S., Ren, B., Ren, Z., Xing, N., Qi, L., Ren, Q., Xu S., Song, J. & Ma, J., 2017.** Does time difference of the acetylcholinesterase (AChE) inhibition in different tissues exist? A case study of zebra fish (*Danio rerio*) exposed to cadmium chloride and deltamethrin. *Chemosphere*, **168**: 908-916.

- Zhou, Y., Jing, W., Dahms, H.U., Hwang, J.S. & Wang, L., 2017.** Oxidative damage, ultrastructural alterations and gene expressions of hemocytes in the freshwater crab *Sinopotamon henanense* exposed to cadmium. *Ecotoxicol. Environ. saf.*, **138**: 130-138.
- Zhu, B., Gao, K.S., Wang, K.J., Ke, C.H. & Huang, H.Q., 2012.** Gonad differential proteins revealed with proteomics in oyster (*Saccostrea cucullata*) using alga as food contaminated with cadmium. *Chemosphere*, **87(4)**: 397-403.

Annexes

Annexe 1: Données statistiques

Tableau 1. Analyse de la variance à trois critères de classification (concentration, temps et sexe) des mortalités transformées chez *D. trunculus* en période de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Concentration	2	3884,8	1942,4	738,04	0,001***
Temps	4	40893,5	10223,4	3884,52	0,001***
Sexe	1	435,2	435,2	165,36	0,001***
Concentration x Temps	8	1122,3	140,3	53,31	0,001***
Temps x Sexe	4	131,1	32,8	12,46	0,001***
Concentration x Sexe	2	7,4	3,7	1,41	0,251
Concentration x Temps x Sexe	8	47,7	6,0	2,27	0,034*
Erreur Résiduelle	60	157,9	2,6		
Totales	89	46680,1			

Tableau 2. Analyse de la variance à trois critères de classification (concentration, temps et période) des mortalités transformées de *D. trunculus* en période de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Concentration	2	4823,20	1939,80	242,50	0,001***
Temps	4	50363,30	10078,2	1259,96	0,001***
période	1	3189,10	3189,10	398,69	0,001***
Concentration x Temps	8	1324,90	132,20	16,53	0,001***
Temps x Période	4	1272,20	318,10	39,76	0,001***
Concentration x Période	2	115,50	57,70	7,22	0,001***
Concentration x Temps x Période	8	118,30	14,80	1,85	0,076
Erreur Résiduelle	105	839,90	8		
Totales	134	6204,63			

DDL: degré de liberté, SCE: somme des carrés des écarts, CM: carré moyen, F_{obs}: F observé, P: seuil de signification; non significatif ($p > 0,05$); * significatif ($p < 0,05$); ** très significatif ($p < 0,01$); *** hautement significatif ($p < 0,001$).

Tableau 3. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de protéines carbonylées chez *D. trunculus* en période de repos sexuel.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	37,52	18,76	157,68	0,001***
Temps	2	2,22	1,11	9,37	0,001***
Phase	1	0,88	0,88	7,43	0,009**
Traitement x Temps	4	2,48	0,62	5,22	0,001***
Temps x Phase	2	11,04	5,52	46,43	0,001***
Traitement x Phase	2	0,83	0,41	3,50	0,037*
Traitement x Temps x Phase	4	5,62	1,40	11,82	0,001***
Erreur Résiduelle	54	6,42	0,11		
Totales	71	67,05			

Tableau 4. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de métallothionéines chez *D. trunculus* en période de repos sexuel.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	33,37	16,68	61,01	0,001***
Temps	2	9,55	4,77	17,47	0,001***
Phase	1	6,07	6,07	22,21	0,001***
Traitement x Temps	4	0,74	0,18	0,68	0,608
Temps x Phase	2	61,03	30,51	11,60	0,001***
Traitement x Phase	2	1,38	0,69	2,53	0,089
Traitement x Temps x Phase	4	33,89	8,47	30,99	0,001***
Erreur Résiduelle	54	14,76	0,27		
Totales	71	160,83			

Tableau 5. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de protéines carbonylées chez les mâles de *D. trunculus* en période de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	28,16	14,08	28,54	0,001***
Temps	2	2,41	1,20	2,45	0,096
Phase	1	1,62	1,62	3,28	0,076
Traitement x Temps	4	0,58	0,14	0,29	0,880
Temps x Phase	2	14,44	7,22	14,64	0,001***
Traitement x Phase	2	0,21	0,10	0,22	0,803
Traitement x Temps x Phase	4	11,84	2,96	6,00	0,001***
Erreur Résiduelle	54	26,64	0,49		
Totales	71	85,93			

Tableau 6. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de protéines carbonylées chez les femelles de *D. trunculus* en période de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	38,55	19,27	39,69	0,001***
Temps	2	4,29	2,14	4,42	0,017*
Phase	1	0,92	0,92	1,91	0,172
Traitement x Temps	4	3,47	0,86	1,79	0,145
Temps x Phase	2	17,56	8,78	18,09	0,001***
Traitement x Phase	2	0,31	0,15	0,33	0,721
Traitement x Temps x Phase	4	9,14	2,28	4,71	0,002**
Erreur Résiduelle	54	26,22	0,48		
Totales	71	100,50			

Tableau 7. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et sexe) des **taux de protéines carbonylées** chez les **mâles et les femelles** de *D. trunculus* durant la **phase d'exposition**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	31,81	15,90	40,31	0,001***
Temps	2	33,22	16,61	42,09	0,001***
Sexe	1	3,57	3,57	9,07	0,004**
Traitement x Temps	4	17,01	4,25	10,78	0,001***
Temps x Sexe	2	0,58	0,29	0,74	0,482
Traitement x Sexe	2	0,01	0,01	0,01	0,996
Traitement x Temps x Sexe	4	0,82	0,20	0,52	0,721
Erreur Résiduelle	54	21,31	0,39		
Totales	71	108,34			

Tableau 8. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et sexe) des **taux de protéines carbonylées** chez les **mâles et les femelles** de *D. trunculus* durant la **phase de déuration**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	0,20	2,78	3,63	0,033*
Temps	2	3,57	0,10	0,14	0,873
Sexe	1	2,50	3,57	4,67	0,035*
Traitement x Temps	4	7,96	1,99	2,60	0,046
Temps x Sexe	2	6,30	3,15	4,12	0,022*
Traitement x Sexe	2	19,79	9,89	12,93	0,001***
Traitement x Temps x Sexe	4	0,94	0,23	0,31	0,874
Erreur Résiduelle	54	41,34	0,76		
Totales	71	85,70			

Tableau 9. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des **taux de protéines carbonylées** chez individus de *D. trunculus* en **phase de d'exposition** au Cd lors de la période de **repos et de reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	44,18	19,06	59,65	0,001***
Temps	2	42,95	17,64	55,21	0,001***
Période	1	8,54	8,54	26,72	0,001***
Traitement x Temps	4	22,96	4,89	15,31	0,001***
Temps x Période	2	0,51	0,25	0,80	0,451
Traitement x Période	2	1,26	0,63	1,97	0,145
Traitement x Temps x Période	4	0,90	0,22	0,71	0,589
Erreur Résiduelle	90	28,76	0,31		
Totales	107	150,08			

Tableau 10. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des **taux de protéines carbonylées** chez individus de *D. trunculus* en **phase de dépuracion** au Cd lors de la période de **repos et de reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	55,93	26,32	58,51	0,001***
Temps	2	6,71	3,10	6,89	0,002**
Période	1	9,78	9,78	21,75	0,001***
Traitement x Temps	4	5,80	1,06	2,37	0,059
Temps x Période	2	0,89	0,44	1,00	0,372
Traitement x Période	2	3,38	1,69	3,77	0,027
Traitement x Temps x Période	4	1,35	0,33	0,76	0,557
Erreur Résiduelle	90	40,49	0,44		
Totales	107	124,38			

Tableau 11. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de métallothionéines chez les mâles *D. trunculus* en période de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	61,27	30,63	43,35	0,001***
Temps	2	1,62	0,81	1,15	0,326
Phase	1	0,26	0,26	0,38	0,541
Traitement x Temps	4	0,77	0,19	0,27	0,894
Temps x Phase	2	86,44	43,22	61,16	0,001***
Traitement*Phase	2	1,91	0,95	1,36	0,267
Traitement x Temps x Phase	4	28,94	7,23	10,24	0,001***
Erreur Résiduelle	54	38,16	0,70		
Totales	71	219,39			

Tableau 12. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de métallothionéines chez les femelles *D. trunculus* en période de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	35,81	17,90	93,26	0,001***
Temps	2	13,32	6,66	34,71	0,001***
Phase	1	6,25	6,25	32,57	0,001***
Traitement x Temps	4	2,39	0,59	3,12	0,022
Temps x Phase	2	63,00	31,50	164,08	0,001***
Traitement x Phase	2	3,83	1,91	9,98	0,001***
Traitement x Temps x Phase	4	3,11	0,77	4,06	0,006**
Erreur Résiduelle	54	10,16	0,19		
Totales	71	138,11			

Tableau 13. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et sexe) des taux de métallothionéines chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* durant la phase d'exposition.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	32,02	16,01	33,74	0,001***
Temps	2	119,60	59,80	125,99	0,001***
Sexe	1	20,31	20,31	42,79	0,001***
Traitement x Temps	4	20,20	5,05	10,64	0,001***
Temps x Sexe	2	1,07	0,53	1,13	0,330
Traitement x Sexe	2	13,90	1,95	4,12	0,022*
Traitement x Temps x Sexe	4	2,41	0,60	1,27	0,293
Erreur Résiduelle	54	25,63	0,47		
Totales	71	225,17			

Tableau 14. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et sexe) des taux de métallothionéines chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* durant la phase de dépuración.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	66,65	33,32	78,59	0,001***
Temps	2	39,98	19,99	47,14	0,001***
Sexe	1	6,36	6,36	15,01	0,001***
Traitement x Temps	4	7,29	1,82	4,30	0,004**
Temps x Sexe	2	3,73	1,86	4,41	0,017*
Traitement x Sexe	2	0,24	0,12	0,29	0,753
Traitement x Temps x Sexe	4	5,31	1,32	3,13	0,022*
Erreur Résiduelle	54	22,89	0,42		
Totales	71	152,48			

Tableau 15. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des **taux des métallothionéines** chez individus de *D. trunculus* en **phase d'exposition** au Cd lors de la période de **repos et de reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	54,93	26,02	39,37	0,001***
Temps	2	131,59	49,61	75,06	0,001***
Période	1	19,82	19,82	29,99	0,001***
Traitement x Temps	4	34,78	8,26	12,50	0,001***
Temps x Période	2	10,52	5,26	7,96	0,001***
Traitement x Période	2	0,48	0,24	0,37	0,695
Traitement x Temps x Période	4	0,42	0,10	0,16	0,958
Erreur Résiduelle	90	59,49	0,66		
Totales	107	312,60			

Tableau 16. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des **taux des métallothionéines** chez individus de *D. trunculus* en **phase de dépuración** au Cd lors de la période de **repos et de reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	74,17	27,87	53,18	0,001***
Temps	2	80,13	41,41	79,02	0,001***
Période	1	0,01	0,01	0,03	0,852
Traitement x Temps	4	20,95	6,26	11,96	0,001***
Temps x Période	2	7,93	3,96	7,56	0,001***
Traitement x Période	2	3,84	1,92	3,67	0,029*
Traitement x Temps x Période	4	5,98	1,49	2,85	0,028*
Erreur Résiduelle	90	47,16	0,52		
Totales	107	240,20			

Tableau 17. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de glucides chez *D. trunculus* en période de repos sexuel.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	387,18	193,59	37,62	0,001***
Temps	2	40,15	20,07	3,90	0,026*
Phase	1	9,72	9,72	1,89	0,175
Traitement x Temps	4	25,74	6,43	1,25	0,301
Temps x Phase	2	112,03	56,01	10,88	0,001***
Traitement x Phase	2	10,01	5,00	0,97	0,384
Traitement x Temps x Phase	4	188,35	47,08	9,15	0,001***
Erreur Résiduelle	54	277,91	5,14		
Totales	71	1051,12			

Tableau 18. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de lipides chez *D. trunculus* en période de repos sexuel.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	24,41	12,21	7,62	0,001***
Temps	2	29,20	14,60	9,11	0,001***
Phase	1	65,22	65,22	40,71	0,001***
Traitement x Temps	4	5,72	1,43	0,89	0,475
Temps x Phase	2	25,45	12,72	7,94	0,001***
Traitement x Phase	2	6,25	3,13	1,95	0,152
Traitement x Temps x Phase	4	10,08	2,52	1,57	0,195
Erreur Résiduelle	54	86,53	1,60		
Totales	71	252,89			

Tableau 19. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des **taux de protéines** chez *D. trunculus* en **période de repos sexuel**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	307,61	153,80	85,30	0,001***
Temps	2	29,42	14,71	8,16	0,001***
Phase	1	69,91	69,91	38,77	0,001***
Traitement x Temps	4	28,18	7,04	3,91	0,007**
Temps x Phase	2	7,33	3,66	2,03	0,141
Traitement x Phase	2	27,23	13,61	7,55	0,001***
Traitement x Temps x Phase	4	35,55	8,88	4,93	0,002**
Erreur Résiduelle	54	97,36	1,80		
Totales	71	602,63			

Tableau 20. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des **taux de glucides** chez les **mâles** de *D. trunculus* en période de **reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	144,65	72,32	27,49	0,001***
Temps	2	49,86	24,93	9,48	0,001***
Phase	1	25,14	25,14	9,56	0,003**
Traitement x Temps	4	11,28	2,82	1,07	0,379
Temps x Phase	2	258,192	129,09	49,07	0,001***
Traitement x Phase	2	2,12	1,06	0,40	0,670
Traitement x Temps x phase	4	93,86	23,46	8,92	0,001***
Erreur Résiduelle	54	142,07	2,63		
Totales	71	727,20			

Tableau 21. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des **taux de glucides** chez les **femelles** de *D. trunculus* en période de **reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	112,92	56,46	21,22	0,001***
Temps	2	11,63	5,81	2,19	0,122
Phase	1	2,86	2,86	1,08	0,304
Traitement x Temps	4	8,22	2,05	0,77	0,547
Temps x Phase	2	276,69	138,34	52,00	0,001***
Traitement x Phase	2	5,13	12,57	0,97	0,387
Traitement x Temps x phase	4	53,30	13,32	5,01	0,002**
Erreur Résiduelle	54	143,67	2,66		
Totales	71	614,473			

Tableau 22. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et sexe) des **taux de glucides** chez les **mâles et les femelles** de *D. trunculus* en **phase d'exposition** au Cd lors de la période de **reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	145,05	72,53	26,36	0,001***
Temps	2	430,79	215,39	78,28	0,001***
Sexe	1	1057,23	1057,23	384,25	0,001***
Traitement x Temps	4	81,13	20,28	7,37	0,001***
Temps x Sexe	2	3,50	1,75	0,64	0,534
Traitement x Sexe	2	6,08	3,04	1,10	0,339
Traitement x Temps x Sexe	4	6,63	1,66	0,60	0,663
Erreur Résiduelle	54	148,58	2,75		
Totales	71	1878,97			

Tableau 23. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et sexe) des **taux de glucides** chez **les mâles et les femelles** de *D. trunculus* en **phase de restauration** au Cd lors de la période de **reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	112,87	56,43	22,22	0,001***
Temps	2	157,06	78,53	30,91	0,001***
Sexe	1	1284,23	1284,23	505,55	0,001***
Traitement x Temps	4	68,15	17,03	6,71	0,001***
Temps x Sexe	2	5,03	2,51	0,99	0,378
Traitement x Sexe	2	0,84	0,42	0,17	0,848
Traitement x Temps x Sexe	4	10,77	2,69	1,06	0,385
Erreur Résiduelle	54	137,17	2,54		
Totales	71	1776,149			

Tableau 24. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des **taux de glucides** chez **les mâles et les femelles** de *D. trunculus* en **phase d'exposition** au Cd lors de la période de **repos et de reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	302,62	160,04	10,74	0,001***
Temps	2	536,96	217,67	14,61	0,001***
Période	1	14864,97	14864,97	997,78	0,001***
Traitement x Temps	4	187,46	51,61	3,46	0,011*
Temps x Période	2	19,73	9,86	0,66	0,518
Traitement x Période	2	39,86	19,93	1,34	0,268
Traitement x Temps x Période	4	31,70	7,93	0,53	0,713
Erreur Résiduelle	90	1340,82	14,90		
Totales	107	17324,12			

Tableau 25. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des **taux de glucides** chez les individus de *D. trunculus* en **phase de dépuration** au Cd lors de la période de repos et de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	283,24	156,11	8,80	0,001***
Temps	2	154,04	55,22	3,11	0,049*
Période	1	14931,41	14931,41	841,38	0,001***
Traitement x Temps	4	124,09	31,68	1,79	0,139
Temps x Période	2	29,31	14,65	0,83	0,441
Traitement x Période	2	29,40	14,70	0,83	0,440
Traitement x Temps x Période	4	20,13	5,03	0,28	0,888
Erreur Résiduelle	90	1597,17	17,75		
Totales	107	17168,79			

Tableau 26. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des **taux de lipides** chez les mâles de *D. trunculus* en **période de reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	1,61	0,80	1,48	0,238
Temps	2	4,79	2,39	4,37	0,017*
Phase	1	1,15	1,15	2,10	0,153
Traitement x Temps	4	5,55	1,38	2,53	0,051
Temps x Phase	2	21,03	10,51	19,18	0,001***
Traitement x Phase	2	0,04	0,02	0,04	0,958
Traitement x Temps x Phase	4	2,05	0,51	0,94	0,450
Erreur Résiduelle	54	29,61	0,54		
Totales	71	65,86			

Tableau 27. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de lipides chez les femelles de *D. trunculus* en période de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	43,43	21,71	40,48	0,001***
Temps	2	24,67	12,33	23,00	0,001***
Phase	1	31,41	31,41	58,56	0,001***
Traitement x Temps	4	2,95	0,79	1,38	0,254
Temps x Phase	2	11,19	5,59	10,43	0,001***
Traitement x Phase	2	6,84	3,42	6,38	0,003**
Traitement x Temps x Phase	4	8,75	2,18	4,08	0,006**
Erreur Résiduelle	54	29,61	0,53		
Totales	71	158,24			

Tableau 28. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et sexe) des taux de lipides chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* en phase d'exposition au Cd lors de la période de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	7,02	3,51	7,60	0,001***
Temps	2	46,71	23,35	50,57	0,001***
Sexe	1	3,13	3,13	6,78	0,012*
Traitement x Temps	4	6,75	1,68	3,65	0,010*
Temps x Sexe	2	0,61	0,30	0,67	0,518
Traitement x Sexe	2	2,60	1,30	2,82	0,068
Traitement x Temps x Sexe	4	4,43	1,10	2,40	0,061
Erreur Résiduelle	54	24,94	0,46		
Totales	71	96,22			

Tableau 29. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et sexe) des **taux de lipides chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* en phase de dépuración** au Cd lors de la période de **reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	27,39	13,69	21,99	0,001***
Temps	2	8,36	4,18	6,72	0,002**
Sexe	1	7,63	7,63	12,25	0,001***
Traitement x Temps	4	4,45	1,11	1,79	0,145
Temps x Sexe	2	5,99	2,99	4,81	0,012*
Traitement x Sexe	2	14,92	7,46	11,98	0,001***
Traitement x Temps x Sexe	4	3,68	0,92	1,48	0,222
Erreur Résiduelle	54	33,63	0,62		
Totales	71	106,08			

Tableau 30. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des **taux de lipides chez individus de *D. trunculus* en phase d'exposition** au Cd lors de la période de **repos et de reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	12,44	6,40	8,85	0,001***
Temps	2	64,81	33,44	46,23	0,001***
Période	1	653,12	653,12	902,88	0,001***
Traitement x Temps	4	13,55	3,60	4,98	0,001***
Temps x Période	2	34,83	17,41	24,08	0,001***
Traitement x Période	2	2,67	1,33	1,85	0,163
Traitement x Temps x Période	4	2,50	0,62	0,86	0,489
Erreur Résiduelle	90	65,10	0,72		
Totales	107	849,05			

Tableau 31. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des **taux de lipides** chez individus de *D. trunculus* en **phase de dépuración** au Cd lors de la période de repos et de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	48,65	23,52	17,21	0,001***
Temps	2	6,19	1,99	1,46	0,238
Période	1	403,44	403,44	295,14	0,001***
Traitement x Temps	4	8,35	2,25	1,65	0,168
Temps x Période	2	3,89	1,94	1,42	0,246
Traitement x Période	2	1,32	0,66	0,48	0,618
Traitement x Temps x Période	4	2,60	0,65	0,48	0,753
Erreur Résiduelle	90	123,02	1,36		
Totales	107	597,48			

Tableau 32. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des **taux de protéines** chez les mâles de *D. trunculus* en **période de reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	70,51	35,25	67,47	0,001***
Temps	2	16,98	8,49	16,25	0,001***
Phase	1	11,35	11,35	21,73	0,001***
Traitement x Temps	4	5,82	1,45	2,79	0,035*
Temps x Phase	2	41,70	20,85	39,90	0,001***
Traitement x Phase	2	3,73	1,86	3,57	0,035*
Traitement x Temps x Phase	4	10,61	2,65	5,08	0,002**
Erreur Résiduelle	54	28,21	0,52		
Totales	71	188,93			

Tableau 33. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des **taux de protéines** chez les **femelles** de *D. trunculus* en **période de reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	102,47	51,23	36,78	0,001***
Temps	2	55,38	27,69	19,88	0,001***
Phase	1	20,09	20,09	14,43	0,001***
Traitement x Temps	4	5,19	1,29	0,93	0,452
Temps x Phase	2	110,13	55,06	39,53	0,001***
Traitement x Phase	2	1,46	0,73	0,53	0,594
Traitement x Temps x Phase	4	27,07	6,76	4,86	0,002**
Erreur Résiduelle	54	75,23	1,39		
Totales	71	397,07			

Tableau 34. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et sexe) des **taux de protéines** chez les **mâles et les femelles** de *D. trunculus* en **phase d'exposition** au Cd lors de la période de **reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	62,98	31,49	37,15	0,001***
Temps	2	161,93	80,96	95,51	0,001***
Sexe	1	207,33	207,33	244,57	0,001***
Traitement x Temps	4	33,63	8,41	9,92	0,001***
Temps x Sexe	2	12,63	6,31	7,45	0,001***
Traitement x Sexe	2	2,46	1,23	1,45	0,243
Traitement x Temps x Sexe	4	2,01	0,50	0,59	0,668
Erreur Résiduelle	54	45,77	0,84		
Totales	71	528,78			

Tableau 35. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et sexe) des **taux de protéines chez les mâles et les femelles** de *D. trunculus* en **phase de restauration** au Cd lors de la période de **reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	100,57	50,02	46,84	0,001***
Temps	2	22,55	11,27	10,56	0,001***
Sexe	1	176,50	176,50	165,25	0,001***
Traitement x Temps	4	9,74	2,43	2,28	0,072
Temps x Sexe	2	27,08	13,54	12,68	0,001***
Traitement x Sexe	2	12,67	6,34	5,94	0,005**
Traitement x Temps x Sexe	4	3,30	0,82	0,77	0,548
Erreur Résiduelle	54	57,67	1,06		
Totales	71	409,60			

Tableau 36. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des **taux des protéines** chez individus de *D. trunculus* en **phase de d'exposition** au Cd lors de la période de **repos et de reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	16,63	10,51	3,05	0,052
Temps	2	63,74	9,11	2,64	0,077
Période	1	479,24	479,24	138,96	0,001***
Traitement x Temps	4	12,39	4,73	1,37	0,249
Temps x Période	2	123,60	61,80	17,92	0,001***
Traitement x Période	2	122,56	61,28	17,77	0,001***
Traitement x Temps x Période	4	74,52	18,63	5,40	0,001***
Erreur Résiduelle	90	310,38	3,44		
Totales	107	1203,09			

Tableau 37. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des taux des protéines chez individus de *D. trunculus* en **phase de dépuración** au Cd lors de la période de repos et de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	36,42	44,64	12,01	0,001***
Temps	2	33,28	14,77	3,98	0,022*
Période	1	1301,79	1301,79	350,31	0,001***
Traitement x Temps	4	11,86	3,02	0,81	0,520
Temps x Période	2	0,62	0,31	0,08	0,920
Traitement x Période	2	322,29	161,14	43,36	0,001***
Traitement x Temps x Période	4	8,33	2,08	0,56	0,692
Erreur Résiduelle	90	334,45	3,72		
Totales	107	2049,04			

Tableau 38. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'EPA chez les individus de *D. trunculus* en période de repos sexuel.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	2,62	1,31	15,21	0,001***
Temps	1	0,41	0,41	4,86	0,034*
Phase	1	0,00	0,00	0,08	0,775
Traitement x Temps	2	0,56	0,28	3,29	0,049*
Temps x Phase	1	0,41	0,41	4,86	0,034*
Traitement x Phase	2	0,12	0,06	0,71	0,500
Traitement x Temps x Phase	2	0,56	0,28	3,29	0,049*
Erreur Résiduelle	36	3,10	0,08		
Totales	47	7,83			

Tableau 39. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de DHA chez les individus de *D. trunculus* en période de repos sexuel.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	6,75	3,37	11,76	0,001***
Temps	1	2,08	2,08	7,27	0,011*
Phase	1	2,08	2,08	7,27	0,011*
Traitement x Temps	2	0,77	0,38	1,35	0,271
Temps x Phase	1	10,07	10,07	35,07	0,001***
Traitement x Phase	2	0,77	0,38	1,35	0,271
Traitement x Temps x Phase	2	0,85	0,42	1,49	0,238
Erreur Résiduelle	36	10,34	0,28		
Totales	47	33,75			

Tableau 40. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'EPA chez les mâles de *D. trunculus* en période de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	0,06	0,03	12,66	0,001***
Temps	1	0,01	0,01	2,53	0,120
Phase	1	0,01	0,01	2,53	0,120
Traitement x Temps	2	0,01	0,01	1,61	0,214
Temps x Phase	1	0,04	0,04	16,17	0,001***
Traitement x Phase	2	0,01	0,01	1,61	0,214
Traitement x Temps x Phase	2	0,01	0,01	3,12	0,056
Erreur Résiduelle	36	0,08	0,01		
Totales	47	0,23			

Tableau 41. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'EPA chez les femelles de *D. trunculus* en période de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	0,12	0,06	11,51	0,001***
Temps	1	0,01	0,01	2,70	0,109
Phase	1	0,01	0,01	2,70	0,109
Traitement x Temps	2	0,01	0,01	0,78	0,466
Temps x Phase	1	0,10	0,10	18,55	0,001***
Traitement x Phase	2	0,01	0,01	0,78	0,466
Traitement x Temps x Phase	2	0,02	0,01	2,70	0,081
Erreur Résiduelle	36	0,19	0,01		
Totales	47	0,49			

Tableau 42. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et sexe) des taux d'EPA chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* durant la phase d'exposition.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	0,04	0,02	9,58	0,001***
Temps	1	0,02	0,02	10,15	0,003**
Sexe	1	0,09	0,09	36,28	0,001***
Traitement x Temps	2	0,04	0,02	9,68	0,001***
Temps x Sexe	1	0,01	0,01	0,57	0,456
Traitement x Sexe	2	0,01	0,01	0,38	0,690
Traitement x Temps x Sexe	2	0,01	0,01	0,38	0,690
Erreur Résiduelle	36	0,08	0,01		
Totales	47	0,30			

Tableau 43. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et sexe) des taux d'EPA chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* durant la **phase de dépuración**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	0,14	0,07	13,45	0,001***
Temps	1	0,12	0,12	23,75	0,001***
Sexe	1	0,11	0,11	21,51	0,001***
Traitement x Temps	2	0,10	0,10	0,83	0,445
Temps x Sexe	1	0,10	0,10	1,16	0,289
Traitement x Sexe	2	0,10	0,10	0,76	0,475
Traitement x Temps x Sexe	2	0,10	0,10	0,21	0,808
Erreur Résiduelle	36	0,19	0,10		
Totales	47	0,61			

Tableau 44. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des taux d'EPA chez individus de *D. trunculus* en **phase d'exposition** au Cd lors de la période de **repos et de reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	0,60	0,48	16,94	0,001***
Temps	1	0,43	0,70	24,60	0,001***
Période	1	26,40	26,40	921,86	0,001***
Traitement x Temps	2	0,60	0,48	16,94	0,001***
Temps x Période	1	0,43	0,43	15,03	0,001***
Traitement x Période	2	0,57	0,28	10,03	0,001***
Traitement x Temps x Période	2	0,57	0,28	10,03	0,001***
Erreur Résiduelle	60	1,71	0,02		
Totales	71	31,35			

Tableau 45. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des taux d'EPA chez individus de *D. trunculus* en **phase de dépuración** au Cd lors de la période de **repos et de reproduction**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	1,09	0,78	24,89	0,001***
Temps	1	0,08	0,04	1,36	0,249
Période	1	26,22	26,22	826,51	0,001***
Traitement x Temps	2	0,01	0,01	0,05	0,954
Temps x Période	1	0,04	0,04	1,36	0,249
Traitement x Période	2	0,67	0,33	10,56	0,001***
Traitement x Temps x Période	2	0,01	0,01	0,05	0,954
Erreur Résiduelle	60	1,90	0,03		
Totales	71	30,02			

Tableau 46. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de DHA chez les mâles de *D. trunculus* durant la **période de reproduction**

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	0,12	00,06	2,81	0,073
Temps	1	0,22	0,22	9,78	0,003**
Phase	1	0,22	0,22	9,78	0,003**
Traitement x Temps	2	0,01	0,01	0,16	0,850
Temps x Phase	1	0,60	0,60	26,52	0,001***
Traitement x Phase	2	0,01	0,10	0,16	0,850
Traitement x Temps x Phase	2	0,24	0,12	5,37	0,009**
Erreur Résiduelle	36	0,82	0,02		
Totales	47	2,27			

Tableau 47. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux de DHA chez les femelles de *D. trunculus* durant la **période de reproduction**

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	0,65	0,32	7,43	0,002**
Temps	1	3,16	3,16	71,87	0,001***
Phase	1	3,16	3,16	71,87	0,001***
Traitement x Temps	2	0,01	0,01	0,09	0,912
Temps x Phase	1	4,95	4,95	112,59	0,001***
Traitement x Phase	2	0,01	0,1	0,09	0,912
Traitement x Temps x Phase	2	0,39	0,19	4,50	0,018*
Erreur Résiduelle	36	1,58	0,04		
Totales	47	13,92			

Tableau 48. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et sexe) des taux de DHA chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* durant la **phase d'exposition**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	0,30	0,15	17,16	0,001***
Temps	1	0,14	0,14	15,83	0,001***
Sexe	1	0,97	0,97	108,39	0,001***
Traitement x Temps	2	0,30	0,15	17,16	0,001***
Temps x Sexe	1	0,01	0,01	0,56	0,460
Traitement x Sexe	2	0,04	0,02	2,27	0,118
Traitement x Temps x Sexe	2	0,04	0,02	2,27	0,118
Erreur Résiduelle	36	0,32	0,01		
Totales	47	2,13			

Tableau 49. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et sexe) des taux de DHA chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* durant la phase de dépuración.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	0,36	0,18	3,11	0,057
Temps	1	6,90	6,90	119,24	0,001***
Sexe	1	5,24	5,24	90,56	0,001***
Traitement x Temps	2	0,27	0,13	2,33	0,112
Temps x Sexe	1	1,89	1,89	32,66	0,001***
Traitement x Sexe	2	0,08	0,04	0,77	0,470
Traitement x Temps x Sexe	2	0,03	0,01	0,34	0,713
Erreur Résiduelle	36	2,08	0,05		
Totales	47	16,89			

Tableau 50. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des taux de DHA chez individus de *D. trunculus* en phase d'exposition au Cd lors de la période de repos et de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	1,26	0,83	6,60	0,003**
Temps	1	4,81	8,31	65,69	0,001***
Période	1	30,81	30,81	243,32	0,001***
Traitement x Temps	2	1,26	0,83	6,60	0,003**
Temps x Période	1	5,99	5,99	47,37	0,001***
Traitement x Période	2	0,55	0,27	2,18	0,122
Traitement x Temps x Période	2	0,55	0,27	2,18	0,122
Erreur Résiduelle	60	7,59	0,12		
Totales	71	52,86			

Tableau 51. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des taux de DHA chez individus de *D. trunculus* en **phase de dépuracion** au Cd lors de la période de repos et de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	3,59	2,73	12,19	0,001***
Temps	1	8,13	6,32	28,18	0,001***
Période	1	6,66	6,66	29,69	0,001***
Traitement x Temps	2	0,12	0,03	0,17	0,840
Temps x Période	1	0,26	0,26	1,20	0,278
Traitement x Période	2	2,78	1,39	6,20	0,004**
Traitement x Temps x Période	2	0,26	0,13	0,59	0,560
Erreur Résiduelle	60	13,47	0,22		
Totales	71	35,32			

Tableau 52. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'ARN chez *D. trunculus* en **période de repos sexuel**.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	27,51	13,75	28,77	0,001***
Temps	2	14,14	7,07	14,80	0,001***
Phase	1	17,82	17,82	37,28	0,001***
Traitement x Temps	4	3,38	0,84	1,77	0,145
Temps x Phase	2	11,75	5,87	12,29	0,001***
Traitement x Phase	2	12,01	6,00	12,56	0,001***
Traitement x Temps x Phase	4	0,12	0,03	0,06	0,992
Erreur Résiduelle	72	34,42	0,47		
Totales	89	121,77			

Tableau 53. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'ADN chez *D. trunculus* en période de repos sexuel.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	2,60	1,30	2,04	0,137
Temps	2	0,99	0,49	0,78	0,463
Phase	1	0,30	0,30	0,48	0,492
Traitement x Temps	4	0,61	0,15	0,24	0,914
Temps x Phase	2	8,20	4,10	6,42	0,003
Traitement x Phase	2	1,02	0,51	0,80	0,452
Traitement x Temps x Phase	4	1,95	0,48	0,77	0,550
Erreur Résiduelle	72	45,97	0,63		
Totales	89	61,68			

Tableau 54. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'ARN chez les mâles de *D. trunculus* en période de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	50,93	25,46	50,07	0,001***
Temps	2	12,34	6,17	12,14	0,001***
Phase	1	4,23	4,23	8,33	0,005**
Traitement x Temps	4	9,89	2,47	4,8	0,002**
Temps x Phase	2	5,30	2,65	5,22	0,008**
Traitement x Phase	2	1,10	0,55	1,09	0,342
Traitement x Temps x Phase	4	7,55	1,88	3,72	0,008**
Erreur Résiduelle	72	36,62	0,50		
Totales	89	128,00			

Tableau 55. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'ARN chez les femelles de *D. trunculus* en période de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	32,15	16,07	33,68	0,001***
Temps	2	17,80	8,90	18,65	0,001***
Phase	1	26,54	26,54	55,61	0,001***
Traitement x Temps	4	3,30	0,82	1,73	0,153
Temps x Phase	2	2,39	1,19	2,51	0,088
Traitement x Phase	2	5,64	2,82	2,91	0,004**
Traitement x Temps x Phase	4	10,36	0,59	5,43	0,001***
Erreur Résiduelle	72	34,37	0,47		
Totales	89	132,58			

Tableau 56. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'ARN chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* en période de reproduction durant la phase d'exposition.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	23,12	11,56	26,84	0,001***
Temps	2	28,63	14,31	33,23	0,001***
Sexe	1	347,03	347,03	805,49	0,001***
Traitement x Temps	4	12,16	3,04	7,06	0,001***
Temps x Sexe	2	2,78	1,39	3,23	0,045*
Traitement x Sexe	2	1,72	0,86	2,01	0,142
Traitement x Temps x Sexe	4	3,72	0,93	2,16	0,082
Erreur Résiduelle	72	31,02	0,43		
Totales	89	450,22			

Tableau 57. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'ARN chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* en période de reproduction durant la phase de déuration.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	62,39	31,19	56,19	0,001***
Temps	2	3,48	1,74	3,14	0,049*
Sexe	1	241,34	241,34	434,70	0,001***
Traitement x Temps	4	13,14	3,28	5,92	0,001***
Temps x Sexe	2	2,94	1,47	2,65	0,077
Traitement x Sexe	2	2,59	1,29	2,33	0,104
Traitement x Temps x Sexe	4	2,08	0,52	0,94	0,447
Erreur Résiduelle	72	39,97	0,55		
Totales	89	367,95			

Tableau 58. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des taux d'ARN chez individus de *D. trunculus* en phase d'exposition au Cd lors de la période de repos et de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	18,64	5,80	1,68	0,192
Temps	2	50,38	24,55	7,09	0,001***
Période	1	663,23	663,23	191,51	0,001***
Traitement x Temps	4	10,33	1,71	0,49	0,740
Temps x Période	2	3,09	1,54	0,45	0,641
Traitement x Période	2	6,48	3,24	0,94	0,395
Traitement x Temps x Période	4	3,49	0,87	0,25	0,908
Erreur Résiduelle	117	405,18	3,46		
Totales	134	1160,84			

Tableau 59. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des taux d'ARN chez individus de *D. trunculus* en **phase de dépuration** au Cd lors de la période de **repos** et de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	94,34	43,03	16,54	0,001***
Temps	2	1,53	0,36	0,14	0,870
Période	1	700,38	700,82	269,13	0,001***
Traitement x Temps	4	6,46	0,67	0,26	0,904
Temps x Période	2	3,01	1,50	0,58	0,562
Traitement x Période	2	5,57	2,78	1,07	0,346
Traitement x Temps x Période	4	8,51	2,12	0,82	0,516
Erreur Résiduelle	117	304,47	2,60		
Totales	134	1124,31			

Tableau 60. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'ADN chez les mâles de *D. trunculus* en période de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	23,79	11,89	1,91	0,155
Temps	2	11,81	5,90	0,95	0,392
Phase	1	2,82	2,82	0,45	0,503
Traitement x Temps	4	22,84	5,71	0,92	0,458
Temps x Phase	2	43,60	21,80	3,50	0,035
Traitement x Phase	2	15,76	7,88	1,27	0,288
Traitement x Temps x Phase	4	56,73	14,18	2,28	0,069
Erreur Résiduelle	72	448,03	6,22		
Totales	89	625,41			

Tableau 61. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'ADN chez les femelles de *D. trunculus* en période de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	237,86	118,93	17,49	0,001***
Temps	2	44,17	22,08	3,25	0,045*
Phase	1	40,66	40,66	5,98	0,017*
Traitement x Temps	4	39,87	9,96	1,47	0,222
Temps x Phase	2	51,86	25,93	3,81	0,027*
Traitement x Phase	2	26,25	13,12	1,93	0,152
Traitement x Temps x Phase	4	87,53	21,88	3,22	0,017
Erreur Résiduelle	72	489,66	6,80		
Totales	89	1017,84			

Tableau 62. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'ADN chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* en période de reproduction durant la phase d'exposition.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	84,68	42,34	5,72	0,005**
Temps	2	113,82	56,91	7,69	0,001***
Sexe	1	4937,28	4937,28	667,58	0,001***
Traitement x Temps	4	77,65	19,41	2,62	0,042*
Temps x Sexe	2	11,37	5,69	0,77	0,467
Traitement x Sexe	2	16,24	8,12	1,10	0,339
Traitement x Temps x Sexe	4	19,42	4,86	0,66	0,624
Erreur Résiduelle	72	532,50	7,40		
Totales	89	5792,97			

Tableau 63. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et phase) des taux d'ADN chez les mâles et les femelles de *D. trunculus* en période de reproduction durant la phase de déuration.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	117,28	58,64	10,42	0,001***
Temps	2	19,98	9,99	1,78	0,177
Sexe	1	5619,59	56,19	998,70	0,001***
Traitement x Temps	4	92,19	23,05	4,10	0,005**
Temps x Sexe	2	6,27	3,13	0,56	0,575
Traitement x Sexe	2	85,49	42,74	7,60	0,001***
Traitement x Temps x Sexe	4	17,73	4,43	0,79	0,537
Erreur Résiduelle	72	405,14	5,63		
Totales	89	6363,66			

Tableau 64. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des taux d'ADN chez individus de *D. trunculus* en phase d'exposition au Cd lors de la période de repos et de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	60,02	16,01	0,34	0,714
Temps	2	103,49	33,94	0,72	0,491
Période	1	8090,46	8090,46	170,74	0,001***
Traitement x Temps	4	48,42	5,80	0,12	0,974
Temps x Période	2	17,33	8,67	0,18	0,833
Traitement x Période	2	25,30	12,65	0,27	0,766
Traitement x Temps x Période	4	31,28	7,82	0,17	0,956
Erreur Résiduelle	117	5544,00	47,38		
Totales	134	13920,31			

Tableau 65. Analyse de la variance à trois critères de classification (traitement, temps et période) des taux d'ADN chez individus de *D. trunculus* en **phase de dépuración** au Cd lors de la période de **repos** et de reproduction.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	2	94,01	27,96	0,53	0,589
Temps	2	20,07	7,07	0,13	0,874
Période	1	7384,55	7384,55	140,42	0,001***
Traitement x Temps	4	66,78	9,05	0,17	0,952
Temps x Période	2	2,12	1,06	0,02	0,980
Traitement x Période	2	26,25	13,13	0,25	0,780
Traitement x Temps x Période	4	25,94	6,49	0,12	0,974
Erreur Résiduelle	117	6153,00	52,59		
Totales	134	13772,72			

Annexe 2: Valorisation scientifique

Publications catégorie (A) (02):

MERAD I., BAIRI Y., SIFI K. & SOLTANI N., 2016. Protein carbonyls as biomarkers of oxidative stress induced by cadmium in *Donax trunculus*: gonad contents during exposure and recovery. *Fresenius Environmental Bulletin*, **25(12a)**: 5889-5895.

MERAD I., BELLENGER S., HICHAMI A., KHAN NA. & SOLTANI N., 2017. Effect of cadmium exposure on essential omega 3 fatty acids in the edible bivalve *Donax trunculus*. *Environmental Science and Pollution Research*, DOI 10.1007/s11356-017-9031-4.

Publications catégorie (B) (01):

MERAD I. & SOLTANI N., 2017. Sublethal effects of cadmium on energy reserves in the edible Mollusk *Donax trunculus*. *Entomology and Zoology Studies*, **5(1)**: 100-105.

Publications catégorie (C) (05):

MERAD I., BELABED S. & SOLTANI N., 2013. Toxicité aigüe du cadmium chez *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia): Potentiel de dépuration en période de reproduction. Acte de la 4^{ème} édition du congrès International Eau, Déchet, Environnement (EDE4), Agadir (Maroc), 88-90.

MERAD I., RABEI A. & SOLTANI N., 2014. Réponse de la métallothionéine au cours de l'exposition au cadmium et la restauration. *Bulletin de l'Institut National des Sciences de la Mer (INSTM Salammbô)*. Numéro spécial (18). Actes du IX^{ème} Congrès Maghrébin des Sciences de la Mer, Sousse (Tunisie), 102-106.

MERAD I. & SOLTANI N. 2015. Environmental risks of cadmium on *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia): sublethal effect on nucleic acid contents of gonads. In: Proceeding of INOC- International Congress "Estuaries & Coastal Protected Areas"(ECPA), 04 - 06 November 2014, Izmir (Turkey), pp. 260-267.

MERAD I., BELLENGER S., HICHAMI A., KHAN NA. & SOLTANI N., 2016. Effect of cadmium exposure on essential omega 3 fatty acids in the edible bivalve *Donax trunculus*. Proceedings of the 2nd ICIEM 2016, International Conference on Integrated Environmental Management for Sustainable Development (Sousse, Tunisia, 27-30 October 2016), Volume 3: Environmental and Health Risk Assessment. Edited by Boubakker Elleuch, pp. 385-386. ISSN 1737-3638.

SOLTANI N. & MERAD I., 2016. Risk assessment of cadmium in an edible mollusk *Donax trunculus*: effect of acute exposure on protein carbonyls. Proceedings of the 2nd ICIEM 2016, International Conference on Integrated Environmental Management for Sustainable Development (Sousse, Tunisia, 27-30 October 2016), Volume 3: Environmental and Health Risk Assessment. Edited by Boubakker Elleuch, pp. 61-68. ISSN 1737-3638.

Communication internationale (12)

MERAD I., BELABED S. & SOLTANI N., 2012. Effet subléthal du cadmium sur la biochimie des gonades de *Donax trunculus*. L en période de reproduction: variation au cours de l'exposition et de la dépuration. Les Quatorzièmes Journées Tunisiennes Des Sciences De La Mer (ATSMer), Sousse (Tunisie), 15-18 Décembre 2012 (**Communication orale**).

MERAD I. & SOLTANI N., 2013. Toxicité aigüe du Cadmium chez *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) : Paramètres de létalité et impact subléthal sur la composition biochimique des gonades en période de reproduction. 4^{ème} édition du congrès international eau, déchet, environnement (EDE4), Agadir (Maroc), 18-20 Décembre 2013 (**Communication affichée**).

MERAD I., BELABED S. & SOLTANI N., 2013. Toxicité aigüe du Cadmium chez *Donax trunculus* L.

(Mollusca, Bivalvia) : potentiel de dépuración en période de restauration. 4^{ème} édition du congrès international eau, déchet, environnement (EDE4), Agadir (Maroc), 18-20 Décembre 2013 (**Communication affichée**).

MERAD I. & SOLTANI N., 2014. Effet sublétaI du cadmium chez *Donax trunculus* L. en période de reproduction : Variations des acides nucléiques au cours de l'exposition et de l'épuration. II^{ème} congrès international de biotechnologie et valorisation des Bio-ressources (BVBR), Tabarka (Tunisie), 18-20 Mars 2014 (**Communication Orale**).

MERAD I. & SOLTANI N., 2014. Environmental risks of cadmium on *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia): Sublethal effect on nucleic acid contents of gonads. International Congress On "Estuaries & Coastal Protected Areas (ECPA), Izmir (Turquie), 04-06 Novembre 2014 (**Communication Orale**).

MERAD I., RABEÏ A. & SOLTANI N., 2014. Réponse des métallothionéines au cours de l'exposition au cadmium et la restauration chez *Donax trunculus*. **IX^{ème} Congrès Maghrébin des Sciences de la Mer**, Sousse (Tunisie), 21-24 Décembre 2014 (**Communication Affichée**).

MERAD I. & SOLTANI N., 2015. Réserves énergétiques chez *Donax trunculus* en corrélation avec le cycle sexuel. Séminaire International de Biotechnologie, Constantine (Algérie), 19-21 Octobre 2015 (**Communication Orale**).

RABEÏ A., MERAD I. & SOLTANI N., 2015. Toxicité aigüe du Cadmium chez *Donax trunculus* (Bivalvia, Donacidae): Réponse des métallothionéines en fonction de l'activité sexuelle. 1^{er} Colloque International de la Biologie Appliquée, Oran (Algérie), 29 Novembre au 1^{er} Décembre 2015 (**Communication Affichée**).

MERAD I., BAIRI Y. SIFI K & SOLTANI N., 2016. Effet sublétaI du Cadmium sur les protéines carbonylées gonadiques de *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) : Exposition et restauration. Sixième Colloque International Sciences & Environnement, 21-23 Mars 2016 (**Communication Orale**).

MERAD I., BELLENGER S., HICHAMI A., KHAN NA. & SOLTANI N., 2016. Effect of cadmium exposure on essential omega 3 fatty acids in the edible bivalve *Donax trunculus*. International Conference on Integrated Environmental Management for Sustainable Development (2nd ICIEM 2016), Sousse, Tunisia, 27-30 October 2016 (**Communication Affichée**).

SOLTANI N. & MERAD I., 2016. Risk assessment of cadmium in an edible mollusk *Donax trunculus*: effect of acute exposure on protein carbonyls. International Conference on Integrated Environmental Management for Sustainable Development (2nd ICIEM 2016), Sousse, Tunisia, 27-30 October 2016 (**Communication Orale**).

MERAD I., NANTON A., PEREZ J., MENDEZ J. & SOLTANI N., 2016. Molecular identification of *Donax* species from the gulf of Annaba (Northeast Algeria): impact of pollution on distribution of species. 10th Maghrebian Conference on Marine Sciences 5th France-Maghreb Congress of Zoology & Ichthyology on the 8th -10th of December 2016 in Fèz (Morocco) (**Communication Orale**).

Communication nationale (3)

MERAD I. & SOLTANI N., 2013. Paramètres de létalité du cadmium chez les mâles et les femelles de *Donax trunculus* L. et effet sur les protéines gonadiques en période de reproduction. Journée scientifique sur l'environnement, Guelma (Algérie), 26 Novembre 2013 (**Communication orale**).

MERAD I., RABEÏ A. & SOLTANI N., 2014. Réponse de l'expression de la métallothionéine au cadmium dans la glande digestive de *Donax trunculus*. 1er Séminaire National sur la Santé et Bio-Surveillance des Ecosystèmes Aquatiques (SBSEA), Souk Ahras, 26-27 Novembre 2014 (**Communication Orale**).

MERAD I., BAIRI Y., SIFI K & SOLTANI N., 2016. Détermination des protéines carbonylées chez *Donax trunculus* après une exposition aigüe au cadmium durant le repos sexuel: exposition et potentiel de restauration. Environnement Risque et Santé, Ahras, 6-7 Decembre 2016 (**Communication Affichée**).

Tâches pédagogiques

Chargée de TP de Biologie cellulaire (1ère année tronc commun).

Chargée de TD de Biologie cellulaire (1ère année tronc commun).

Assistante encadrement Master 2 Physiotoxicologie Animale.



PROTEIN CARBONYLS AS BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS INDUCED BY CADMIUM IN *DONAX TRUNCULUS*: GONAD CONTENTS DURING EXPOSURE AND RECOVERY

Isma Merad, Yousra Bairi, Karima Sifi, Nouredine Soltani*

Laboratory of Applied Animal Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University Badji-Mokhtar of Annaba
23000-Annaba, Algeria

ABSTRACT

Induction of protein carbonyls (PC) are widely used as a biomarker of exposure to anthropogenic contaminants. The aim of the present study was to examine the sub-lethal effects of cadmium (LC₁₀ and LC₂₅- 96h) on gonad protein carbonyl contents in *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) males and females during the reproduction period, and to evaluate the recovery pattern of this Mollusk species. The samples were collected at El Battah, a site far from any source of pollution. The determination of PC contents in gonads was carried out at different times during the exposure (0, 48, and 96h) and the depuration period (4 days). Data subjected to a multivariate analysis of variance revealed significant effects of concentration, time and sex during the exposure period. The individuals exposed to the two concentrations and then transferred to untreated water, recovered their normal PC values after 2 day for the LC₁₀ and LC₂₅, except for the highest concentration of cadmium (LC₂₅) in females. The overall data indicated that protein carbonyls have potential for use as biomarkers of oxidative stress and *D. trunculus* was able to overcome relatively rapidly the stress induced by cadmium. In this species, the males restore more rapidly their normal status than the females. The difference in the responses observed between the sex of this species are discussed.

KEYWORDS:

Cadmium, *Donax trunculus*, Protein carbonyls, Exposure, Recovery, Reproduction.

INTRODUCTION

Pollution of the aquatic ecosystems is a serious and growing problem. Increasing number and amount of industrial, agricultural and commercial chemicals discharged into the aquatic environment have led to various deleterious effects on the aquatic organisms [1]. Heavy metals constitute a core group of aquatic pollutants due to their bioaccumulation

and non-biodegradable properties. Their excessive contamination of aquatic ecosystems has caused major environmental and health concerns worldwide [2]. Cadmium (Cd), a toxic and nonessential element, is frequently used in electroplating, pigments, paints, welding, and batteries, which results in both biotic and abiotic environments [3, 4]. Cd has been found to produce wide ranges of biochemical and physiological dysfunctions in humans and laboratory animals [5] and is toxic at low concentration for aquatic organisms, due to the bioavailability of its free ionic form [6].

The effects induced by Cd have been well documented specially in bivalve mollusks; it can inhibit ADP-stimulated respiration [7], or decreased the condition index and depressed growth [8]. This metal presented an embryotoxic and neurotoxic activity and induced an oxidative stress [9, 10]. Lastly, it can interfere with the reproduction [11, 12] via a modification of the biochemical composition of gonads [13]. The gulf of Annaba, the most important touristic and economic coastal zone located in Northeast Algeria, is contaminated by several pollutants from urban, agricultural, harbor and industrial activities [14, 15]. Elevated levels of heavy metals (Cu, Zn, Pb, Cd) were detected in a locally prevalent edible mollusk *Donax trunculus* [15]. This species has been widely used as a sentinel species for the assessment of marine pollution [16-19] through the direct measurement of several biomarkers, such as malondialdehyde (MDA), lactate dehydrogenase (LDH), acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), and catalase (CAT) [20].

Induction of protein carbonyls (PC) are widely used as a biomarker of exposure to anthropogenic contaminants [21]. For environmental risk assessment, a comprehensive understanding on adaptation and/or a recovery is important [22]. Therefore, the present study was carried out to test the impact of cadmium applied at two sub-lethal concentrations (LC₁₀ and LC₂₅- 96h) on protein carbonyls used as biomarkers of oxidative stress in the gonads of this edible species *D. trunculus*. The protein carbonyl contents were determined in male and females during the reproductive period. The ability of this Mollusk species to overcome the stress

induced by this heavy metal was also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Animal rearing. The experiments were carried out in March, 2015. Adults of *D. trunculus* (shell length 25 ± 2 mm) were sampled at El-Battah beach ($36^{\circ} 50' N - 7^{\circ} 50' E$) located about 30 km to the East of Annaba (Northeast Algeria). This site is far from any source of anthropogenic activities and is subjected to an important hydrodynamic regime (Fig. 1). Animals were transported in cold boxes to the laboratory and sex was separated by macroscopic inspection according to the color of gonads. The rearing was conducted in aquariums containing sandy bottom and sea water and equipped with air pumps (Nirox X5). The animals were acclimatized for at least 48h before exposure to cadmium [10]. During the exposure period, the physico-chemical parameters of seawater were as follow: temperature $16.50^{\circ} C$ salinity 33.1 g/L, pH 8.89, dissolved oxygen 1.60 mg/L during the exposure period, and: temperature $15.50^{\circ} C$, salinity 33.6 g/L, pH 8.00, dissolved oxygen 1.36 mg/L during the depuration period, respectively.

Sub-lethal cadmium exposure. According to previous bioassay using cadmium ($CdCl_2$, Sigma, USA) on *D. trunculus*, the $96h-LC_{10}$ and LC_{25} (lethal concentration inducing 10% and 25% mortality for males and females, respectively) were found to be 1.15 (extreme values: $0.89-1.47$) mg/L and 2.02 ($1.57-2.58$) mg/L for male, and 0.94 ($0.74-1.18$) mg/L and 1.60 ($1.26-2.01$) mg/L for female [23].

Protein carbonyl assay. Individual gonad of 5 mollusks from control and treated series were used. Protein carbonyls (PC) were determined following the procedure of Levine [24]. The principle is based on the derivatization of protein carbonyl groups with 2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH) leading to the formation of stable dinitrophenyl (DNP) hydrazone adducts, which can be detected spectrophotometrically at 370 nm. Streptomycin sulfate solution (1%) was added to precipitate any extracted DNA that could react with DNPH. Samples were prepared in lysis buffer (50 mM phosphate buffer, pH 7.4). The soluble proteins (0.5 mL) were reacted with 10 mmol DNPH in 2 mol hydrochloric acid for 1 h and mixed every 15 min at room temperature, and precipitated with 20% trichloroacetic acid (TCA), after centrifuged at $10,000$ g at $4^{\circ} C$ for 5 min. The protein pellet was washed three times with 1 mL ethanol: ethyl acetate (1:1) resuspended in 6 M guanidine hydrochloride and incubated at $37^{\circ} C$ for 15 min. The samples were centrifuged ($10,000$ g at $4^{\circ} C$ for 5 min) and the supernatants removed for measurement of absorbance at 370 nm using a molar extinction coefficient for carbonyls ($\epsilon = 22,000$ /mol/cm). The levels of PC were expressed as nmol/mg protein. Quantification of proteins was made by the Coomassie Brilliant Blue G-250 dye-binding method [25] with bovine serum albumin as a standard. The absorbance was measured at 595 nm.

Statistical analysis. All data have been expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using MINITAB Software (Version 16, Penn State College, PA).

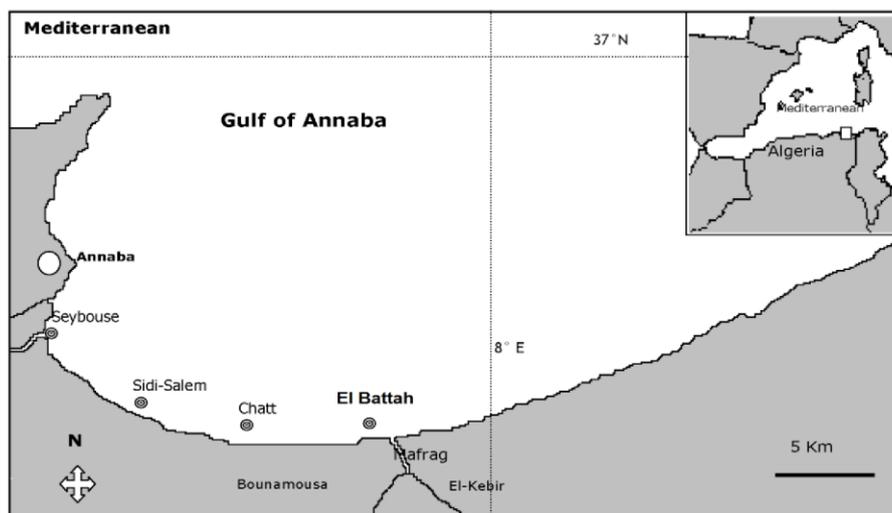


FIGURE 1
Location of El Battah beach in the Annaba Bay.



USA). Statistical differences among the means of control and exposed (LC₁₀ and LC₂₅) were determined using Student's t-test. To identify dose/time/sex relationships a three-way analysis of variance (ANOVA) were performed. Statistical significance was set at $p < 0.05$ level.

RESULTS

Effect of cadmium on protein carbonyls during the exposure period. The impact of sublethal Cd on the levels of protein carbonyls varied as function treatment and sex. As shown in Figure 2, the levels of protein carbonyls recorded in control males ranged between 1.93-2.23 nmol mg⁻¹ proteins and these values does not change significantly ($p = 0.81$) during the exposure time (96 H). A significant

increase in protein carbonyls was observed in all groups of treated males. There was a significant difference between control and treated series (LC₁₀) at 48H ($p = 0.44$) and 96H ($p = 0.48$). The highest gonad protein carbonyl levels were recorded at 48h (4.25 ± 0.41 nmol/mg protein) and 96h (4.79 ± 0.52 nmol/mg protein) in LC₂₅ treated series.

In gonads from *D. trunculus* females, Cd caused a significant increase in protein carbonyl levels at 48H only with the highest concentration ($p = 0.002$) and at 96H with the two tested concentrations as compared to controls groups (controls vs LC₁₀ series $p = 0.005$; controls vs LC₂₅ series $p = 0.002$) (Fig. 3). A three-way ANOVA indicated significant effects of concentrations ($F_{2, 54} = 40.31$; $p = 0.000$), exposure time ($F_{2, 54} = 42.09$; $p = 0.001$), sex ($F_{1, 54} = 9.07$; $p = 0.004$) and concentration x time interaction ($F_{4, 54} = 10.78$; $p = 0.001$).

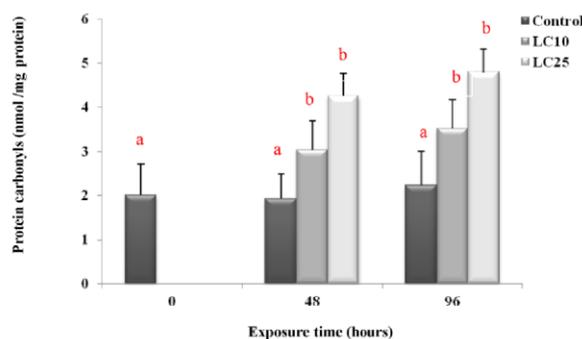


FIGURE 2

Effect of cadmium on protein carbonyl contents (nmol/mg protein) in gonads from *D. trunculus* males during the exposure period (mean \pm SD, $n = 4$). For the same time of exposure, mean values followed by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

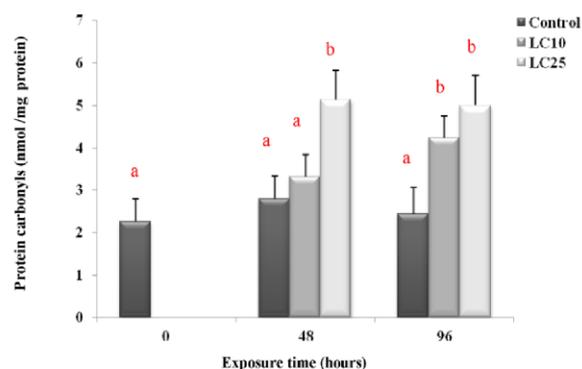


FIGURE 3

Effect of cadmium on protein carbonyl contents (nmol/mg protein) in gonads from *D. trunculus* females during the exposure period (mean \pm SD, $n = 4$). For the same time of exposure, mean values followed by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

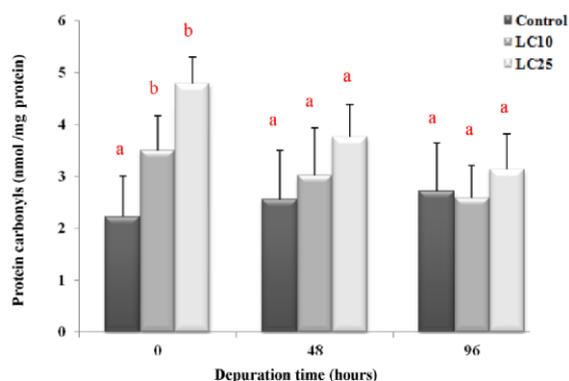


FIGURE 4

Effect of cadmium on protein carbonyl contents (nmol/mg protein) in gonads from *D. trunculus* males during the depuration period (mean \pm SD, n= 4). Mean values followed by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

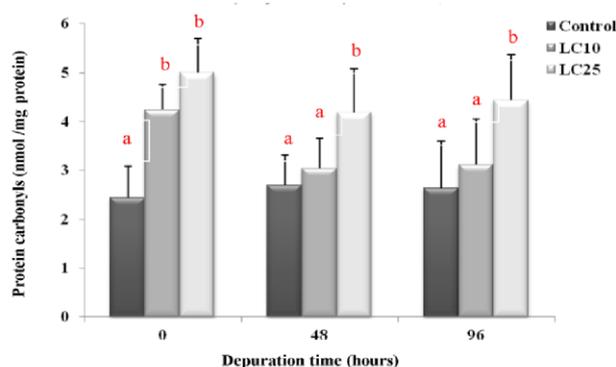


FIGURE 5

Effect of cadmium on protein carbonyl contents (nmol/mg protein) in gonads from *D. trunculus* females during the depuration period (m \pm SD, n= 4). Mean values followed by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Effect of cadmium on protein carbonyls during the depuration period. In males, at day 0, the PC levels remain significantly higher in treated series with LC10 ($p = 0.048$) and LC25 ($p = 0.002$) as compared with controls. However, there was no significant difference between control and treated series at 48 H (control vs LC10 $p = 0.051$; control vs LC25 $p = 0.078$) and 96 H (control vs LC10 $p = 0.86$; control vs LC25 $p = 0.051$) (Fig. 4).

In females, the normal values were recovered starting 48H during the depuration period with the lower concentration of Cd (LC₁₀) (Fig. 5). Indeed, there was no significant difference between control and LC10-treated series at 48H (control vs LC10 $p = 0.51$) and 96H (control vs LC10 $p = 0.52$), respectively. In females exposed to CL₂₅, there was a significant difference in the PC levels between controls and treated series at 48H ($p = 0.035$) and 96H ($p = 0.037$).

Concerning the depuration period, ANOVA

revealed significant effects of concentration ($F_{2, 54} = 28.58$; $p = 0.001$), time ($F_{2, 54} = 4.06$; $p = 0.023$), and sex ($F_{1, 54} = 4.55$; $p = 0.037$) was showed. The interaction (concentrations \times time) was also significant ($F_{4, 54} = 2.58$; $p = 0.048$).

DISCUSSION

Protein carbonyls represent a marker of global protein oxidation, as they are generated by multiple different reactive oxygen species in blood, tissues and cells [26], and a good biomarker of aquatic organism exposure to environmental contaminants [27]. An increase in this biomarker would indicate that normal protein metabolism had been altered by the accumulation of damaged molecules [28].

The present study revealed that Cd exposure at two sub-lethal concentrations induced a significant induction in PC levels. The responses observed



varied according to the concentration, the sex and the exposure time. Indeed, the effect was relatively more marked with the highest concentration. Previous studies have reported similar observations on aquatic organisms following exposure to several pollutants. Thus, the PC levels increased significantly in the gill, liver, kidney and brain of two fish species *Channa striatus* and *Heteropneustes fossilis* exposed to heavy metals especially Cd [29], and also in intestines of *Fundulus heteroclitus* following a short-term exposure to low concentrations of copper [30]. This induction in PC levels was reported in some Mollusk species such as *Laternula elliptica* contaminated with Copper and Iron during the reproductive period [31], *Mytilus edulis* and *Dosinia lupines* following irradiation by ^{60}Co [32] or *M. galloprovincialis* sampled from polluted areas [33].

For environmental risk assessment, a comprehensive understanding on adaptation and/or recovery is essential [22]. In this study, Cd-exposed animals transferred to clean water recovered rapidly their normal status starting 48 H according to the concentrations tested and the sex. Thus, *D. trunculus* restored their normal values by 48H for the two tested concentrations in male groups, and also by 48H only in the LC10-treated female series. The response was relatively more marked with the highest concentration and in females. This is probably due to the susceptibility of females to Cd. Indeed, based on the lethal concentrations previously determined on *D. trunculus*, cadmium appeared more toxic against females as compared to males [23]. Generally, in contaminated organisms the energy budget was used for detoxification processes to maintain homeostasis to the detriment of growth and production processes [34]. Accumulation of oxidative damage and decrease in antioxidant protection during the reproductive period has been demonstrated in Bivalves [35]. In previous studies we showed that heavy metals caused an oxidative stress in *D. trunculus* [17, 18, 20]. In addition, this species was found to stimulate rapidly his detoxification system to overcome the stress induced by laboratory exposure to cadmium [10].

Recently, three Mollusk species (*Ruditapes philippinarum*, *M. galloprovincialis*, *Scrobicularia plana*) exposed to several heavy metals were found to reduce rapidly the levels of some toxic like lead and cadmium during the depuration period [36]. The reduction of PC levels observed during the depuration period can be due to the activation of metabolic pathways to remove PC from tissues [37-38]. There is a difference in the energy demand of male and female gametes [39]. Indeed, male bivalves produce small spermatozoa with few energy reserves in comparison to females which elaborate vitellin reserves for developing oocytes [40] and have high needs of energy for oogenesis. Moreover, it has been demonstrated that the bioaccumulation of several heavy metals including cadmium depends on the sex

during the gametogenesis in *M. galloprovincialis*, and this bioaccumulation was found higher in females [41]. These findings can explain the difference in the responses observed between the sex in *D. trunculus* during the exposure to cadmium and the depuration period.

CONCLUSIONS

The overall data obtained suggested that *D. trunculus* is a suitable biological model which can be used in toxicological and biomonitoring studies, and PC are a good biomarker of oxidative stress induced by cadmium. Moreover, the recovery pattern showed that this Mollusk species was able to overcome relatively rapidly the stress induced by this heavy metal particularly in males. The difference in the responses between the sexes could be correlated to different metabolic requirements during the reproductive period.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank anonymous referees for useful discussions and critical reading of the manuscript. This study was conducted as part of the project CNEPRU (Pr. N. Soltani) and was supported by the National Fund allocated to Research Laboratory of Applied Animal Biology (University Badji Mokhtar, Annaba).

REFERENCES

- [1] McGlashan, D.J. and Hughies, J.M. (2001). Genetic evidence for historical continuity between populations of the Australian freshwater fish *Craterocephalus stercusmuscarum* (Atherinidae) east and west of the Great Diving Range. *J. Fish. Biol.* 59: 55–67.
- [2] Vutukuru, S.S., Prabhath, N.A., Raghavender, M. and Yerramilli, A. (2007). Effect of arsenic and chromium on the serum amino transferases activity in Indian major carp, *Labeo rohita*. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 4: 224-227.
- [3] Ayres, R.U. (1992). Toxic heavy metals: materials cycle optimization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 815–820.
- [4] Ruangsomboon, S. and Wongrat, L. (2006). Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and the predatory catfish *Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*. *Aquat. Toxicol.* 78: 15–20.
- [5] Santovito, G., Boldrin, F. and Irato, P. (2015). Metal and metallothionein distribution in



- different tissues of the Mediterranean clam *Venerupis philippinarum* during copper treatment and detoxification. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 174–175: 46–53.
- [6] Wang, W. and Rainbow, P.S. (2006). Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. *Environ. Chem*, 3:395–399.
- [7] Sokolova, I.M. (2004). Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm. *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *J. Exp. Biol*, 207: 2639–2648.
- [8] Geret, F., Serafim, A., Barreira, L. and Bebianno, M.J. (2002). Effect of Cd on antioxidant enzymes in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Biomarkers*, 7: 242–256.
- [9] Damiens, G., Mouneyrac, C., Quiniou, F., His, E., Gnassia-Barelli, M. and Roméo, M. (2006). Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostre agigas*. *Environ. Pollut*, 140: 492–499.
- [10] Belabed, S. and Soltani, N. (2013). Acute toxicity of cadmium on *Donax trunculus*: acetylcholinesterase, glutathione S-transferase activities and pattern of recovery. *Europ. J. Exp. Biol*, 3(2):54-61.
- [11] Smaoui-Damak, W., Rebai, T., Berthet, B. and Hamza-Chaffai, A. (2006). Does cadmium pollution affect reproduction in the clam *Ruditapes decussatus*? A one-year case study. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*, 143: 252–261.
- [12] Ketata, I., Smaoui-Damak, W., Guermazi, F., Rebai, T. and Hamza-Chaffai, A. (2007). In situ endocrine disrupting effects of cadmium on the reproduction of *Ruditapes decussatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*, 146: 415–430.
- [13] Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J. and Gauthier-Clerc, S. (2002). Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay Fjord. *Mar. Environ. Res*, 53: 295–310.
- [14] Abdenour, C., Smith, B.D., Boulakoud, M.S., Samraoui, B. and Rainbow, P.S. (2000). Trace metals in shrimps and sediments from Algerian water. *J. Catalog. Mar. Env*, 3: 9-12.
- [15] Beldi, H., Gimbert, F., Maas, S., Scheiffler, R. and Soltani, N. (2006). Seasonal variations of Cd, Cu, Pb and Zn in the edible mollusk *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from gulf of Annaba, Algeria. *Afric. J. Agric. Res*, 1(4): 85-90.
- [16] Hamdani, A. and Soltani-Mazouni, N. (2011). Changes in Biochemical Composition of the Gonads of *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) from the Gulf of Annaba (Algeria) in Relation to Reproductive Events and Pollution. *J. J. Biol. Sci*, 4 (3): 149-156.
- [17] Amira, A., Sifi, K. and Soltani, N. (2011). Measure of environmental stress biomarkers in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria). *Euro. J. Exp. Bio*, 1(2): 7-16.
- [18] Sifi, K., Amira, A. and Soltani, N. (2013). Oxidative stress and biochemical composition in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria). *Adv. Environ. Biol*, 7(4): 595-604.
- [19] Bensouda-Talbi L. and Soltani-Mazouni N. (2014). Measure of Oxidative Stress and Neurotoxicity Biomarkers in *Donax trunculus* from the Gulf of Annaba (Algeria): Case of the Year 2012. *Annual. Res. Rev. Biol*, 4(12): 1902-1914.
- [20] Soltani, N., Amira, A., Sifi, K. and Beldi H. (2012). Environmental monitoring of the Annaba gulf (Algeria): measure of biomarkers in *Donax trunculus* and metallic pollution. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 137(1-4): 47-56.
- [21] Parvez, S. and Raisuddin, S. (2005). Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 20 :112-117.
- [22] Wu, R.S.S., Siu, W.H.L. and Shin, P.K.S. (2005). Induction, adaptation and recovery of biological responses: implication for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 51, 623–634.
- [23] Merad, I. and Soltani, N. (2015). Environmental risks of cadmium on *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia): sublethal effect on nucleic acid contents of gonads. *Proceeding of INOC-International Congress “Estuaries & Coastal Protected Areas “ECPA 2014, 04 - 06 November 2014, Izmir– Turkey*, 260-267.
- [24] Levine, R.L., Garland, D. and Oliver, C.N. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 186: 464–478.
- [25] Bradford M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72: 278-254.
- [26] Weber, D., Davies, M. J. and Grune T. (2015). Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox Biol*, 5: 367–380
- [27] Wei, K. and Yang, J. (2015). Oxidative damage induced by copper and beta-cypermethrin in gill of the freshwater cray fish *Procambarus clarkia*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 113: 446–453.
- [28] Fagan, J.M., Slecicka, B.G. and Sohar, I. (1999). Quantitation of oxidative damage to tissue



- proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 751–757.
- [29] Fatima, M., Usmani, N., Firdaus, F., Zafeer, M. F., Ahmad, S., Akhtar, K., Dawar Husain, S.M., Ahmad, M. H., Anis, E. and Hossain, M M. (2015). In vivo induction of antioxidant response and oxidative stress associated with genotoxicity and histopathological alteration in two commercial fish species due to heavy metals exposure in northern India (Kali) river. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 176–177: 17–30.
- [30] Ransberry, V.E., Morash, A. J., Blewett, T. A., Wood, C. M. and McClelland, G B. (2015). Oxidative stress and metabolic responses to copper in freshwater and seawater-acclimated killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Aquat. Toxicol.* 161: 242–252.
- [31] Husmann, G., Abele, D., Monien, D., Monien, P., Kriews, M. and Philipp, E.E.R. (2012). The influence of sedimentation on metal accumulation and cellular oxidative stress markers in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 111: 48-59
- [32] Walker, T.S., Mantle, D., Bythell, J.C. and Thomason, J. C. (2000). Oxidative-stress: comparison of species specific and tissue specific effects in the marine bivalves *Mytilus edulis* (L.) and *Dosinia lupinus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 127: 347–355.
- [33] Gomiero, A., Volpato, E., Nasci, C., Perra, G., Viarengo, A., Dagnino, A., Spagnolo, A. and Fabi, G. (2015). Use of multiple cell and tissue-level biomarkers in mussels collected along two gas fields in the northern Adriatic Sea as a tool for long term environmental monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 93: 228–244.
- [34] Soldatov, A.A., Gostyukhina, O.L., Golovina, I.V. (2008). State of antioxidant enzyme complex in tissues of the black sea mollusk *Mytilus galloprovincialis* under natural oxidative stress. *Comp. Ontogen. Biochem.* 44: 175–182.
- [35] Anacleto, P., Maulvault, A. L., Nunes, M. L., Carvalho, M. L., Rosa, R. and Marques, A. (2015). Effects of depuration on metal levels and health status of bivalve molluscs. *Food Control*, 47: 493-501.
- [36] Hofmann, G. E. and Somero, G. N. (1995). Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *J. Exp. Biol.* 198: 1509–1518.
- [37] Grune, T., Catalgol, B., Licht, A., Ermak, G., Pickering, A.M., Ngo, J.K. and Davies, K.J. (2011). HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress. *Free. Radic. Biol. Med.* 51: 1355–1364.
- [38] Gebel, T., Maser, E. and Netter, K.J. (1991). The occurrence of carbonyl reduction in continuous cell-lines emphasizes the essentiality of this metabolic pathway. *Febs. Lett.* 282: 359–362.
- [39] Beninger, P.G., Le Pennec, G. and Le Pennec, M. (2003). Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L. *Biol. Bull.* 205: 83–92.
- [40] Beninger, P.G. and Le Pennec, M. (1997). Reproductive characteristics of a primitive bivalve from a deep-sea reducing environment: giant gametes and their significance in Acharaxaline (*Cryptodonta: Solemyidae*). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 157: 195–206.
- [41] Richir, J. and Gobert, S. (2014). The effect of size, weight, body compartment, sex and reproductive status on the bioaccumulation of 19 trace elements in rope-grown *Mytilus galloprovincialis*. *Ecol Indic.* 36: 33– 47.

Received: 12.02.2016

Accepted: 23.07.2016

CORRESPONDING AUTHOR

Pr. Dr. Noureddine Soltani

Laboratory of Applied Animal Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University Badji Mokhtar of Annaba, 23000-Annaba, Algeria

e-mail: noureddine.soltani@univ-annba.org

RESUME

Le Cadmium (Cd) est un métal lourd occupant le septième rang sur la liste des substances dangereuses prioritaires. Il se révèle être un polluant majeur dans la région du golfe d'Annaba. L'objectif de ce travail consiste à étudier, en conditions de laboratoire, la réponse biochimique d'une espèce bioindicatrice de la pollution, à savoir, *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Donacidae) au Cd, en prenant en considération, la période du cycle sexuel (repos/reproduction) et le sexe. L'étude s'est déroulée en deux phases: une première phase d'exposition aiguë au Cd d'une durée de 96h, suivie d'une seconde phase de dépuraction d'une même durée afin d'évaluer la capacité de cette espèce à restaurer un statut normal.

Les échantillons ont été prélevés à El Battah, un site éloigné des sources de pollution, et élevés au laboratoire. Les paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH, la salinité et l'oxygène dissout ont été mesurés. Le Cd a été additionné à l'eau d'élevage à différentes concentrations (5, 7,6 et 10 mg). Les tests de toxicité ont permis d'estimer les concentrations sublétales (CL₁₀ et CL₂₅) et létales (CL₅₀ et CL₉₀) pendant 24, 48, 72 et 96h d'exposition. Le Cd entraîne une mortalité de l'espèce étudiée avec une relation dose-réponse; les femelles sont plus sensibles par rapport aux mâles.

Deux types de stratégies de défense au niveau cellulaire ont été étudiées après exposition aiguë aux concentrations sublétales du Cd, dans l'organe reproducteur de *D. trunculus*. L'une consiste à étudier la réponse de deux biomarqueurs les protéines carbonylées (PCs), dérivées issues de l'oxydation des protéines, et les métallothionéines (MTs), impliquées dans la détoxification des métaux. La seconde consiste à analyser quelques composants biochimiques des gonades: les réserves énergétiques (glucides, lipides, protéines), les acides nucléiques (l'acide ribonucléique; ARN, et l'acide désoxyribonucléique; ADN), ainsi que les acides gras de la famille des oméga-3 (l'acide eicosapentaénoïque; EPA et l'acide docosahexaénoïque; DHA). Nos résultats sont en faveur d'un effet globalement pro-oxydant, puisque l'exposition des bivalves au Cd à de faibles concentrations durant 4 jours entraîne l'induction des PCs et des MTs d'une part, et une diminution des réserves énergétiques, des acides nucléiques, ainsi que des oméga-3 d'autre part. Le Cd a généralement un effet concentration, plus marqué chez les femelles, notamment durant la période de reproduction. L'état physiologique est donc un facteur important pour déterminer le niveau de sensibilité au Cd chez les organismes aquatiques. De plus, *D. trunculus* a révélé un potentiel de restauration relativement important qui témoigne de l'efficacité de la phase de dépuraction pour réduire le stress subit après une contamination chimique.

Mots clés: *Donax trunculus*, Toxicité, Cadmium, Biomarqueurs, Composition biochimique, Acides gras, Acides nucléiques, Dépuraction, Sexe, Gonade.