

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار – عنابة

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR – ANNABA



FACULTÉ DES SCIENCES  
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE  
LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE APPLIQUEE  
Thèse En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat LMD

Domaine : SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : PHYSIOTOXICOLOGIE ANIMALE

**Intitulé**

**« Effet sublétal du cadmium chez *Donax trunculus* L. :  
aspect biochimique et cytologique ».**

**Presentée par : M<sup>me</sup> KHEROUFI Nawel épouse Ighessanen**

**Directrice de thèse : M<sup>me</sup> HAMDANI A. (Pr, Université Badji Mokhtar, Annaba)**

**Devant un jury composé de**

Pr. SOLTANI N.	Président	Université Badji Mokhtar, Annaba
Pr. DRAREDJA-BELDI H.	Examineur	Université Badji Mokhtar, Annaba
Pr. CHOUAHDA S.	Examineur	Université Badji Mokhtar, Annaba
Pr. ZAIDI N.	Examineur	Université 20 Aout 1955, Skikda
Dr. AMIRA A.	Examineur	Université Chadli Bendjedid, El Tarf
Pr. SOLTANI-MAZOUNI N.	Membre invité	Université Badji Mokhtar, Annaba

## Dédicace

*À mes chers parents Amar et Dalila, pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer. Rien au monde ne pourrait compenser tout ce que vous avez fait pour moi. Vos prières, vos encouragements et votre soutien m'ont toujours été d'un grand secours. C'est à vous que je dois cette réussite et je suis fière de vous l'offrir. Puisse Dieu vous accordé la santé, bonheur et longue vie.*

*À mon cher mari Salim, pour ses sacrifices, son soutien moral et matériel, sa gentillesse sans égal, son profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Sans son aide, ses conseils et ses encouragements ce travail n'aurait vu le jour.*

*À ma chère sœur Dounia et à mes frères Ahmed et Naouri, Je vous prie de trouver dans ce travail l'expression de mon estime et mon profond respect. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.*

*À mes beaux-parents, Nadia et Ali, pour tous vos encouragements et vos prières, que dieu vous protègent, à mes belles sœurs, Linda, Nabila et Yasmine et à mes beaux-frères, Nabil et Bullhadj, vous m'avez accueilli à bras ouverts dans votre famille. En témoignage de l'attachement, et de l'affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux  
De bonheur et de santé.*

*À mes amies et sœurs de cœur, Soraya et Fatima-Zohra.  
À toute ma famille proche et lointaine.*

## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à témoigner toute ma reconnaissance à M. **SOLTANI Nouredine**, Professeur de Biologie et Directeur du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, de m'avoir permis d'accomplir mes travaux de recherche au sein de son laboratoire. Je le remercie également pour son enseignement de qualité tout au long de mon parcours universitaire, et d'avoir fait l'honneur de présider le présent jury. Qu'il trouve, en ce travail, l'expression de ma sincère gratitude et mon profond respect pour ses qualités humaines et scientifiques.

Mes remerciements vont aussi à ma directrice de thèse, P<sup>r</sup> **HAMDANI Amel**, enseignante de Biologie à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé. Je voudrais aussi la remercier pour sa sympathie, sa bonne humeur et surtout pour le temps qu'elle m'a consacré et la patience avec laquelle elle a accompagné mon travail.

Je remercie également l'ensemble des membres du jury d'avoir pris le temps de lire ce travail, de l'avoir évalué, ainsi que pour les remarques qu'ils m'adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer mon travail.

Madame **BELDI Hayet** (Professeur à l'Université Badji Mokhtar, Annaba) ; Madame **CHOUAHDA Salima** (Professeur à l'Université Badji Mokhtar, Annaba) ; Madame **ZAIDI Nedjoudia** (Professeur à l'Université 20 Aout 1955, Skikda) ; Madame **AMIRA Akila** (Maitre de conférences A à l'Université Chadli Bendjedid, El Tarf). Je remercie Mme **SOLTANI-MAZOUNI Nadia** (Professeur à l'Université Badji Mokhtar, Annaba) d'avoir accepté d'assister à cette soutenance en tant que membre invité.

Je remercie infiniment toute l'équipe pédagogique pour leurs disponibilités et l'ambiance familiale qu'ils ont installée au sein du laboratoire. Une pensée particulière à Madame Dalila, Zahra pour leur aide, et leurs conseils, à mes amis collègues, Asma, Sana, Hanene, Said, Rachid, Ali..etc. Je vous remercie pour votre aide et les bons moments qu'on a partagé ensemble.

J'adresse mes sincères remerciements à M. **LOÏC Quinton**, Professeur à l'Université de Liège et directeur de l'unité MolSys Research Unit, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour ses conseils, sa disponibilité, et d'avoir partagé son savoir scientifique.

Liste des figures

Page

**Figure 1.** Morphologie interne (A) et externe (B) de la coquille de *D. trunculus* (Gr ×3) (Photo personnelle).....08

**Figure 2.** Anatomie interne de *Donax trunculus* (Gr×4) (Photo personnelle) .....09

**Figure 3.** Distribution spatiale de *D.trunculus* (www.gbif.org/species/57)..... 11

**Figure 4.** Localisation de *D.trunculus* dans son biotope (Photo personnelle) .....11

**Figure 5.** Filtration au niveau des branchies chez les Bivalves .....12

**Figure 6.** Cycle biologique de *Donax trunculus* (Galicia, 2020) .....13

**Figure 7.** Aspect externe des gonades de *D. trunculus* : femelle (A) et mâle (B) (Photo personnelle).....14

**Figure 8.** Localisation du site El Battah dans le golfe d’Annaba (Arc Gis, 2021) .....16

**Figure 9.** Photographie de la plage El Battah (Photo personnelle) .....16

**Figure 10.** Engin de pêche artisanal "le côpe" (A), Récolte artisanal de *D. trunculus* (B) .....17

**Figure 11.** Elevage de *D. trunculus* au laboratoire (Photo personnelle).....18

**Figure 12.** Photo d’un multi-paramètre (Multi 340i).....18

**Figure13.**Prélèvement de l’hémolymphe (A), du muscle adducteur (B) (Gr×4) chez *D.trunculus* (Photo personnelle) .....19

**Figure 14.** Prélèvement et pesé des tissus (Gx4) de *D.trunculus* (Photo personnelle).....20

**Figure 15.** Extraction des vitellogénines et vitellines (adaptée aux centipèdes par M.DESCAMPS, 1996 à partir de FABRE *et al.*, 1996).....21

**Figure 16.** Dosage des protéines : droite de régression exprimant l’absorbance en fonction de la quantité d’albumine (µg) (R2 coefficient de détermination).....22

**Figure 17.** Montage de l’appareil (Photo personnelle) .....24

**Figure 18.** Dépôt des échantillons et migration (Photo personnelle).....25

**Figure 19.** Effet du cadmium sur les taux des vitellogénines (µl/ml d’hémolymphe) chez *D. trunculus* en période d’activité sexuelle, et durant la phase d’exposition et de déuration .....31

**Figure 20.** Effet du cadmium sur les taux de vitellogénines (µl/ml d’hémolymphe) chez *D. trunculus* en période de repos sexuel et, durant la phase d’exposition et de déuration (Moyenne ± SD, n= 5) .....35

**Figure 21.** Effet du cadmium sur le taux des vitellines (µg/mg de tissus) chez *D.trunculus* en période d’activité sexuelle durant la phase d’exposition et de déuration (Moyenne ± SD, n= 5) .....39

**Figure 22.** Séparation électrophorétique des vitellogénines chez *D.trunculus* en période d’activité sexuelle. **A** : Protéines standards ; **B** : Témoin 0j ; **C** : CL<sub>10</sub> (48h) d’exposition ; **D** : CL<sub>25</sub> (48h) d’exposition ; **E** : CL<sub>10</sub> (96h) d’exposition ; **F** : CL<sub>25</sub> (96) d’exposition ; **G** : CL<sub>10</sub> (48h) de déuration ; **H** : CL<sub>25</sub> (48h) de déuration ; **I** : CL<sub>10</sub> (96h) de déuration ; **J** : CL<sub>25</sub> (96h) de déuration. ....44

**Figure 23.**Courbe d’étalonnage exprimant le rapport frontal (Rf) en fonction du Poids moléculaire des vitellogénines (PM en kDa) en période d’activité sexuelle, et durant la phase d’exposition et de déuration.....44

**Figure 24.** Séparation électrophorétique des vitellogénines chez *D.trunculus* en période de repos sexuel. **A** : Protéines standards ; **B** : Témoin 0j ; **C** : CL<sub>10</sub> (48h) d’exposition ; **D** : CL<sub>25</sub>

(48h) d'exposition ; <b>E</b> : CL <sub>10</sub> (96h) d'exposition ; <b>F</b> : CL <sub>25</sub> (96) d'exposition ; <b>G</b> : CL <sub>10</sub> (48h) de dépuración ; <b>H</b> : CL <sub>25</sub> (48h) de dépuración ; <b>I</b> : CL <sub>10</sub> (96h) de dépuración ; <b>J</b> : CL <sub>25</sub> (96h) de dépuración. ....	<b>48</b>
<b>Figure 25.</b> Courbe d'étalonnage exprimant le rapport frontal (Rf) en fonction du Poids moléculaire des vitellogénines (PM en kDa) en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition et de dépuración. ....	<b>48</b>
<b>Figure 26.</b> Séparation électrophorétique des vitellines chez <i>D.trunculus</i> en période d'activité sexuelle. <b>A</b> : Protéines standards ; <b>B</b> : Témoin 0j ; <b>C</b> : CL <sub>10</sub> (48h) d'exposition ; <b>D</b> : CL <sub>25</sub> (48h) d'exposition ; <b>E</b> : CL <sub>10</sub> (96h) d'exposition ; <b>F</b> : CL <sub>25</sub> (96) d'exposition ; <b>G</b> : CL <sub>10</sub> (48h) de dépuración ; <b>H</b> : CL <sub>25</sub> (48h) de dépuración ; <b>I</b> : CL <sub>10</sub> (96h) de dépuración ; <b>J</b> : CL <sub>25</sub> (96h) de dépuración. ....	<b>51</b>
<b>Figure 27.</b> Courbe d'étalonnage exprimant le rapport frontal (Rf) en fonction du Poids moléculaire des vitellogénines (PM en kDa) en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition et de dépuración. ....	<b>52</b>
<b>Figure 28.</b> Coupes histologiques des ovocytes de <i>Donax trunculus</i> au stade de maturité sexuelle (Gx10). <b>A</b> : Témoins ; <b>B</b> : CL <sub>10</sub> (48h) ; <b>C</b> : CL <sub>10</sub> (96h) ; <b>D</b> : CL <sub>25</sub> (48h) ; <b>E</b> : CL <sub>25</sub> (96h) ; <b>OP</b> : Ovocyte pédonculé ; <b>L</b> : Lumière du follicule. ....	<b>54</b>
<b>Figure 29.</b> Effet du cadmium sur la longueur (µm) de follicules ovariens chez <i>Donax trunculus</i> (m ± SD ; n=3-4). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes. ....	<b>55</b>
<b>Figure 30.</b> Effet du cadmium sur la largeur (µm) de follicules ovariens chez <i>Donax trunculus</i> (m ± SD ; n=3-4). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes. ....	<b>57</b>
<b>Figure 31.</b> Effet du cadmium sur le volume (mm <sup>3</sup> ) de follicules ovariens chez <i>Donax trunculus</i> (m ± SD ; n=3-4). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes. ....	<b>59</b>
<b>Figure 32.</b> Coupes histologiques des ovocytes de <i>Donax trunculus</i> au stade de maturité sexuelle (Gx40). <b>A</b> : Témoins ; <b>B</b> : CL <sub>10</sub> (48h) ; <b>C</b> : CL <sub>10</sub> (96h) ; <b>D</b> : CL <sub>25</sub> (48h) ; <b>E</b> : CL <sub>25</sub> (96h) ; <b>OV</b> : Ovocyte mature ; <b>N</b> : Noyau ; <b>Vn</b> : Vitelline. ....	<b>61</b>
<b>Figure 33.</b> Impact du cadmium sur la longueur des ovocytes (µm) de <i>Donax trunculus</i> (m±SD, n= 3-4). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes. ....	<b>62</b>
<b>Figure 34.</b> Impact du cadmium sur la largeur des ovocytes de <i>Donax trunculus</i> (m±SD, n= 3-4). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes. ....	<b>64</b>
<b>Figure 35.</b> Impact du cadmium sur le volume des ovocytes (mm <sup>3</sup> ) de <i>Donax trunculus</i> (m±SD, n= 3-4). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes. ....	<b>66</b>
<b>Figure 36.</b> Impact du cadmium sur le nombre d'ovocytes de <i>Donax trunculus</i> (m±SD, n= 3-4). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes. ....	<b>68</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Position systématique de <i>D.trunculus</i> .....	17
<b>Tableau 2.</b> Paramètres physico-chimique de l'eau de l'élevage de <i>D.trunculus</i> .....	17
<b>Tableau 3.</b> Dosage des vitellogénines et vitellines : réalisation de la gamme d'étalonnage .....	22
<b>Tableau 4.</b> Composition des gels (Running gel, staking gel) .....	24
<b>Tableau 5.</b> Composition de sample buffer (Tampon d'échantillons) .....	25
<b>Tableau 6.</b> Composition du tampon de migration (Running buffer) .....	25
<b>Tableau 7.</b> Composition de la solution de coloration .....	26
<b>Tableau 8.</b> Principales étapes de coloration par hématoxyline-éosine selon Martel (2005).....	27
<b>Tableau 9.</b> Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) des taux de vitellogénines ( $\mu\text{l/ml}$ d'hémolymphe) chez <i>D. trunculus</i> ( $m \pm SD$ , $n=5$ ) en phase d'exposition....	31
<b>Tableau 10.</b> Classement des concentrations des taux de vitellogénines par le test HSD de Tukey en phase d'exposition.....	32
<b>Tableau 11.</b> Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, concentration) des taux de vitellogénines ( $\mu\text{l/ml}$ d'hémolymphe) chez <i>D. trunculus</i> en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition. ....	32
<b>Tableau 12.</b> Analyse de la variance à un critère de classification (temps) des taux de vitellogénines ( $\mu\text{l/ml}$ d'hémolymphe) chez les Témoins, $CL_{10}$ , $CL_{25}$ de <i>Donax trunculus</i> ( $m \pm SD$ , $n=5$ ) en phase de dépuraton.....	33
<b>Tableau 13.</b> Classement des temps (heures) des taux de vitellogénines par le test HSD de Tukey en phase de dépuraton.....	33
<b>Tableau 14.</b> Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, concentration) des taux de vitellogénines ( $\mu\text{l/ml}$ d'hémolymphe) chez <i>D. trunculus</i> en période d'activité sexuelle, et durant la phase de dépuraton.....	33
<b>Tableau 15.</b> Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) des taux de vitellogénines ( $\mu\text{l/ml}$ d'hémolymphe) chez <i>Donax trunculus</i> ( $m \pm SD$ , $n=5$ ) en phase d'exposition. ....	35
<b>Tableau 16.</b> Classement des concentrations des taux de vitellogénines par le test HSD de Tukey en phase d'exposition .....	36
<b>Tableau 17.</b> Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, concentration) des taux de vitellogénines ( $\mu\text{l/ml}$ d'hémolymphe) chez <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel, et durant la phase d'exposition. ....	36
<b>Tableau 18.</b> Analyse de la variance à un critère de classification (temps) des taux de vitellogénines ( $\mu\text{l/ml}$ d'hémolymphe) chez les Témoins, $CL_{10}$ , $CL_{25}$ de <i>Donax trunculus</i> ( $m \pm SD$ , $n=5$ ) en phase de dépuraton.....	37
<b>Tableau 19.</b> Classement des temps (heures) des taux de vitellogénines par le test HSD de Tukey en phase de dépuraton.....	37
<b>Tableau 20.</b> Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, concentration) des taux de vitellogénines ( $\mu\text{l/ml}$ d'hémolymphe) chez <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel, et durant la phase de dépuraton.....	37
<b>Tableau 21.</b> Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) des taux	

de vitellines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissus) chez <i>Donax trunculus</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=5$ ) en phase d'exposition. ....	39
<b>Tableau 22.</b> Classement des concentrations des taux de vitellines par le test HSD de Tukey en phase d'exposition.....	40
<b>Tableau 23.</b> Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, concentration) des taux de vitellines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissus) chez <i>D. trunculus</i> en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition.....	40
<b>Tableau 24.</b> Analyse de la variance à un critère de classification (temps) des taux de vitellines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissus) chez les Témoins, CL <sub>10</sub> , CL <sub>25</sub> de <i>Donax trunculus</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=5$ ) en phase de dépuration. ....	41
<b>Tableau 25.</b> Classement des temps (heures) des taux de vitellines par le test HSD de Tukey en phase de dépuration.....	41
<b>Tableau 26.</b> Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, concentration) des taux de vitellines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissus) chez <i>D. trunculus</i> en période d'activité sexuelle, et durant la phase de dépuration .....	41
<b>Tableau 27.</b> Poids moléculaire (PM, kDa) des différentes fractions protéiques des vitellogénines chez <i>D. trunculus</i> en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition et de dépuration (0 : fraction manquante ; + : fraction présente). ....	45
<b>Tableau 28.</b> Poids moléculaire (PM, kDa) des différentes fractions protéiques des vitellogénines chez <i>D. trunculus</i> en période de repos sexuel, et durant la phase d'exposition et de dépuration (0 : fraction manquante ; + : fraction présente). ....	49
<b>Tableau 29.</b> Poids moléculaire (PM, kDa) des différentes fractions protéiques des vitellines chez <i>D.trunculus</i> en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition et de dépuration (0 : fraction manquante ; + : fraction présente). ....	52
<b>Tableau 30.</b> Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) de la longueur ( $\mu\text{m}$ ) de follicules ovariens chez <i>D.trunculus</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3-4$ ). ....	56
<b>Tableau 31.</b> Classement des concentrations de la longueur de follicules ovariens ( $\mu\text{m}$ ) par le test HSD de Tukey.....	56
<b>Tableau 32.</b> Analyse de la variance à deux critères de classification (temps, concentration) de la longueur de follicules ovariens chez <i>Donax trunculus</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3-4$ ) .....	56
<b>Tableau 33.</b> Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) de la largeur ( $\mu\text{m}$ ) de follicules ovariens chez <i>Donax trunculus</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3-4$ ).....	58
<b>Tableau 34.</b> Classement des concentrations de la largeur de follicules ovariens par le test HSD de Tukey .....	58
<b>Tableau 35.</b> Analyse de la variance à deux critères de classification (temps, concentration) de la largeur de follicules ovariens chez <i>Donax trunculus</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3-4$ ) .....	58
<b>Tableau 36.</b> Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) du volume ( $\text{mm}^3$ ) de follicules ovariens chez <i>D.trunculus</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3-4$ ) .....	60
<b>Tableau 37.</b> Classement des concentrations du volume de follicules ovariens par le test HSD de Tukek .....	60
<b>Tableau 38.</b> Analyse de la variance à deux critères de classification (temps, concentration) du volume ( $\text{mm}^3$ ) de follicules ovariens chez <i>Donax trunculus</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3-4$ ) .....	60
<b>Tableau 39.</b> Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) de la longueur des ovocytes ( $\mu\text{m}$ ) chez <i>Donax trunculus</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3-4$ ). ....	63
<b>Tableau 40.</b> Classement des concentrations de la longueur des ovocytes par le test HSD de Tukey	

.....63

**Tableau 41.** Analyse de la variance à deux critères de classification (concentration, temps) de la longueur des ovocytes de *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ).....63

**Tableau 42.** Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) de la largeur ( $\mu\text{m}$ ) des ovocytes chez *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ) .....65

**Tableau 43.** Classement des concentrations de la largeur des ovocytes par le test HSD de Tukey65

**Tableau 44.** Analyse de la variance à deux critères de classification (concentration, temps) de la largeur des ovocytes de *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ) .....65

**Tableau 45.** Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) du volume ( $\text{mm}^3$ ) des ovocytes chez *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ) .....67

**Tableau 46.** Classement des concentrations du volume des ovocytes par le test HSD de Tukey ..67

**Tableau 47.** Analyse de la variance à deux critères de classification (concentration, temps) du volume des ovocytes de *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ).....67

**Tableau 48.** Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) du nombre d'ovocytes chez *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ) .....69

**Tableau 49.** Analyse de la variance à deux critères de classification (concentration, temps) du nombre d'ovocytes de *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ).....69

**Tableau 50.** Corrélation entre tous les différents paramètres étudiés chez *Donax trunculus* (R= coefficient de corrélation ; P= niveau de signification .....71



# SOMMAIRE

*« L'humilité pour un scientifique est d'accepter que rien ne soit impossible. »*

*Marc Lévy*

## **SOMMAIRE**

### **1. INTRODUCTION**

### **2. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

2.1. Présentation de l'espèce .....	07
2.1.1. Classification de l'espèce .....	07
2.1.2. Anatomie de l'espèce .....	08
2.1.2.1. Anatomie externe .....	08
2.1.2.2. Anatomie interne.....	08
2.1.3. Biotope et distribution.....	10
2.1.4. Régime alimentaire .....	12
2.1.5. Cycle biologique .....	12
2.1.6. Cycle reproducteur et distinction des sexes .....	13
2.2. Présentation du golfe d'Annaba.....	15
2.3. Collecte et élevage .....	16
2.4. Présentation et traitement du cadmium.....	18
2.4.1. Présentation du cadmium .....	18
2.4.2. Exposition au cadmium et prélèvement des tissus.....	19
2.4.2.1. Prélèvement de l'hémolymphe.....	19
2.4.2.2. Prélèvement des gonades .....	20
2.5. Analyse des biomarqueurs .....	20
2.5.1. Extraction des vitellogénines et vitellines.....	20
2.5.2. Dosage des vitellogénines et vitellines .....	22
2.6. Etude électrophorétique .....	23
2.6.1. Extraction et dosage de la vitellogénine et de la vitelline.....	23
2.6.2. Séparation électrophorétique.....	23
2.6.3. Montage de l'appareil.....	23
2.6.4. Dépôt des échantillons et migration .....	24
2.6.5. Coloration.....	26
2.6.6. Décoloration.....	26
2.7. Etude histologique.....	26
2.7.1. Techniques histologique .....	26
2.7.1.1. Fixation.....	26

2.7.1.2. Pré-inclusion.....	26
2.7.1.3. Inclusion .....	27
2.7.1.4. Réalisation des coupes.....	27
2.7.1.5. Coloration.....	27
2.7.2. Morphométrie des follicules ovariens et des ovocytes .....	28
2.8. Analyse statistique .....	28
<b>3. RÉSULTATS.....</b>	<b>30</b>
3.1. Etude biochimique .....	30
3.1.1. Dosage biochimique des vitellogénines et vitellines.....	30
3.1.1.1. Effet du cadmium sur les taux de vitellogénines en période d'activité sexuelle .....	30
3.1.1.2. Effet du cadmium sur les taux de vitellogénines en période de repos sexuel .....	34
3.1.1.3. Effet du cadmium sur les taux de vitellines en période d'activité sexuelle..	38
3.1.2. Etude électrophorétique.....	42
3.1.2.1. Etude électrophorétique des vitellogénines en période d'activité sexuelle..	42
3.1.2.1. Etude électrophorétique vitellogénines en période de repos sexuel .....	46
3.1.2.1. Etude électrophorétique des vitellines en période d'activité sexuelle .....	50
3.2. Etude histologique.....	54
3.2.1. Effet du cadmium sur la morphométrie de follicules ovariens.....	54
3.2.1.1. Effet du cadmium sur la longueur de follicules ovariens .....	55
3.2.1.2. Effet du cadmium sur la largeur de follicules ovariens .....	57
3.2.1.3. Effet du cadmium sur le volume de follicules ovariens .....	59
3.2.2. Effet du cadmium sur la morphométrie des ovocytes ovariens.....	61
3.2.2.3. Effet du cadmium sur la longueur des ovocytes ovariens .....	62
3.2.2.3. Effet du cadmium sur la largeur des ovocytes ovariens .....	64
3.2.2.3. Effet du cadmium sur le volume des ovocytes ovariens .....	66
3.2.2.3. Effet du cadmium sur le nombre des ovocytes ovariens .....	68
3.3. Test de corrélation.....	70
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>72</b>
4.1. Effet subléta1 du cadmium sur les taux de vitellogénines et vitellines .....	73
4.2. Effet subléta1 du cadmium sur le profil électrophorétique.....	74
4.3. Effet subléta1 du cadmium sur la morphométrie de l'ovaire.....	75
4.4. Dépurati1on du cadmium.....	76

<b>5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	78
<b>6. RÉSUMÉS</b> .....	80
Français.....	80
Anglais.. ..	81
Arabe.....	82
<b>7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	83
ANNEXES : Valorisation scientifique .....	116



# INTRODUCTION

*« La science ne renverse pas à mesure ses édifices ; mais elle y ajoute sans cesse de nouveaux étages et, à mesure qu'elle s'élève davantage, elle aperçoit des horizons plus élargis. »*

*Berthelot*

### **1. Introduction**

La pollution environnementale est l'un des principaux défis auxquels l'humanité est confrontée aujourd'hui (**Ramzan et al., 2022**). Cette pollution s'est amplifiée ces dernières années et a soulevé de nombreuses inquiétudes dans la communauté scientifique mais aussi parmi les dirigeants et les citoyens (**Fan et al., 2020**). En effet, l'urbanisation croissante, l'activité intensive de l'agriculture et le développement industriel chimique depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle, sont à l'origine d'une contamination majeure dans les milieux naturels (**Ukaogo et al., 2020**). Cette contamination s'est diffusée au niveau des compartiments abiotiques fondamentaux des milieux (air, sol et eau) à différentes échelles du temps et a eu pour conséquence de nombreux effets néfastes sur la faune et la flore mais aussi sur la santé humaine (**Binelli et al., 2015 ; Lionetto et al., 2019**).

Les milieux marins jouent un rôle socio-économique et écologique important en fournissant de nombreux avantages aux humains et sont donc classés comme des services écosystémiques (**Barbier, 2017 ; Bryhn et al., 2020**). Néanmoins ils sont continuellement exposés à une grande variété de polluants et de micropolluants, comprennent, les produits pharmaceutiques, les déchets plastiques et leurs produits chimiques connexes, les polluants organiques et inorganiques (**Lloyd-Smith et al., 2018**).

Les métaux lourds font partie des polluants inorganiques qui constituent un danger pour l'environnement et la santé des êtres vivants (**Wu et al., 2016 ; Khemis et al., 2017**). En effet, contrairement aux polluants organiques susceptibles de se dégrader, les polluants métalliques dans un premier temps sont persistants dans l'environnement (**Amankwaa et al., 2021**), en particulier dans les sédiments des hydrosystèmes, vu leur faible biodégradation (**Larrose et al., 2010 ; Diop, 2014 ; Saher & Siddiqui, 2016**). Et d'autre part en raison de leur capacité de bioaccumulation dans les tissus (**Gupta et al., 2019 ; Kumar et al., 2019a ; Siregar et al., 2020**).

Le cadmium est un métal lourd de symbole Cd, et de numéro atomique 48, de couleur blanc brillant, il n'est pas essentiel au développement des organismes vivants 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 de s'accumuler dans les tissus (**Martin-Garin & Simon, 2004**). Le Cd est très persistant chez l'homme et sa demi-vie biologique est de 10 à 35 ans (**World Health Organization, 2019**), il

fait partie des "trois grands" en termes de toxicité (**Moawad et al., 2020**). En effet, les trois métaux lourds les plus connus pour leur dangerosité sont le plomb (Pb), le mercure (Hg) et le cadmium (Cd) (**Pont et al., 2010**). Ces principales sources anthropiques sont les mines et les industries métallurgiques telles que les batteries, les pigments, les alliages, la galvanoplastie et le revêtement, le ciment et les stabilisateurs pour les plastiques (**Zou et al., 2014**).

Le cadmium peut entraîner à l'échelle de l'organisme même à de très faibles concentrations d'importantes perturbations du système nerveux, reproducteur, cardiovasculaire, immunitaire, gastro-intestinal, hépatique, rénal, et respiratoire (**Cheng et al., 2021**). Chez les mollusques et les crustacés, ces effets toxiques affectent tous les stades de développement embryonnaire et peuvent aussi causer des désordres au niveau des fonctions reproductrices en particulier sur la fonction du système endocrinien (**Rao et al., 2007 ; Baudrimont et al., 2019**). Par conséquent, les recherches sur la toxicité sublétales s'avèrent nécessaire pour la compréhension des effets toxiques autres que létaux, puisque ce sont eux qui expriment le plus souvent les situations réelles de pollution de l'environnement (**Mouabad, 1991 ; Dutta et al., 2017**).

En vue de l'identification, l'estimation et l'évaluation des risques posés par les rejets de ces polluants chimiques dans l'environnement, des programmes de biosurveillance (ou biomonitoring en terme anglo-saxon) ont été mis en place au niveau national et international et s'avèrent d'une nécessité croissante, ils sont généralement définis comme « l'utilisation systématique des organismes vivants ou de leurs réponses pour déterminer l'état et/ou les changements de l'environnement » (**Yang et al., 2008 ; Al-Alam , 2017**). Ces programmes de biosurveillance sont basés sur deux approches complémentaires, les bioindicateurs et les biomarqueurs (**Viarengo et al., 2007 ; Carreira et al., 2013**).

Au sens écologique général, un bioindicateur peut être défini comme un organisme ou une communauté d'organismes pertinents chez lesquels la réponse est mesurée (biochimique, génétique, enzymatique, physiologique, morphologique, comportementale, structurelle et/ou fonctionnelle), renseigne sur la présence et/ou l'impact des polluants dans l'environnement dans lequel ils vivent (**IPCS, 2004 ; Markert, 2007 ; Fränze, 2006**). En effet, certaines espèces sont très sensibles aux variations des conditions environnementales, qu'elles soient d'origine biotique ou abiotique. Tous ces changements, peuvent, s'ils sont bien utilisés, constituer des outils précoces et fiables, pour détecter une dégradation et une restauration du milieu (**Figueira et al., 2009 ; Wu et al., 2010**). La plupart des organismes

bioindicateurs utilisés à l'heure actuelle dans la biosurveillance des milieux marins sont des espèces planctoniques, des poissons, et essentiellement des mollusques (**Fossi-Tankoua et al., 2013**).

Les mollusques bivalves ont attiré l'attention des chercheurs dans le domaine de la bioindication et du biomonitoring (**Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2003**). Ceci en raison de leur sensibilité, reproductibilité et la pertinence écologique dont l'abondance spatiale et temporelle, la facilité d'échantillonnage et la gamme de réponses biologiques détectables pour bien représenter les phénomènes en cause de la pollution, en plus de leur grande capacité de bioaccumulation (**Ji et al., 2015**).

Les Mollusques Bivalves sont des bons indicateurs biologiques de l'état de santé et de la contamination du milieu marin (**Mejdoub et al., 2017**). De plus, au vu de leur capacité de filtration, ces espèces sentinelles ont la capacité de filtrer de grands volumes d'eau (entre 3 et 5 litres par heure) (**Aguirre-Martínez, 2021**), de leur mode de vie sédentaire, de leur large distribution, de leur espérance de vie relativement grande et leur capacité à accumuler les polluants. Les Mollusques Bivalves sont réputés pour être d'excellents bioindicateurs d'une grande utilité dans les programmes de biosurveillance active ou passive (**Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2005 ; Schulte-Oehlmann, 2003 ; Coelho et al., 2006 ; Waykar & Deshmukh, 2012**). De nombreuses espèces de Bivalves ont été utilisées dans ces programmes de biosurveillance dont *Mytilus galloprovincialis*, *Ruditapes decussatus*, *Perna perna* et *Donax trunculus* (**Fernández-González et al., 2021 ; De Sousa et al., 2011 ; Silva Dos Santos et al., 2022 ; Beldi et al., 2006 ; Merad et al., 2018 ; Sifi & Soltani, 2019 ; Tili & Mouneyrac, 2019**).

D'autres part, Les biomarqueurs apparentés à l'utilisation des indicateurs biologique sont apparue comme une alternative complémentaire pour appréhender l'état des milieux (**Ferrat, 2011**). Ils sont, définis comme des changements observables et/ou mesurables au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, révélant l'exposition présente ou passée d'un individu à un polluant, ils sont réputés comme des indicateurs précoces et sensibles de la dégradation de la santé des organismes (**Amiard, 2017 ; Martínez-Morcillo et al., 2020**). Ces biomarqueurs sont notamment utilisés à fin de connaître les mécanismes d'adaptation et de dépuration des organismes face aux polluants (**Sanghvi et al., 2003 ; Sundin et al., 2019 ; Heiba et al., 2021**). De nombreux biomarqueurs biochimiques et cellulaires spécifiques, mais aussi non spécifiques ont été mesurés chez les

organismes bioindicateurs marins (**Tlili et al., 2013 ; Schoonover et al., 2016 ; Magni et al., 2017 ; Sifi & Soltani, 2019**). À titre d'exemples : les biomarqueurs neurotoxiques (**Guo et al., 2021**) ; les biomarqueurs du stress oxydatif (**Vodiasova et al., 2021**) ; les biomarqueurs génotoxiques (**Klingelfus et al., 2017 ; Delmond et al., 2019**) ; les biomarqueurs de reprotoxicité (**Gallo & Tosti, 2020 ; Xu et al., 2022**).

Les biomarqueurs impliqués dans le processus reproductif ou les biomarqueurs de reprotoxicité sont de plus en plus pris en considération. Parmi ces biomarqueurs, la vitellogénine (Vtg), est une glyco-lipo-phosphoprotéine précurseur de la synthèse des vitellines. Chez les mollusques bivalves benthiques, la synthèse des Vtg est réalisée dans la glande digestive puis sécrétée dans l'hémolymphe (**Blaise et al., 1999 ; Li et al., 1998 ; Jubeaux, 2015**) ensuite transportée vers les ovaires par le système circulatoire, où elle est internalisée dans les ovocytes en croissance par le biais de l'endocytose médiée par les récepteurs et est ensuite clivée par protéolyse pour générer les protéines vitellines (**Simon et al., 2010**).

La vitelline (Vn), est une glycolipoprotéine, qui fournit des nutriments aux embryons en développement (**Sun et al., 2015 ; Adhya et al., 2017**). Les Vtg et Vn jouent des rôles importants lors de la reproduction et leurs mises en évidence chez les mollusques, et en particulier chez les bivalves confirme que ce sont des biomarqueurs biochimiques spécifiques, sensibles et pertinents pour évaluer l'exposition de ces organismes à des contaminants œstrogéniques (**Wheeler et al., 2005 ; Matozzo et al., 2008 ; Tran, et al., 2019**). En effet, les informations fournies par de nombreux travaux tendent à indiquer que la modulation de la synthèse de la Vtg chez les bivalves est sensible à l'exposition de perturbateurs endocriniens (PE) du type œstrogénique. (**Quinn et al., 2004 ; Andrew et al., 2008 ; Ciocan et al., 2010 ; Gnatyshyna et al., 2020 ; Fabrillo et al., 2020**).

L'étude histologique des ovaires est un outil extrêmement utile pour évaluer les variations structurelles des ovocytes, et peut être utilisée comme un complément aux biomarqueurs de reprotoxicité (**Costa et al., 2013 ; Cuevas et al., 2015**). Pour évaluer son utilité dans les études toxicologiques chez les mollusques bivalves, **Lango-Reynoso et al. (2000)**, indiquent qu'il existe plusieurs moyens d'évaluer les altérations morphologiques des ovaires : (a) l'observation visuelle en relation avec la taille, la forme et la couleur relatives des gonades ; (b) l'indice gonadique ; (c) la morphométrie des ovocytes et de follicules ovariens ; ou (d) le nombre d'ovocytes par follicules ovariens et les anomalies histopathologiques (**Puljas &**

Lukić, 2021). La morphométrie des ovocytes et de follicules ovariens peut être également un bon biomarqueur à l'échelle de l'individu (Yasmeen & Pathan, 2021).

Le golfe d'Annaba est la zone côtière touristique et économique la plus importante située à l'est de l'Algérie. Cependant, ses ressources halieutiques sont menacées par une pollution liée à une activité économique en plein essor. Une large gamme de contaminants d'origine urbaine, agricole, portuaire et industrielle est rejetée dans cette zone. Des travaux antérieurs ont permis de déceler une contamination métallique importante dans cette région (Beldi *et al.*, 2006 ; Guendouzi *et al.*, 2020). Divers éléments traces métalliques y compris le cadmium ont été détectés dans les sédiments et les tissus d'une espèce bioindicatrice de la pollution *Donax trunculus*.

*Donax trunculus*, est un mollusque bivalve comestible, filtreur et sédentaire, très répandu dans le golfe d'Annaba ; il a fait l'objet de nombreux travaux concernant sa biologie, son écologie et sa reproduction dans divers biotopes, en Atlantique (Guillou et Le Moal, 1980 ; Guillou et Bayed, 1991) et en Méditerranée (Mouëza, 1971 et 1975 ; Mouëza & Frenkiel-Renault, 1973 ; Ansell et Bodoy, 1979 ; Neuberger- Cymik *et al.*, 1990 ; Benchamma, 1995 ; Ramon *et al.*, 1995 ; Boussoufa *et al.*, 2012 ; Tlili *et al.*, 2010 ; 2011 ; 2013 ; Hamdani *et al.*, 2020 ; Patiño *et al.*, 2021 ; Lamine *et al.*, 2021). Cette espèce est couramment utilisée dans les études de surveillance environnementales comme espèce sentinelle des zones méditerranéennes (Tlili & Mouneyrac, 2019).

En continuité avec les travaux antérieurs, et dans le contexte d'un programme national de biosurveillance des eaux du golfe d'Annaba mené depuis l'année 2002, en utilisant *Donax trunculus* comme espèce bioindicatrice de la pollution ; et en raison de leur rôle écologique et économique non négligeable dans le golfe (Soltani *et al.*, 2015).

Cette thèse a pour objectif d'évaluer la toxicité aiguë (96 heures) des concentrations sublétales du cadmium (CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub>), sur l'aspect reproductif des femelles de *Donax trunculus*. Ces concentrations ont été déterminées précédemment par Merad et Soltani (2015). Les expériences ont été menées au niveau du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée. En considérant la période d'activité sexuelle et la période de repos sexuel du cycle sexuel de *D.trunculus*. D'autres part, elle vise également à évaluer la capacité de *D. trunculus* à surmonter le stress chimique induit lors de l'exposition au cadmium, en transvasant ces espèces dans une eau non contaminée ; la présentation des résultats de cette thèse se décline

en trois parties:

**La première partie** consiste à évaluer les effets sublétaux du cadmium sur les teneurs en vitellogénines et vitellines au niveau de l'hémolymphe et des ovaires de *Donax trunculus* respectivement, et durant la phase d'exposition et de dépuration.

**La seconde partie** est consacrée à l'impact des concentrations sublétales du cadmium sur les profils protéiques des vitellogénines et vitellines chez *Donax trunculus* en réalisant une étude électrophorétique durant la phase d'exposition et de dépuration.

**La troisième partie** est relative à une étude histologique des ovaires de *Donax trunculus* en phase d'exposition.



# MATÉRIEL ET MÉTHODES

*«Si l'on considérait une théorie comme parfaite et si l'on cessait de la vérifier par l'expérience scientifique, elle deviendrait une doctrine.»*

*Claude Bernard*

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Présentation de l'espèce

*Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) est un Mollusque Bivalve marin à symétrie bilatérale (Bellon-Humbert, 1962 ; Fischer *et al.*, 1987), de la famille des Donacidae (Poutier, 1978). Sa taille maximale atteint les 5cm (Fischer *et al.*, 1987) mais ne dépasse pas 3,9 cm sur les côtes algéroises (Mouëza & Frenkiel-Renault, 1973 ; Ansell *et al.*, 1980 ; Rabie, 2020 ; Ammamra, 2021). Dans le golfe d'Annaba sa taille est d'une classe moyenne de  $27 \pm 1$  mm (Aouadene, 2003 ; Sifi *et al.*, 2007; Hamdani, 2013 ; Hafsaoui, 2017 ; Rabie, 2020). Cette espèce est connue sous l'appellation de telline, lion tronqué ou flat tellin (Fischer *et al.*, 1987), et est plus généralement désignée par les pêcheurs de la baie d'Annaba par le terme «haricot de mer» (Théband *et al.*, 2005). C'est une espèce comestible et très consommée dans les pays méditerranéens (Pinello *et al.*, 2020). La production mondiale de *D.trunculus* a été estimée à 975 tonnes en 2008 (Statistiques FAO, 2010) dont 347 tonnes en Méditerranée.

#### 2. 1. 1. Classification de l'espèce

La classification des Mollusques Bivalves se base sur plusieurs critères à savoir, la forme de la coquille, la charnière et la structure des branchies (Bellon-Humbert, 1962). La position systématique de *D. trunculus* d'après le World Register of Marine Species (WoRMS) (Gofas, 2021) est la suivante :

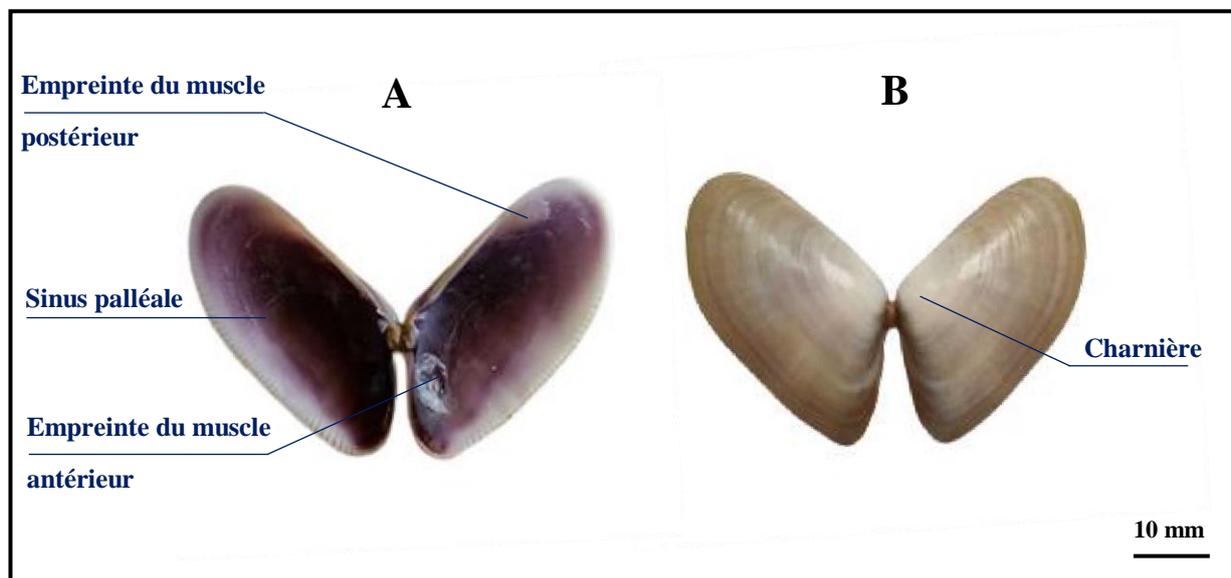
**Tableau 1** : Position systématique de *D.trunculus*.

Règne	<b>Animal</b>
Embranchement	<b>Mollusca</b>
Classe	<b>Bivalvia Linnaeus, 1758</b>
Sous-classe	<b>Heterodonta Neumayr, 1884</b>
Ordre	<b>Veneroida Gray, 1854</b>
Superfamille	<b>Tellinoidea Blainville ,1814</b>
Famille	<b>Donacidae Fleming, 1828</b>
Genre	<b>Donax Linnaeus, 1758</b>
Espèce	<b><i>Donax trunculus</i> Linnaeus, 1758</b>

## 2. 1. 2. Anatomie de l'espèce

### 2.1.2.1. Anatomie externe

La coquille de *Donax trunculus* est une équivalves cunéiforme, avec le postérieur plus long que l'antérieur. La coquille peut être trouvée dans des couleurs allant de l'olive, en passant par le châtaignier, jusqu'au blanc-jaune et mesure plus 25 mm de large (Pinello *et al.*, 2020). Elle est composée de deux valves calcifiées qui recouvrent les côtés droit et gauche du corps, et qui s'articulent dorsalement autour d'un dispositif marginal appelé charnière qui est munie de deux petites dents cardinales et des dents latérales à chaque valve (Lucas, 1965), et d'une structure élastique très imparfaitement calcifiée, le ligament. Sous l'action de ce dernier, la coquille tend à s'ouvrir par contraction des muscles adducteurs qui s'insèrent chacun sur la face interne des deux valves où leur empreinte est généralement visible (Bougis, 1976). La surface externe des valves est pratiquement lisse, de couleur blanche jaunâtre ou brunâtre, uniforme extérieurement ; ou variablement ornée de rayons et de bandes concentrique généralement violacés, brunâtres, ou grisâtres ; l'intérieur blanc, est souvent largement maculé de violet, brunâtre ou orangé en deux régions intégrales (Fischer *et al.*, 1987) (Fig. 1).



**Figure 1.** Morphologie interne (A) et externe (B) de la coquille de *D. trunculus* (G×3) (Photo personnelle).

### 2.1.2.2. Anatomie interne

*Donax trunculus* est une espèce fouisseuse caractérisée par un corps mou acéphale, non segmenté, comprimé latéralement, il est enveloppé par un manteau (Gagnaire, 2005),

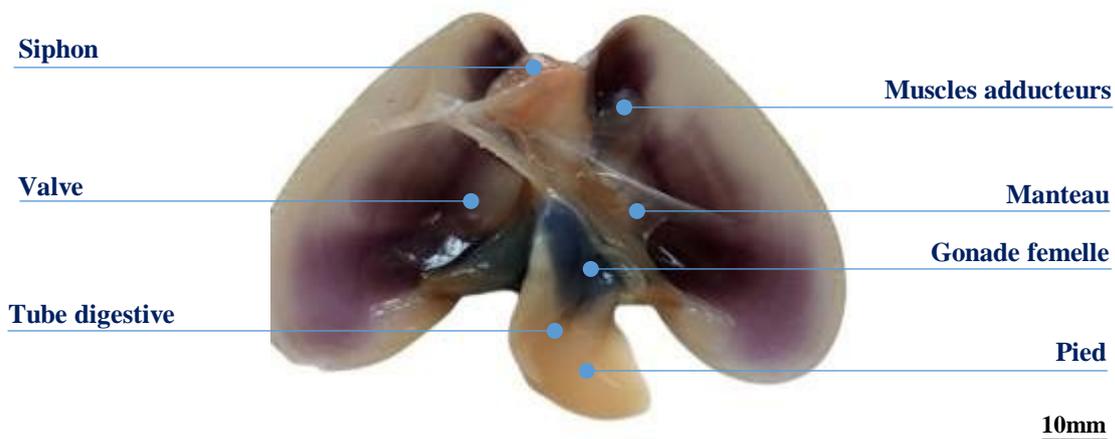
constitué d'épithélium associé à des fibres musculaires, il joue un rôle dans l'accumulation des réserves, mais son rôle principal est d'assurer la formation de la coquille. Les bords externes du manteau sont plus ou moins soudés, formant vers l'arrière deux siphons (Fisher *et al.*, 1987), permettant l'entrée de l'eau dans la cavité palléale (siphon inhalant) ou son rejet vers l'extérieur (siphon exhalant) (Lucas, 1965). Les deux lobes du manteau délimitent la cavité palléale où se localisent les branchies qui sécrètent et supportent chacune des deux valves (Lucas, 1965). Les branchies sont de type lamelibranche (Mouëza, 1971) assurant la capture et le transport de la nourriture, ainsi que la respiration (Moullac *et al.*, 2009).

### A. Le pied

Organe musculueux ventral et turgescents, constitue un solide point d'ancrage pour l'animal (Mouëza, 1971), il permet de s'enfouir dans l'habitat sableux et assurer la locomotion (Fisher *et al.*, 1987) (Fig. 2).

### B. Le ligament

Est un fuseau ou un secteur de cylindre fixé aux bords dorsaux des valves, il assure l'écartement passif des valves (Myrand *et al.*, 2007). Il se compose surtout de conchyoline (substance analogue à la chitine). Le ligament est sécrété par le manteau au niveau de la zone dorsale située entre ses deux lobes (isthme palléal).



**Figure 2.** Anatomie interne de *Donax trunculus* (Gx4) (Photo personnelle).

### C. Le manteau

Il enveloppe le corps de l'animal, comme un vaste pardessus, fixé à la région dorsale, constitué de deux lobes qui sécrètent et supportent chacun une des valves de la coquille, les bords externes du manteau sont parfois plus ou moins soudés, formant vers l'arrière deux siphons (Grasse *et al.*, 1970).

#### **D. Les muscles adducteurs**

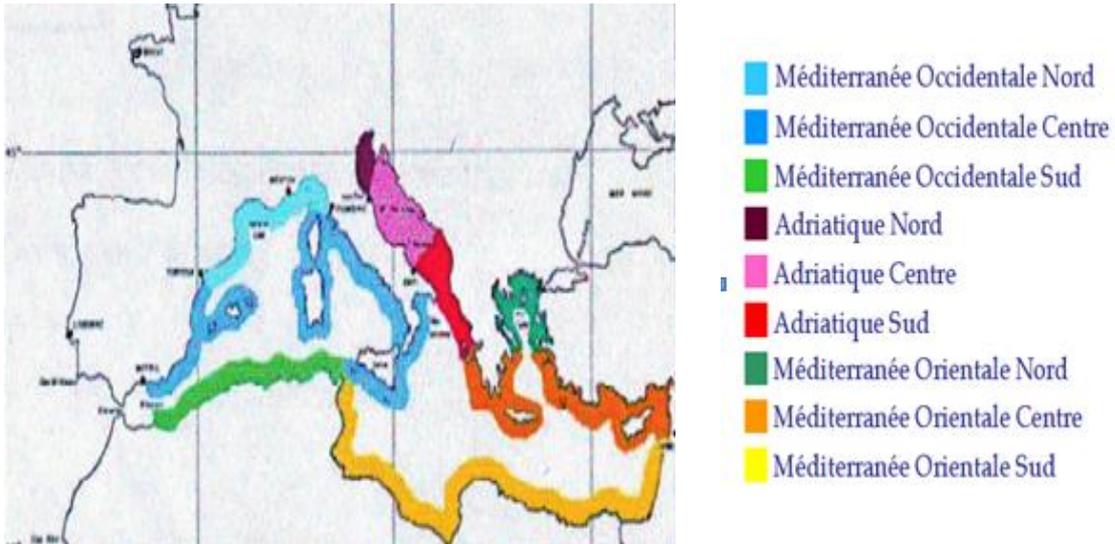
Ils s'insèrent perpendiculairement aux valves, s'opposent à l'action mécanique du ligament et ferment la coquille, ils marquent sur la face interne des valves leurs insertions sous la forme « d'impressions » (Grasse *et al.*, 1970).

#### **E. Le tube digestif**

L'œsophage est un tube court qui aboutit dans un vaste estomac, a paroi plissée criblée de trous qui sont les orifices des diverticules digestifs, lesquels se ramifient beaucoup et se terminent en cæcum par des acini de la glande digestive (hépatopancréas) responsable des sécrétions d'enzymes digestives et stockage des réserves (Edouard & Christian, 1992).

#### **2.1.3. Biotope et distribution spatiale**

L'habitat préférentiel de *D. trunculus* correspond généralement à des sables fins dont la médiane granulométrique est de 0,12 mm (Guillou & Le Moal, 1980), Beldi (2007) signale que *D. trunculus* colonise les petits fonds du golfe d'Annaba, constitués essentiellement de sable fin et moyen, à environ 1,20 m de profondeur dans l'eau au niveau de la couche superficielle du sédiment (Sifi *et al.*, 2007), dont les densités sont de l'ordre de 150 à 550 individus/m<sup>2</sup> (Mouëza, 1972; Beldi, 2007) (Fig.4). Les juvéniles de 2 à 5 mm s'installent à des profondeurs plus importantes qui peuvent atteindre jusqu'à 5 m en Atlantique, et 6 m en Méditerranée (La Valle, 2005 ; Gaspar *et al.*, 2002 ; La Valle *et al.*, 2011), alors qu'au cours de leur croissance ils gagnent progressivement les fonds de 1m où ils vivent à l'état adulte. Ce type de migration de croissance est l'une des caractéristiques du genre *Donax* (Guillou & Le Moal, 1980). *D. trunculus* résiste bien aux variations des facteurs physico-chimiques du milieu dans la mesure où ces variations ne sont pas trop brutales (Marobin *et al.*, 2007). La distribution spatiale des populations de *D. trunculus* est modulée par plusieurs facteurs tels que l'amplitude des marées (Gaspar *et al.*, 2002), la température (Botelho *et al.*, 2018), la granulométrie des sédiments (De la Huz *et al.* 2002, La Valle *et al.*, 2011) et la pression de la pêche (Marie *et al.*, 2016) et le parasitisme (Delgado *et al.*, 2017). Ainsi on la trouve sur les côtes de l'Europe occidentale et de l'Afrique de l'Ouest jusqu'au Sénégal, ainsi que dans les pays de l'Union européenne (Pinello *et al.*, 2020). *D. trunculus* s'étend le long de la côte française atlantique, la péninsule ibérique et l'Afrique du Nord (Ibrahim *et al.*, 2015 ; Delgado *et al.*, 2017) et est largement répandue en Mer Noire et en Méditerranée (Bayed, 1990 ; Tlili & Mouneyrac, 2019) (Fig. 3).



**Figure 3.** Distribution spatiale de *D.trunculus* ([www.gbif.org/species/5729032](http://www.gbif.org/species/5729032), 2020).

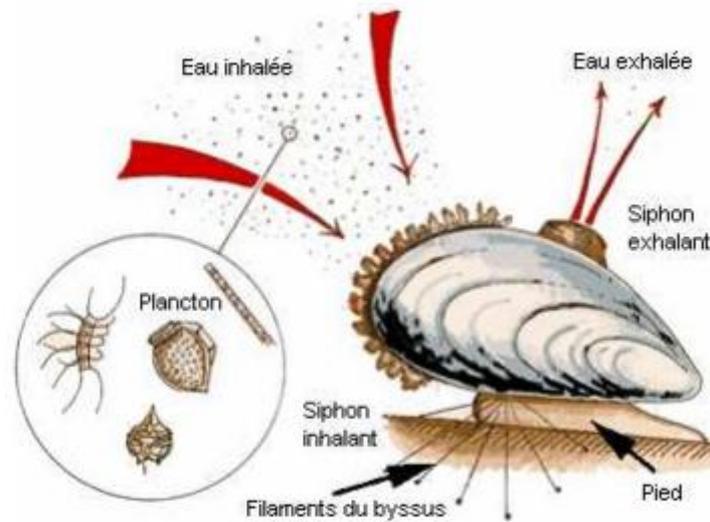


**Figure 4.** Localisation de *D.trunculus* dans son biotope (<https://image.ifremer.fr/>).

#### **2.1.4. Régime alimentaire**

*D. trunculus* est un filtreur suspensivore (Manca-Zeichen *et al.*, 2002), qui se nourrit principalement de la matière organique présente dans l'eau, sélectionnant les éléments par la taille et non pas selon leur nature (plancton, bactéries, particules, assimilables). Il absorbe les particules en suspension les plus fines ou récolte celles déposées sur le sédiment grâce à son siphon allongé (Mouëza & Chessel, 1976).

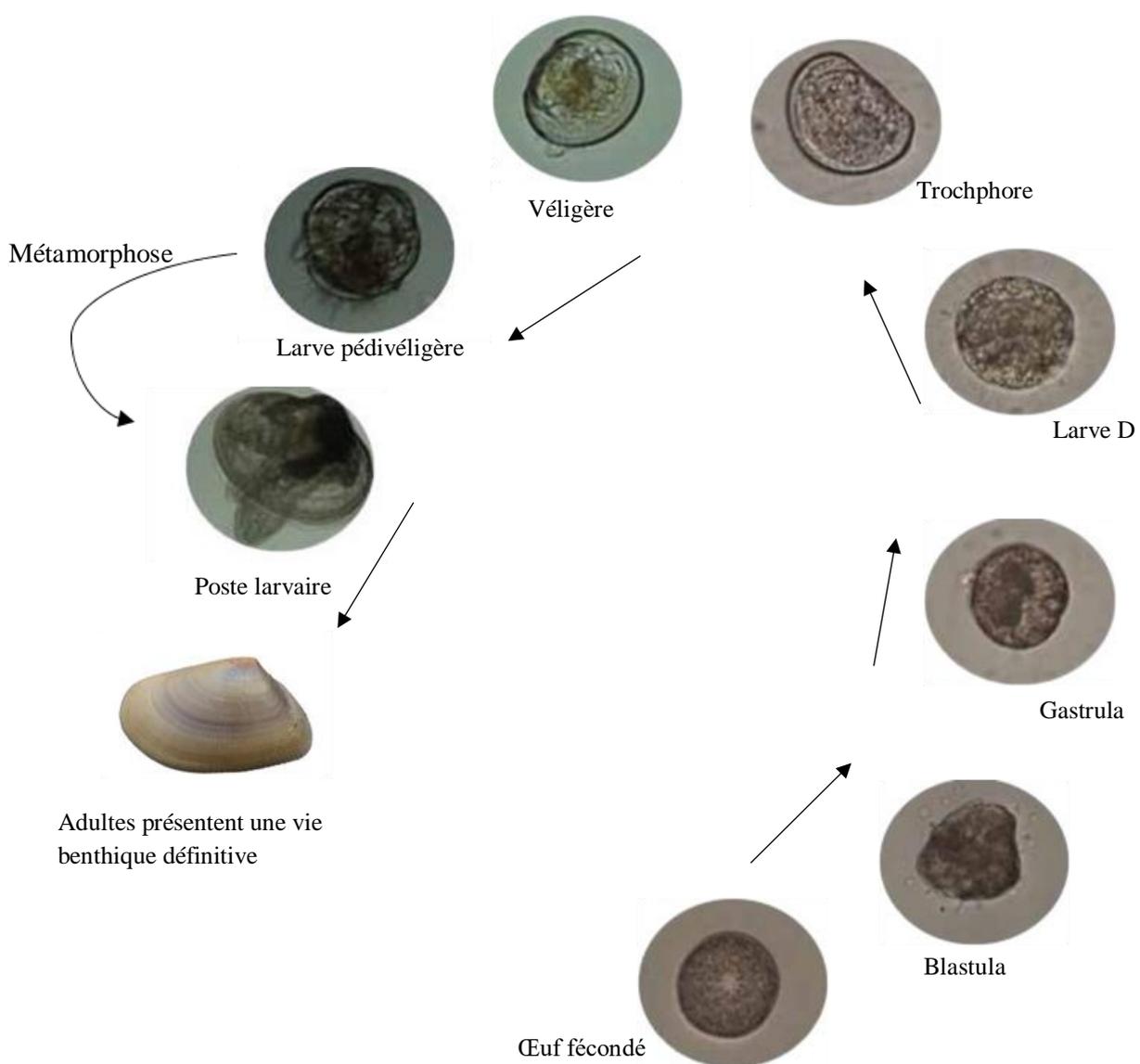
Cette espèce assure ces échanges avec le milieu extérieur par une circulation constante d'eau véhiculant nourriture et oxygène à travers la cavité palléale ce qui permet la collecte des particules en suspension (**Degiovanni & Mouëza, 1972**) (**Figure 5**).



**Figure 5.** Filtration au niveau des branchies chez les Bivalves ([www.huitres-de-bretagne.com/media/render/index/id/21](http://www.huitres-de-bretagne.com/media/render/index/id/21)).

### 2.1.5. Cycle biologique

*D. trunculus* est une espèce gonochorique à fécondation externe, les gamètes sont expulsés dans le milieu extérieur où a lieu la fécondation. Les œufs fécondés ont une forme sphérique (70-80  $\mu\text{m}$  de diamètre), puis ces derniers subissent une série de clivages extrêmement réguliers donnant lieu à un arrangement en "spirale" des blastomères jusqu'à la formation de la blastula. Après la segmentation, la larve blastula subit la gastrulation donnant naissance à une larve nageuse, muni d'une couronne ciliée ; c'est la larve trochophore (**Prieur, 1971**). Ensuite on aboutit à la formation de la larve D, puis la larve véligère et enfin la larve pédivéligère (**Ruiz-Azcona, 2020**) (**Figure 6**). A ce stade, les larves nagent activement, elles restent planctoniques quelques jours ou quelques semaines puis se fixent pour se métamorphoser. La métamorphose conduit à la vie benthique définitive, elle dure environ 19-23 jours à 21°C (**Otero, 1982, Hamdani, 2013**).



**Figure 6.** Cycle biologique de *Donax trunculus* (Ruiz-Azcona, 2020).

### 2.16. Cycle reproducteur et distinction des sexes

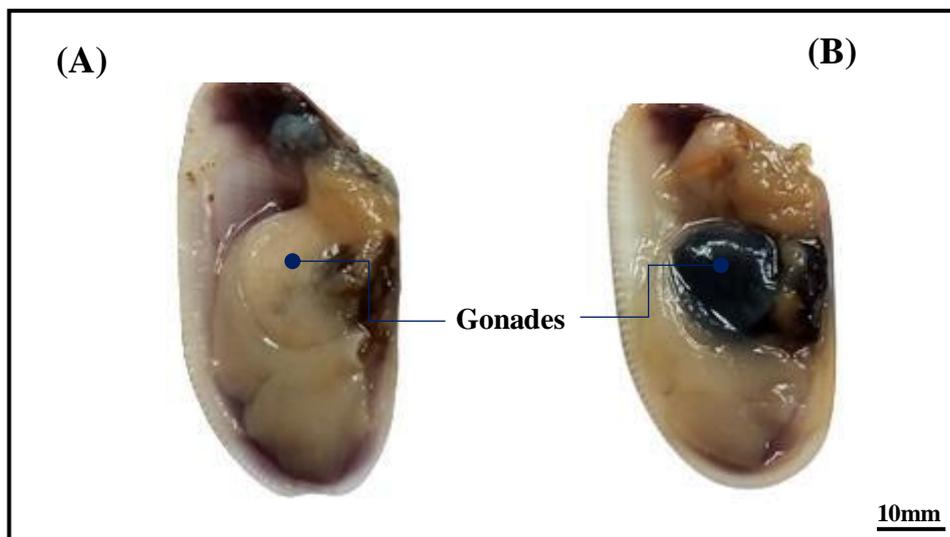
Le cycle de reproduction de *D. trunculus* est régulé par l'action de plusieurs facteurs environnementaux naturels (tels que la température et la disponibilité de la nourriture) et un ensemble de facteurs endogènes (tels que l'équilibre des hormones stéroïdiennes et le métabolisme) (Mouneyrac *et al.*, 2008). *D. trunculus* se reproduit à l'âge d'un an environ lorsqu'elle a atteint 1 cm de longueur (Lucas, 1965 ; Mouëza & Frankiel-Renault, 1973 ; Hafsaoui, 2017). Dans le golfe d'Annaba, le cycle sexuel de *D. trunculus* présente une période de repos sexuel automnale qui s'étend du mois de Septembre jusqu'au mois de Novembre, où 100% des individus sont au stade 0 (Repos sexuel), il est caractérisé par la réorganisation du

tissu gonadique (Hamdani *et al.* , 2020) suivi d'une période d'activité sexuelle qui s'étend du mois de Décembre au mois d'Août :

- De Décembre à Janvier la majorité des individus sont au stade I (Reprise de l'activité génitale) et II du cycle (la gamétogénèse), cette période est caractérisée par le développement des tubules gonadiques.

- De Février à Août : les individus sont au stade IIIA (maturité morphologique), IIIB (Emission gamétique), IIIC (Redéveloppement de la gonade) et IIID (Arrêt de l'activité génitale et reconstitution des réserves). Cette période est caractérisée par la maturation et l'émission des gamètes (Hamdani *et al.*, 2020). La période de ponte se déroule en été, en même temps que la gamétogénèse et prend fin en automne avec la régression des gonades (Mouëza & Frankiel-Renault, 1973 ; Ansell *et al.*, 1980). La première ponte commence au mois de Mars, et la seconde se déroule au mois d'Août (Hamdani *et al.*, 2020).

La différence entre les deux sexes repose sur la couleur de la gonade durant la période d'activité sexuelle. Les sexes sont bien reconnaissables à l'œil nu. L'ovaire, coloré en bleu nattier par la pigmentation du vitellus, a un aspect grenu. Le testicule, blanc crème, plus finement lobé, a un aspect caractéristique en «chou-fleur» (Lucas, 1965 ; Mouëza & Frankiel-Renault, 1973) (Figure 7).



**Figure 7.** Aspect externe des gonades de *D. trunculus* : mâle (A) et femelle (B) (G×3) (Photo personnelle).

## **2. 2. Présentation du golfe d'Annaba**

Le golfe d'Annaba est situé à l'extrême Nord Est du littoral algérien, limité par le Cap Rosa (8°15' E et 36° 58' N) à l'Est, et par le Cap de Garde (7°16' E et 36°58' N) à l'Ouest, distant de 40 Km avec une profondeur qui ne dépasse pas 65 m. Divers oueds et estuaires se déversent dans la baie, parmi les plus importants: la Mafragh et la Seybouse. Ces Oueds apportent des matières minérales et organiques d'origines agricoles et domestiques (**Khélifi-Touhami et al., 2007**), des effluents urbains (**Khammar, 2007**) et industriels, en particulier les produits phytosanitaires de l'usine FERTIAL (**Saker, 2007**).

Le site choisi au niveau de la baie d'Annaba pour le prélèvement des échantillons est le site El-Battah (36° 50' N et 7° 50' E) (**Fig. 8**), il se trouve à l'Ouest de l'estuaire de la Mafragh, entre la plage de Chatt et le cap Rosa. Cette zone est caractérisée par son éloignement des sources de pollution et est soumise à un régime hydrodynamique important, avec une intensité qui atteint 0,5 m/s ; ces courants contribuent à la dilution des polluants, de plus il est caractérisé par une forte abondance du matériel biologique utilisé. C'est la raison pour laquelle on a choisi ce site pour le prélèvement des échantillons. L'analyse granulométrique de cette zone, montre que *D. trunculus* colonise des sables moyens purs (**Beldi, 2007**).

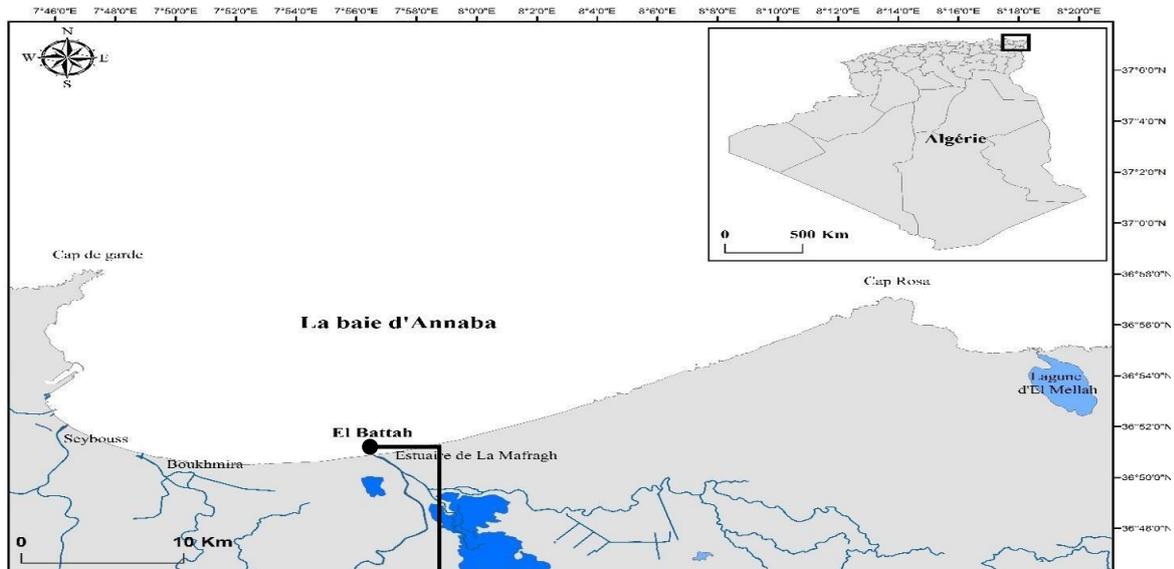


Figure 8. Localisation du site El Battah dans le golfe d'Annaba (Arc gis, modifier).

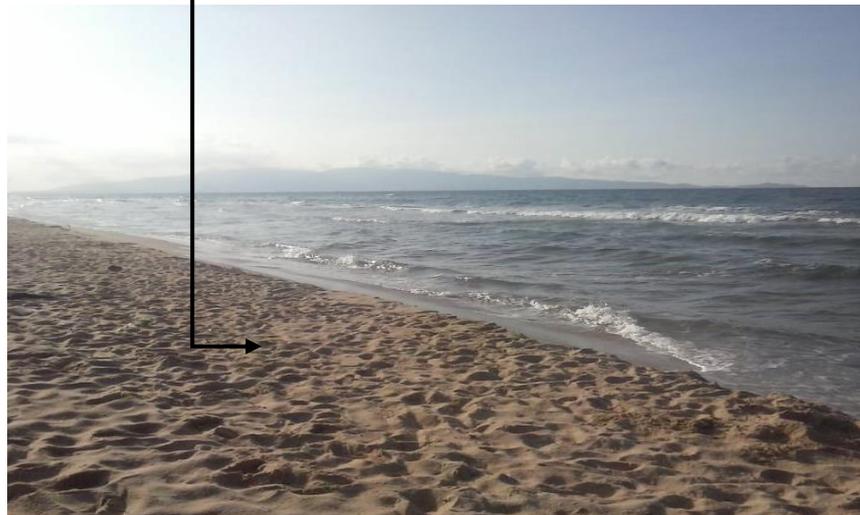
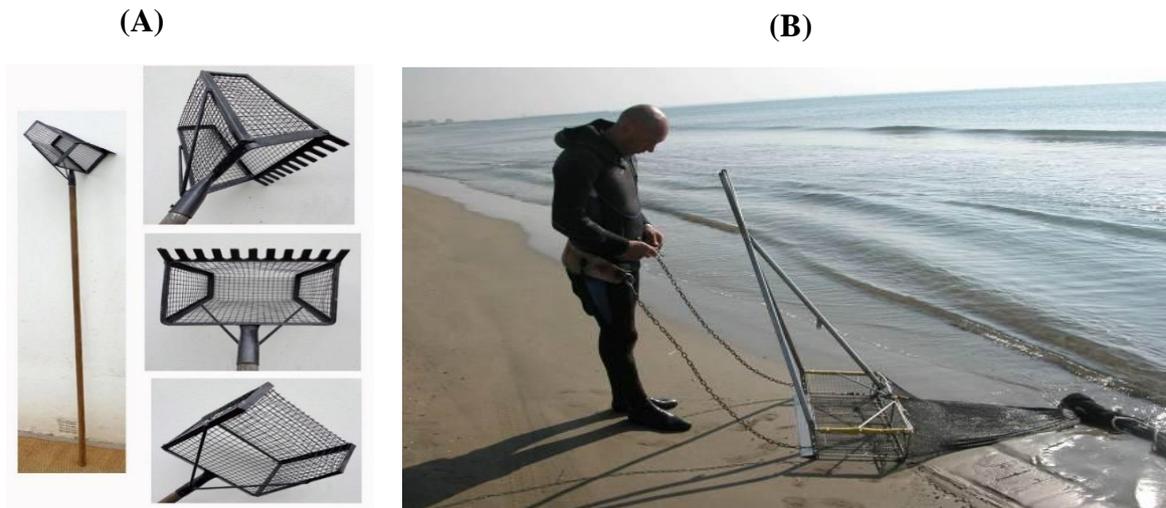


Figure 9. Photographie de la plage El Battah (Photo personnelle).

### 2.3. Collecte et élevage

Les expérimentations ont été effectuées durant l'année (2018) au cours de la période de reproduction printanière (Mars) et au cours du repos sexuel (Novembre). La collecte de *D.trunculus* est effectuée à l'aide d'une grande époussette appelée « Côte » ou tellinier. Ce dernier est accroché par un baudrier à la taille du pêcheur. Le pêcheur recule et tire le tellinier qui vient fouiller le sable à l'aide d'une lame. Les coquillages sont ensuite récupérés dans un filet, le maillage du filet ne doit pas être inférieur à 3 millimètres. L'orientation est conduite par une seule personne à une profondeur qui varie de 0,5 à 1 m (Figure 10).

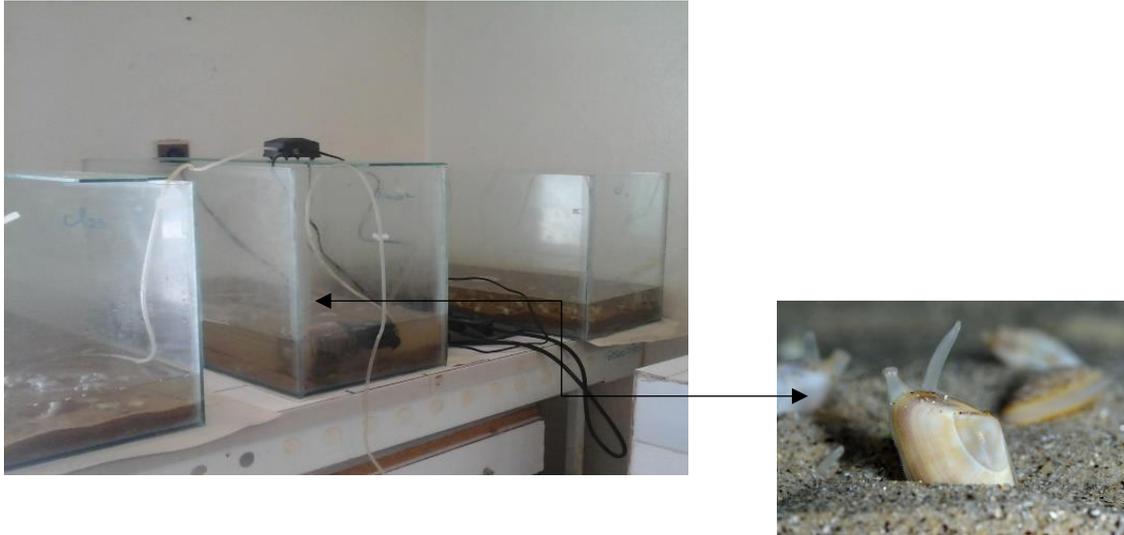


**Figure 10.** Engin de pêche artisanal "le cône" (A), Récolte artisanal de *D. trunculus* (B) ([www.marenritaly.it/conociamo/rete/07.gif](http://www.marenritaly.it/conociamo/rete/07.gif)).

L'échantillonnage a été effectué aléatoirement, 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 leur pêche, pour être élevés au laboratoire. 100 individus dont la taille moyenne est d'environ  $27\pm 1$ mm, sont placés dans des aquariums d'une capacité de 80 L, remplie de 25L d'eau de mer et de 15 cm de sable provenant du site d'échantillonnage, muni d'une pompe à air (Nirox X5). *D. trunculus* a été nourri chaque jour avec un mélange alimentaire commercial (Marine Invertebrate Diet. Carolina Ltd., NC et USA) (**Figure 11**). Lors de la période de reproduction, les femelles ont été sélectionnées pour l'élevage, les organismes ont été acclimatés pendant 48h (**Belabed & soltani, 2013**). Les paramètres physico-chimiques de l'eau de mer ont été relevés à l'aide d'un multiparamètre (Multi 340 i, Germany) (**Fig.12**), la température, le pH, la salinité et l'oxygène dissous ont été considérés. Le tableau ci-dessous récapitule les moyennes des paramètres physico-chimiques considérés tous au long de la période d'expérimentation.

**Tableau 2 :** Paramètres physico-chimique de l'eau de l'élevage de *D.trunculus*

Paramètres physico-chimiques		Température (C°)	Salinité (g/L)	pH	Oxygène dissous (mg/L)
<b>Repos</b>	Exposition	$17.50 \pm 0.49$	$33.50 \pm 0.87$	$8.09 \pm 0.037$	$7.91 \pm 0.37$ mg/L
	Dépuration	$17.80 \pm 0.35$	$34.41 \pm 0.69$	$8.15 \pm 0.020$	$7.50 \pm 0.63$ mg/L
<b>Reproduction</b>	Exposition	$16.32 \pm 0.56$	$32.98 \pm 0.69$	$8.20 \pm 0.036$	$7.80 \pm 0.23$ mg/L
	Dépuration	$16.69 \pm 0.69$	$33.00 \pm 0.71$	$7.94 \pm 0.025$	$8.02 \pm 0.57$ mg/L



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



**Figure 12.** Photo d'un multi-paramètre (Multi 340i) ([www.google.fr/image](http://www.google.fr/image)).

## **2.4. Présentation et traitement au cadmium**

### **2.4.1. Présentation du cadmium**

Le cadmium fut découvert en 1817, c'est un élément métallique malléable, inodore et d'aspect blanc bleuâtre, non essentiel à l'organisme (**Mensi et al., 2008**), naturellement présent dans l'environnement sous forme de trace (**Fassett, 1974 ; Alderdice et al., 1979**). Le Cd est relativement rare, il se répartit de façon uniforme dans la croûte terrestre, il a une grande résistance à l'oxydation et une bonne conductibilité électrique (**Juste et al., 1995**), avec une masse molaire =112,4g/mol (**Adriano, 1986**) et de numéro atomique 48 . C'est un polluant ubiquitaire classé 7eme parmi les 20 principaux toxiques, en raison de son influence négative sur les systèmes enzymatiques cellulaires (**Sanitaditoppi & Gabrielli, 1999**), ayant des

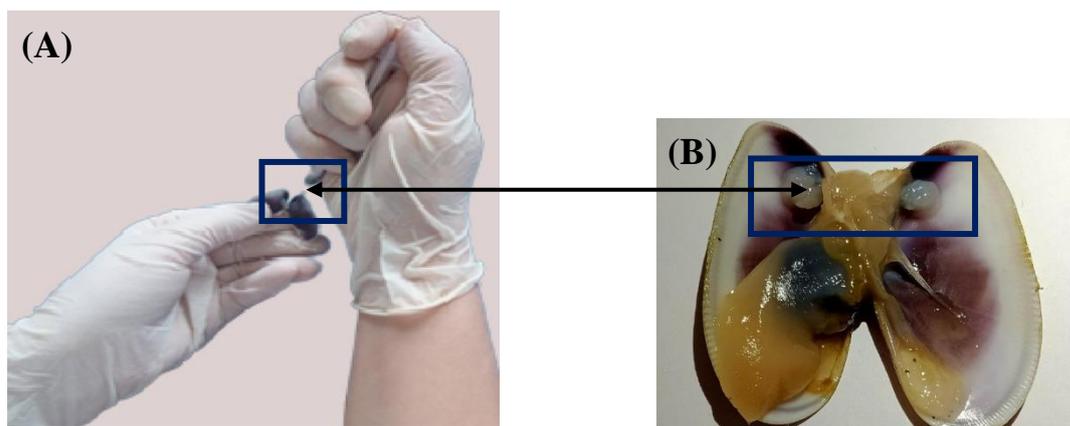
propriétés physiques proches de celles du Zn et du calcium lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus (Sarkar, 2002). Le cadmium est principalement utilisé pour la métallisation des surfaces, dans la fabrication des accumulateurs électriques, des pigments, des stabilisants pour les matières plastiques et des alliages (Hamza-Chaffai, 1993). En zone côtière, lors du mélange des eaux douces avec l'eau de mer, le cadmium forme des complexes très stables avec les chlorures (ATSDR, 2012).

#### 2.4.2. Exposition au cadmium et prélèvement des tissus

Le cadmium a été utilisé sous forme de chlorure de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ , sigma, USA), et additionné à deux concentrations sublétales précédemment déterminées par Merad et Soltani (2015). Les concentrations utilisées sont les suivantes : en période de repos :  $\text{CL}_{10}$  (2,03 mg/L),  $\text{CL}_{25}$  (3,85 mg/L). En période d'activité sexuelle :  $\text{CL}_{10}$  (0,94 mg/L),  $\text{CL}_{25}$  (1,60 mg/L). Après exposition au cadmium, nous avons procédé au prélèvement de l'hémolymphe et de la gonade de *D.trunculus*.

##### 2.4.2.1. Prélèvement de l'hémolymphe

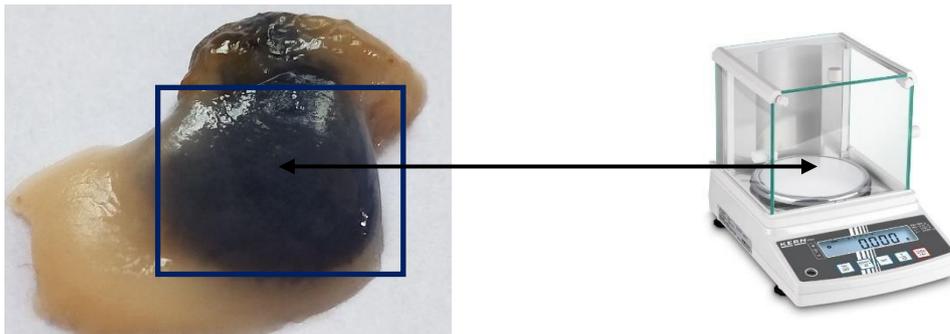
L'hémolymphe est prélevée au niveau du muscle adducteur postérieur, à l'aide d'une aiguille stérile hypodermique montée sur une seringue en plastique de 100  $\mu\text{l}$  (Fig. 13). L'hémolymphe est conservée dans une solution de 1ml de TRIS-HCL-NaCl, la quantité d'hémolymphe prélevée par individu est de 10  $\mu\text{l}$ .



**Figure 13.** Prélèvement de l'hémolymphe (A), du muscle adducteur (B) (G×4) chez *Donax trunculus* (Photo personnelle).

### 2.4.2.2. Prélèvement des gonades

Avant de commencer la dissection toutes les mesures ont été prise afin d'éliminer tous risque de contamination, La dissection et le prélèvement des tissus ont été effectués sur des individus vivants ayant une taille moyenne de  $27 \pm 1$  mm (correspondant à la classe de taille la plus fréquente et la plus abondante tout au long de l'année). Puisque la gonade est diffuse dans la masse viscérale, caractéristique des pélecypodes, il est impossible qu'elle soit dissociée en masse individualisée. La méthode de prélèvement a été décrite par **Enriquez-Diaz (2004)** et **Royer et al., (2008)**, un fragment de tissu est prélevé de façon perpendiculaire à l'axe longitudinal de la masse viscérale (l'axe antéro-postérieur) à l'aide d'un scalpel. La coupe est localisée au milieu de la gonade. Nous avons ensuite procédé à la pesée des tissus grâce à une balance à précision et nous les avons placés dans tubes Eppendorfs avec la solution de conservation adéquate (Vitellogénine et vitelline) avant de les stokers à -20C pour les différents dosages biochimiques prévues (**Figure 14**).

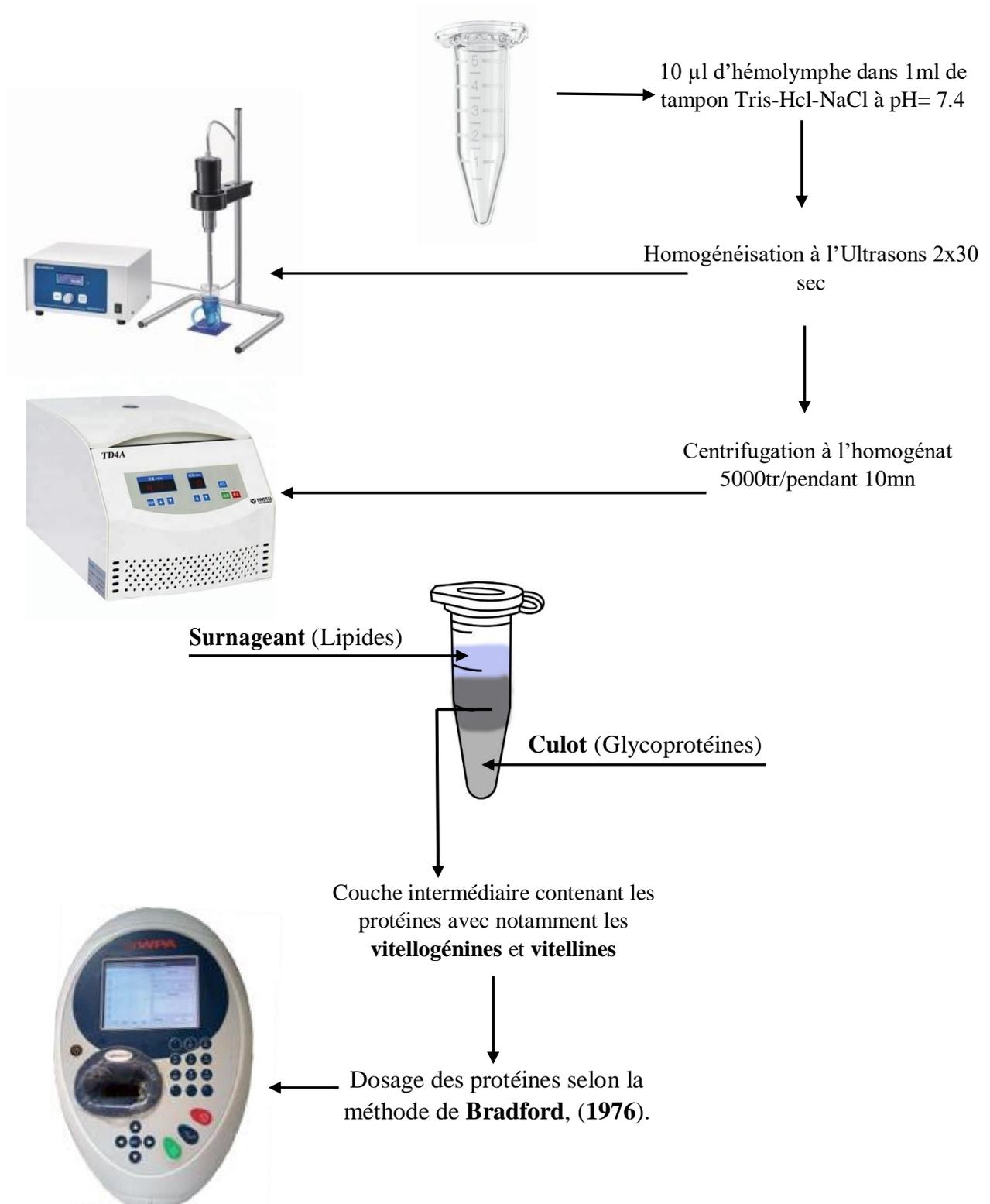


**Figure 14.** Prélèvement et pesé des tissus (Gx4) de *D.trunculus* (Photo personnelle).

## 2.5. Analyse des biomarqueurs

### 2.5.1. Extraction des vitellogénines et vitellines

L'extraction des vitellogénines et vitellines est réalisée selon la méthode de **Descamps, 1996** in **Fabre et al., 1990**. Il en résulte 3 couches distinctes, une couche de surnageant qui représente les lipides, un culot contenant des glycoprotéines et une couche intermédiaire renfermant les vitellogénines et les vitellines (**Fig. 15**). Les échantillons sont extraits dans une solution mère de Tris-HCl, consistant à diluer 3,02 g de tris (0,5 M) dans 300 ml d'eau distillée, puis ajuster cette solution à un pH de 7,4 avec de l'HCl concentré et la compléter à 500 ml d'eau distillée. Pour réaliser le tampon complet : diluer 2,9 g de NaCl (0,5M) dans 10 ml de la solution mère de tris-HCl compléter à 100 ml d'eau distillé.



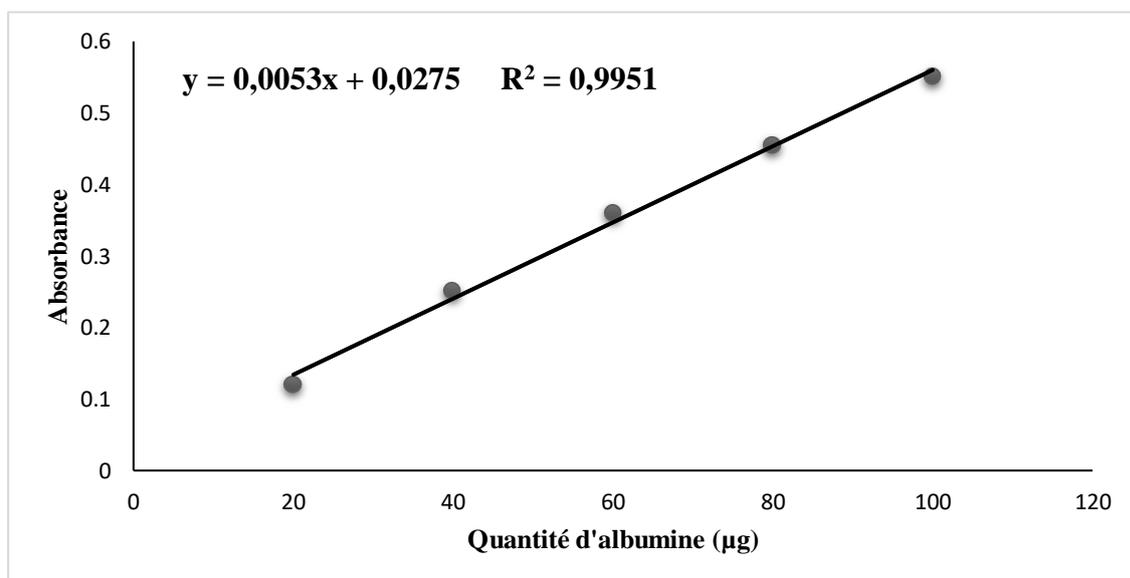
**Figure 15.** Extraction des vitellogénines et vitellines (adaptée aux centipèdes par **Descamps, 1996** à partir de **Fabre et al., 1990**).

**2.5.2. Dosage des vitellogénines et vitellines**

Le dosage des vitellines et vitellogénines s’effectue avec un réactif de bleu brillant de coomassie (BBC). La solution de BBC se prépare comme suit : dissoudre 50 mg de BBC dans 25 ml d’éthanol 95°. Après une agitation de 2 heures, on ajoute 50 ml d’acide orthophosphorique à 85% et on complète à 500 ml avec de l’eau distillée. Le dosage est réalisé comme suit: Prendre 100 µl de la couche intermédiaire obtenue après centrifugation, y additionner 4 ml de BBC, bien agiter puis passer à la lecture des densités optiques au spectrophotomètre à une longueur d’onde de 595 nm contre un blanc de gamme. Les résultats sont exprimés en µg/mg d’ovaire pour la vitelline et en µl/ml pour l’hémolymphe. La gamme d’étalonnage est réalisée à partir d’une solution d’albumine de sérum de bœuf (BSA) titrant 1 mg/ ml (**Tableau 2**).

**Tableau 3** : Dosage des vitellogénines et vitellines : réalisation de la gamme d’étalonnage.

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



**Figure 16.** Dosage des protéines : droite de régression exprimant l’absorbance en fonction de la quantité d’albumine (µg) (R2 coefficient de détermination).

## **2.6. Etude électrophorétique**

### **2.6.1. Extraction et dosage des vitellogénines et vitellines**

L'extraction et le dosage des vitellogénines et vitellines ont été réalisés afin de connaître la quantité de protéines à mettre dans le dépôt. 200 µl de vitellogénines et vitellines ont été additionnés à 300 µl d'eau distillée et 2 µl phénylméthylsilfonylfluoride (PMSF) ont été ajoutés. Le PMSF est utilisé à raison de 45 mg/1ml d'éthanol. Les échantillons sont ensuite stockés au congélateur à -20°C jusqu'au jour du dosage. L'extraction est effectuée à 4°C sous agitation pendant 24 heures. L'homogénat est centrifugé à 5000 tours/ min pendant 15 minutes. Le surnageant est alors récupéré et une fraction aliquote (10µl) est destinée à la quantification des protéines et l'autre fraction est lyophilisée et servira à l'étude électrophorétique. Les extraits secs sont repris dans un tampon d'échantillon.

### **2.6.2. Séparation électrophorétique**

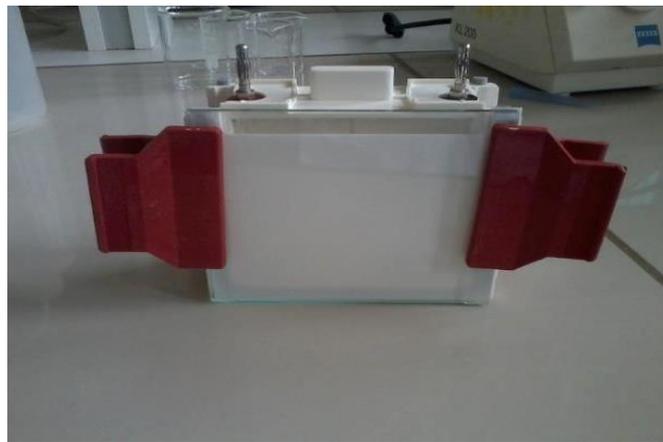
La séparation électrophorétique des vitellogénines et vitellines est réalisée selon la technique de **Laemmli, (1970)**. Il s'agit d'une électrophorèse verticale sur gel de polyAcrylamide PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) à 30 % qui joue le rôle d'un tamis moléculaire additionné au SDS à 10% (sodium dodécyl sulfate). Le SDS est un détergent anionique qui dénature les protéines et leur donne une charge négative ce qui donne une densité de charge équivalente par unité de longueur de polypeptide. Par conséquent, les protéines vont migrer dans le gel et la distance parcourue sera en corrélation avec leur poids moléculaire (**Kaufman, 1998**).

### **2.6.3. Montage de l'appareil**

L'appareil est composé d'une mini cuve de 7 x 8 cm avec deux faces identiques comportant deux plaques d'alumine, deux plaques de verre, deux espaceurs d'une épaisseur de 1,5 mm, 4 pinces, 2 peignes, un chapeau avec électrodes et une cuve à tampon de migration. Avant de couler le gel, on met de l'agarose à 2% préalablement chauffée au bain marie sur une plaque de verre afin de boucher le vide entre la plaque d'alumine et la plaque de verre. Les gels sont préparés extemporanément. On coule d'abord le gel de séparation ou running gel (12,5%) (**Tableau 4**) entre la plaque d'alumine et la plaque de verre et on laisse polymériser pendant 30 mn. On prépare ensuite le gel de concentration (4,5%) ou stacking gel (**Tableau 3**), que l'on fait couler jusqu'aux bords des plaques. On place enfin les peignes qui serviront au moulage des dix chambres de dépôt, puis on laisse polymériser pendant 30 mn (**Figure 17**).

**Tableau 4** : Composition des gels (running gel, stacking gel).

Produits		Stacking gel	Running gel
Acrylamide 30%	(ml)	1,5	5,3
Eau distillée	(ml)	5,7	6,8
Upper buffer	(ml)	1,2	-
SDS 10%	(ml)	-	0,2
Sucrose 55%	(ml)	-	2,5
Lower buffer	(ml)	-	5,0
Ammonium persulfate	(ml)	0,3	0,2
TEMED	(ml)	0,01	0,025



**Figure 17.** Montage de l'appareil (Photo personnelle).

#### **2.6.4. Dépôt des échantillons et migration**

Les échantillons lyophilisés sont dissous dans une solution tampon ou sample buffer (**Tableau 5**). La détermination du volume de l'échantillon a été obtenue à partir du dosage des échantillons protéiques. Au niveau de chaque chambre de dépôt, on introduit 10 à 15  $\mu$ l d'échantillon biologique à l'aide d'une microseringue. L'appareil est branché à un générateur à un voltage de 50 volts pendant 30min ; puis à 100 volts pendant deux heures. Une fois la migration finie, on procède à la coloration (**Fig. 18**).



**Figure 18.** Dépôt des échantillons (Photo personnelle).

**Tableau 5 :** Composition de sample buffer (Tampon d'échantillons).

Produits		Sample buffer
Upper gel buffer	(ml)	6,25
Mercaptoethanol	(ml)	2,50
SDS 10 %	(ml)	7,14
Bleu de bromophénol à 0,05 %	(ml)	5,00
Glycérol	(ml)	5,00
EDTA	(ml)	18,60

**Tableau 6 :** Composition du tampon de migration (running buffer)

Produits		Running buffer
Tris bas	(g)	6,00
Glycine	(g)	28,80
SDS	(g)	1,00
H2O	(ml)	(q.s.p) 1000

*q.s.p. Quantité suffisante pour*

### 2.6.5. Coloration

À la fin de la migration, les gels sont placés dans la solution de coloration pendant 24 heures sous agitation. Elle permet la révélation des bandes protéiques. Les gels subissent ensuite 2 à 3 bains successifs d'acide acétique à 10% afin d'éliminer l'excès de colorant. Un dernier bain est effectué dans une solution de rinçage pour obtenir une meilleure visualisation des bandes protéiques (**Tableau 7**).

**Tableau 7** : Composition de la solution de coloration.

Produits		Quantité
Propanol 2	(ml)	250
Acide acétique 10%	(ml)	100
Bleu de coomassie R250	(mg)	250
H2O	(ml)	(q.s.p) 1000

*q.s.p. Quantité suffisante pour*

### 2.6.6. Décoloration

La décoloration du fond du gel est effectuée avec deux bains d'acide acétique à 10% (1heure chacun). La procédure prend fin lorsque l'acide devient clair. Le gel est alors fixé pendant 15 min dans la solution de rinçage.

## 2.7. Etude histologique

### 2.7.1. Technique histologique

Le protocole histologique est réalisé selon **Martoja & Martoja (1967)**.

**2.7.1.1. Fixation** : Le fragment de la gonade est placé dans une cassette d'histologie, et conservé dans un fixateur d'histologie le liquide de Bouin alcoolique durant 48 heures. La solution de Bouin alcoolique se prépare comme suit : 26 ml Formol+7 ml Acide acétique +45 ml Solution à 1% d'acide picrique dans l'alcool 95%+75 ml Eau distillée.

**2.7.1.2. Pré inclusion** : Les échantillons ont ensuite été déshydratés dans deux bains successifs d'éthanol 95% et de trois bains de butanol, pour finalement être imprégné dans la paraffine, quatre bains de 24h ont été effectués.

**2.7.1.3. Inclusion** : Les tissus imprégnés de paraffine doivent ensuite être inclus dans un bloc de paraffine, que l'on moulera autour des tissus sur le banc d'inclusion. Le socle du moule est constitué par la cassette d'histologie annotée afin de conserver la référence de l'individu. Une fois solidifié, le bloc de paraffine est prêt pour la microtomie.

**2.7.1.4. Réalisation des coupes** : Les blocs de paraffine contenant les tissus sont coupés à l'aide d'un microtome. Ils sont d'abord dégrossis jusqu'à ce que la coupe passe par la totalité de la section de masse viscérale, puis coupés à 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, les coupes sont déposées sur une lame de microscope. Les coupes sont ensuite étalées à l'aide d'une plaque chauffante à 30°C et séchées à l'étuve de 60°C pendant 1 heure pour réaliser l'étape de déparaffinage.

**2.7.1.5. Coloration** : Afin d'obtenir une coloration contrastée des tissus reproducteurs, on utilise une coloration hématoxyline-éosine Martel (2005). Les tissus sont inclus dans des bains successifs de xylène, puis hydratés dans l'alcool avant d'être plongés dans les colorants, et rincés par des bains d'alcool, puis xylène (**Tableau 8**).

**Tableau 8** : Principales étapes de coloration par hématoxyline-éosine selon Martel (2005).

Etapes de coloration (Hématoxyline et éosine)	
Xylène	5 minutes
Xylène	5 minutes
Ethanol 100°	5 minutes
Ethanol 100°	5 minutes
Ethanol 100°	5 minutes
Colorer avec l'hématéine de Harris	15 minutes
Laver les coupes à l'eau du robinet	3 minutes
Bleuir dans l'eau ammoniacale	2 secondes
Colorer dans une solution d'éosine	15 minutes
Ethanol 100°	5 minutes
Ethanol 100°	5 minutes
Acétone/xylène (v/v)	5 minutes
Xylène	5 minutes

### **2.7.2. Morphométrie des follicules ovariens et des ovocytes**

Les mensurations des différents paramètres (longueur, largeur) des follicules ovariens et des ovocytes sont déterminées à l'aide d'un logiciel Lasez adhérent au microscope photonique (Leica Microsystems Framework ; version 2, copyright 2010) préalablement étalonné. Le volume aussi bien des follicules ovariens que des ovocytes sont calculés selon la formule de **Lambréas et al. (1991)** :

$$V = 4\pi / 3(L/2) (l/2)^2$$

Le volume est (v) exprimé en mm<sup>3</sup>, tandis que la longueur et largeur sont exprimées en µm. Le calcul du nombre des ovocytes par follicule est déterminé visuellement par le logiciel Lasez adhérent au microscope photonique (Leica DM 500).

### **2.8. Analyse statistique**

Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne plus au moins le standard de déviation (m± SD). L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel MINITAB Version 19 (Statistical Software, PA State College, USA). Le niveau de signification est p< 0,05. La répartition des mesures biologiques répond à la loi normale et la démonstration statistique des effets recherchés est réalisée à l'aide de tests paramétriques

Différents tests statistiques ont été réalisés :

- 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**).
- La régression linéaire pour la détermination des différentes droites de régression (gammes d'étalonnage).
- La comparaison de multiples moyennes entre les séries témoins et traitées a été effectuée par l'analyse de la variance (ANOVA) à un critère de classification (concentration) suivi du test de HDS (Honest Significant Difference) de Tukey afin de classer les concentrations.
- La comparaison de multiples moyennes chez les séries témoins et chez les séries les traitées a été réalisée par l'analyse de la variance (ANOVA) à un critère de classification (temps) suivi du test de HDS de Tukey afin de classer les temps

- La comparaison des effets concentrations, temps a été effectuée par l'analyse de la variance (ANOVA) à deux critères de classification (concentration, temps)
- Person corrélation a été également effectué.



# RÉSULTAS

*«Un scientifique ne peut et ne doit jamais répondre qu'en fonction d'un savoir donné, mais des éléments dont il dispose, en traduisant sa réponse en termes de probabilités»*

*Jean-Pierre Petit*

### 3. RÉSULTATS

#### 3.1. Etude biochimique

##### 3.1.1. Dosage biochimique des vitellogénines et vitellines

##### 3.1.1.1. Effets du cadmium sur les taux de vitellogénines en période d'activité sexuelle

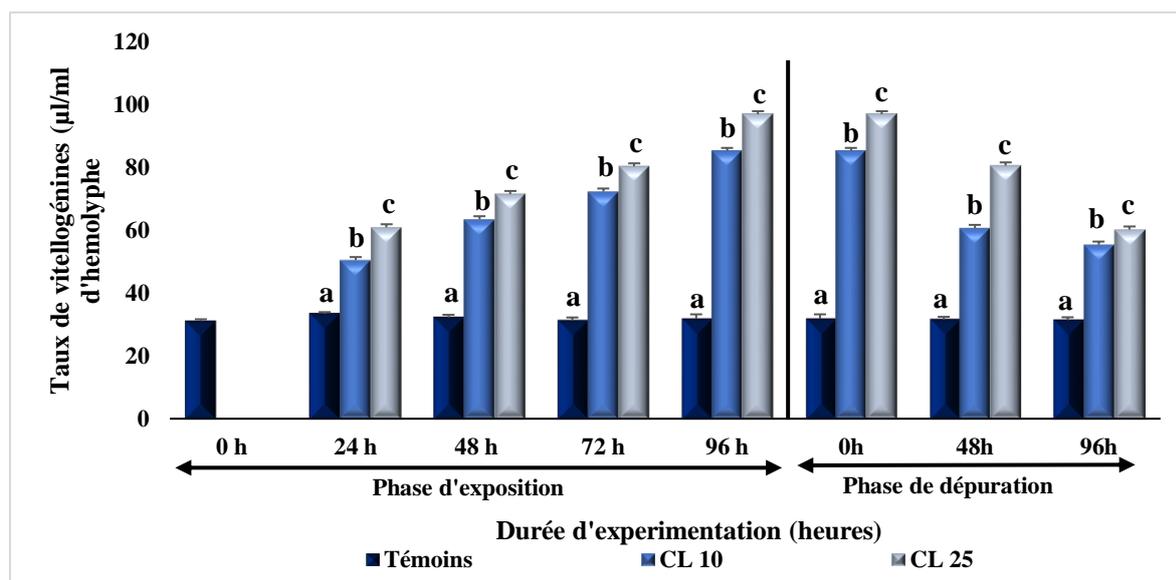
Les résultats relatifs aux effets du cadmium sur les taux de Vtg durant la phase d'exposition et de dépuration sont représentés dans la **figure 19**.

**En phase d'exposition**, les données obtenus par comparaison de multiples moyennes (AV1) entre les séries témoins et traitées, ont montré une augmentation hautement significative des taux de Vtg ( $P=0,000$ ) chez les individus traités avec la CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> comparativement aux témoins au cours des quatre temps d'exposition ; avec un effet plus marqué à 96 h d'exposition (**Fig. 19** ; **Tab. 9**). Le test HSD de Tukey a indiqué trois groupes de classes par ordre décroissant, le premier groupe renferme les individus traités avec la CL<sub>25</sub>, le deuxième groupe renferme les individus traités avec la CL<sub>10</sub>. Enfin le troisième le groupe renferme les témoins (**Tab. 10**).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (temps, concentration) confirme les résultats obtenus, et a révélé un effet temps ( $F_{4,60} = 5698$  ;  $P=0,000$ ) et un effet concentration ( $F_{2,60} = 2154$  ;  $P=0,000$ ) hautement significatifs et une interaction concentration/temps hautement significative ( $F_{8,60} = 17536$  ;  $P=0,000$ ) (**Tab. 11**).

Concernant **la phase de dépuration**, les données statistiques révèlent un effet temps hautement significatif ( $P=0,000$ ) chez les traités avec la CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> (**Tab. 12**). Le test HSD de Tukey montre trois groupes de classes par ordre décroissant, le premier groupe renferme les individus de 0j de dépuration, le deuxième groupe renferme les individus de 48h de dépuration, le troisième groupe 3 renferme les individus de 96h de dépuration chez les traités avec la CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> (**Tab. 13**) suggérant un potentiel de récupération.

L'ANOVA 2 révèle également un effet temps ( $F_{2,36} = 2596$  ;  $P=0,000$ ) et un effet concentration ( $F_{2,36} = 3085$  ;  $P=0,000$ ) hautement significatifs et une interaction concentration/temps hautement significative ( $F_{4,36} = 895,3$  ;  $P=0,000$ ) (**Tab. 14**).



**Figure 19.** Effet du cadmium sur les taux de vitellogénines (µl/ml d'hémolymphe) chez *D. trunculus* en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition et de dépuración (Moyenne ± SD, n= 5). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes.

**Tableau 9 :** Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) des taux de vitellogénines (µl/ml d'hémolymphe) chez *D. trunculus* (m ± SD, n=5) en phase d'exposition.

Temps	Source de variation	DDL	SC	CM	F obs	P
24h	concentration	2	2149,32	1074,66	F <sub>2,60</sub> = 3762,64	0,000***
	Erreur	12	3,43	0,29		
	Totale	14	2149,32			
48 h	concentration	2	4241,85	2120,93	F <sub>2,60</sub> = 2341,48	0,000***
	Erreur	12	10,87	0,91		
	Totale	14	4252,72			
72h	concentration	2	6997,65	3498,82	F <sub>2,60</sub> = 6454,24	0,000***
	Erreur	12	6,51	0,54		
	Totale	14	7004,15			
96h	concentration	2	11819,9	5909,97	F <sub>2,60</sub> = 5201,17	0,000***
	Erreur	12	13,6	1,14		
	Totale	14	11833,6			

**Tableau 10** : Classement des concentrations des taux de vitellogénines par le test HSD de Tukey en phase d'exposition.

Temps	Concentration	Valeurs moyennes	Groupes
24h	CL <sub>25</sub>	60,278	A
	CL <sub>10</sub>	50,460	B
	Témoins	31,442	C
48h	CL <sub>25</sub>	70,968	A
	CL <sub>10</sub>	63,058	B
	Témoins	32,004	C
72h	CL <sub>25</sub>	80,730	A
	CL <sub>10</sub>	72,288	B
	Témoins	31,278	C
96h	CL <sub>25</sub>	95,814	A
	CL <sub>10</sub>	85,558	B
	Témoins	31,804	C

**Tableau 11** : Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, concentration) des taux de vitellogénines (µl/ml d'hémolymphe) chez *D. trunculus* en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition.

Source de variation	Phase d'exposition				
	DDL	SCE	SC	Fobs	P
Temps	4	20746	10186	F <sub>(4,60)</sub> =5698	P=0,000***
Concentration	2	38856	39428	F <sub>(2,60)</sub> =2154	P=0,000***
Interaction temps/concentration	8	14048	3006	F <sub>(8,60)</sub> =17536	P=0,000***
Erreur résiduelle	60	43,02	1,25		
Total	74				

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

**Tableau 12** : Analyse de la variance à un critère de classification (temps) des taux de vitellogénines ( $\mu\text{l/ml}$  d'hémolymphe) chez les Témoins, CL<sub>10</sub>, CL<sub>25</sub> de *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=5$ ) en phase de déuration.

Concentrations	Source de variation	DDL	SC	CM	F obs	P
Témoins	Temps	2	1,567	0,7835	F <sub>2,36</sub> = 1.56	0,251 NS
	Erreur	12	6,040	0,5033		
	Totale	14	7,607			
CL <sub>10</sub>	Temps	2	2567,52	1283,76	F <sub>2,36</sub> = 2955,20	0,000***
	Erreur	12	5,21	0,43		
	Totale	14	2572,73			
CL <sub>25</sub>	Temps	2	3132,69	1566,34	F <sub>2,36</sub> = 3929,91	0,000***
	Erreur	12	4,78	0,40		
	Totale	14	3137,47			

**Tableau 13** : Classement des temps (heures) des taux de vitellogénines par le HSD test de Tukey en phase de déuration.

Concentrations	Temps	Valeurs moyennes	Groupes
Témoins	0	31,80	A
	48h	31,59	A
	96h	31,33	A
CL <sub>10</sub>	0	85,55	A
	48h	60,69	B
	96h	55,61	C
CL <sub>25</sub>	0	95,81	A
	48h	80,40	B
	96h	60,51	C

**Tableau 14** : Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, concentration) des taux de vitellogénines ( $\mu\text{l/ml}$  d'hémolymphe) chez *D. trunculus* en période d'activité sexuelle, et durant la phase de déuration.

Source de variation	Phase de déuration				
	DDL	SCE	SC	Fobs	P
Temps	2	3648	1863	F <sub>(2,36)</sub> =2596	P=0,001 ***
Concentration	2	2456	1456	F <sub>(2,36)</sub> =3085	P=0,001 ***
Interaction temps/concentration	4	1856	458	F <sub>(4,36)</sub> =895,3	P=0,001 ***
Erreur résiduelle	36	16,18	0,5389		
Total	44				

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

### 3.1.1.2. Effets du cadmium sur les taux de vitellogénines en période de repos sexuel

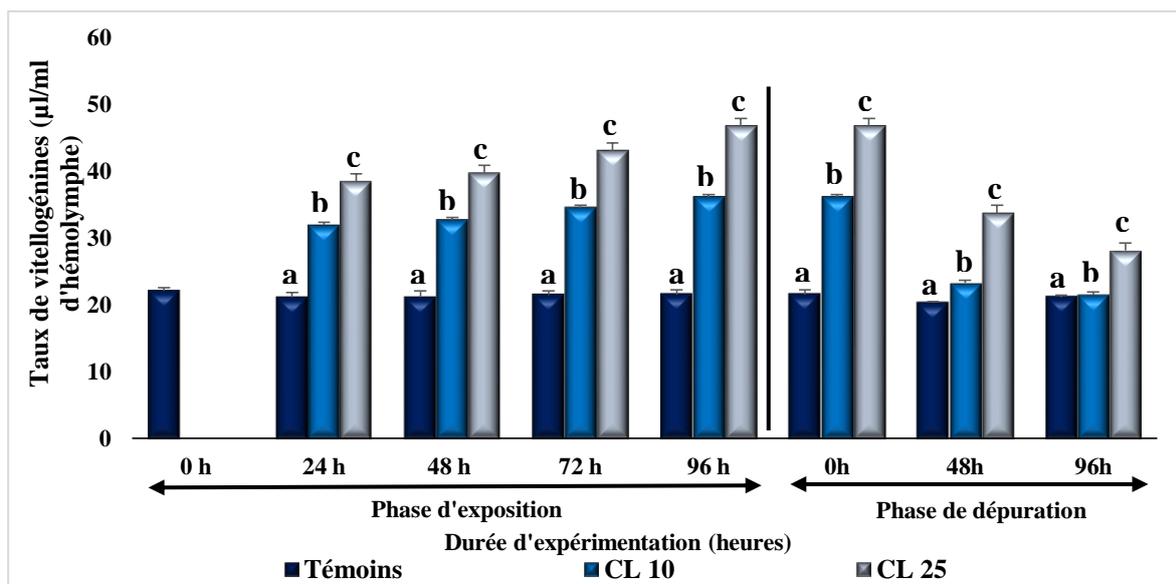
Les données obtenues concernant les effets du cadmium sur les taux de Vtg durant la phase d'exposition et de dépuración sont exprimées dans la **figure 20**.

Au cours de **la phase d'exposition**, et on comparaison avec les témoins, les taux de Vtg ont augmentés significativement ( $P=0,000$ ) chez les individus traités avec la  $CL_{10}$  et  $CL_{25}$  au cours des quatre temps d'exposition ; l'augmentation est plus marquée chez les traités avec la  $CL_{10}$  et  $CL_{25}$  à 96h d'exposition (**Fig. 20 ; Tab. 15**). Le test HSD de Tukey a démontré l'existence de trois groupes de classes par ordre décroissant, le premier groupe renferme les individus traités avec la  $CL_{25}$ , le deuxième groupe renferme les individus traités avec la  $CL_{10}$ . Enfin le troisième groupe renferme les témoins (**Tab. 16**).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (temps, concentration) a révélé un effet temps ( $F_{4,60} = 9698 ; P=0,000$ ) et un effet concentration ( $F_{2,60} = 3154 ; P=0,000$ ) hautement significatifs et une interaction concentration/ temps hautement significative ( $F_{8,60} = 37536 ; P=0,000$ ) (**Tab. 17**).

On constate durant **la phase de dépuración**, un effet temps hautement significatif ( $P=0,000$ ) chez les traités avec la  $CL_{10}$  et  $CL_{25}$  (**Tab. 18**). Le test HSD de Tukey désigne trois groupes de classes chez les traités avec la  $CL_{10}$  et  $CL_{25}$  par ordre décroissant, le premier groupe contient les individus de 0j de dépuración, le deuxième groupe renferme les individus de 48h de dépuración. Enfin le troisième groupe renferme les individus de 96h de dépuración (**Tab. 19**) évoquant un retour rapide à l'état initial des taux de Vtg.

L'Analyse de la variance à 2 critères de classification montre également un effet temps ( $F_{2,36} = 3718 ; P=0,000$ ) et un effet concentration ( $F_{2,36} = 3278 ; P=0,000$ ) hautement significatifs et une interaction concentration/temps hautement significative ( $F_{4,36} = 910,2 ; P=0,000$ ) (**Tab. 20**).



**Figure 20.** Effet du cadmium sur les taux de vitellogénines ( $\mu\text{l/ml}$  d'hémolymphe) chez *D. trunculus* en période de repos sexuel, et durant la phase d'exposition et de dépuración (Moyenne  $\pm$  SD,  $n=5$ ). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes.

**Tableau 15 :** Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) des taux de vitellogénines ( $\mu\text{l/ml}$  d'hémolymphe) chez *Donax trunculus* ( $m \pm$  SD,  $n=5$ ) en phase d'exposition.

Temps	Source de variation	DDL	SC	CM	F obs	P
24h	Concentration	2	709,98	351,99	$F_{(2,60)}= 482,29$	0,000***
	Erreur	12	8,75	0,730		
	Totale	14	712,73			
48 h	Concentration	2	883,94	441,96	$F_{(2,60)}= 376,14$	0,000***
	Erreur	12	14,10	1,175		
	Totale	14	898,04			
72h	Concentration	2	1183,13	591,56	$F_{(2,60)}= 629,10$	0,000***
	Erreur	12	11,28	0,94		
	Totale	14	1194,41			
96h	Concentration	2	1595,90	797,94	$F_{(2,60)}= 1474,95$	0,000***
	Erreur	12	6,49	0,541		
	Totale	14	1602,39			

**Tableau 16** : Classement des concentrations des taux de vitellogénines par le test HSD de Tukey en phase d'exposition.

Temps	Concentration	Valeurs moyennes	Groupes
24h	CL <sub>25</sub>	38,52	A
	CL <sub>10</sub>	31,93	B
	Témoins	21,86	C
48h	CL <sub>25</sub>	39,74	A
	CL <sub>10</sub>	32,70	B
	Témoins	21,12	C
72h	CL <sub>25</sub>	43,08	A
	CL <sub>10</sub>	34,52	B
	Témoins	21,48	C
96h	CL <sub>25</sub>	46,720	A
	CL <sub>10</sub>	36,140	B
	Témoins	21,560	C

**Tableau 17** : Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, concentration) des taux de vitellogénines (µl/ml d'hémolymphe) chez *D. trunculus* en période de repos sexuel, et durant la phase d'exposition.

Source de variation	Phase d'exposition				
	DDL	SCE	SC	F obs	P
Temps	4	1588	597,1	F <sub>(4,60)</sub> =686,1	0,000***
Concentration	2	3688	2694	F <sub>(2,60)</sub> =3500	0,000***
Interaction temps/concentration	8	1056,1	219,5	F <sub>(8,60)</sub> =276,4	0,000***
Erreur résiduelle	60				
Total	74	6332.1			

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

**Tableau 18** : Analyse de la variance à un critère de classification (temps) des taux de vitellogénines ( $\mu\text{l/ml}$  d'hémolymphe) chez les Témoins, CL<sub>10</sub>, CL<sub>25</sub> de *Donax trunculus* ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n=5$ ) en phase de déuration.

Concentrations	Source de variation	DDL	SC	CM	F obs	P
Témoins	Temps	2	4,00	2,00	$F_{(2,36)}=66,31$	0,004NS
	Erreur	12	2,63	0,21		
	Totale	14	6,63			
CL <sub>10</sub>	Temps	2	637,02	318,513	$F_{(2,36)}=644,92$	0,000***
	Erreur	12	5,92	0,49		
	Totale	14	642,95			
CL <sub>25</sub>	Temps	2	918,63	459,31	$F_{(2,36)}=813,20$	0,000***
	Erreur	12	6,77	0,56		
	Totale	14	925,41			

**Tableau 19** : Classement des temps (heures) des taux de vitellogénines par le test HSD de Tukey en phase de déuration.

Concentration	Temps	Valeurs moyennes	Groupes
Témoins	0	21,56	A
	48h	21,16	A
	96h	20,32	A
CL <sub>10</sub>	0	36,14	A
	48h	23,24	B
	96h	21,54	C
CL <sub>25</sub>	0	46,72	A
	48h	33,74	B
	96h	28,01	C

**Tableau 20** : Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, concentration) des taux de vitellogénines ( $\mu\text{l/ml}$  d'hémolymphe) chez *D. trunculus* en période de repos sexuel, et durant la phase de déuration.

Source de variation	Phase de déuration				
	DDL	SCE	SC	Fobs	P
Temps	2	1059	529,4	$F_{(2,36)}=1135$	$P=0,000***$
Concentration	2	1755	877,4	$F_{(2,36)}=1882$	$P=0,000***$
Interaction temps/concentration	4	492,2	123,1	$F_{(4,36)}=263,9$	$P=0,000***$
Erreur résiduelle	36	16,79	0,466		
Total	44	3322,99			

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

### 3.1.1.3. Effet du cadmium sur les taux de vitellines en période d'activité sexuelle

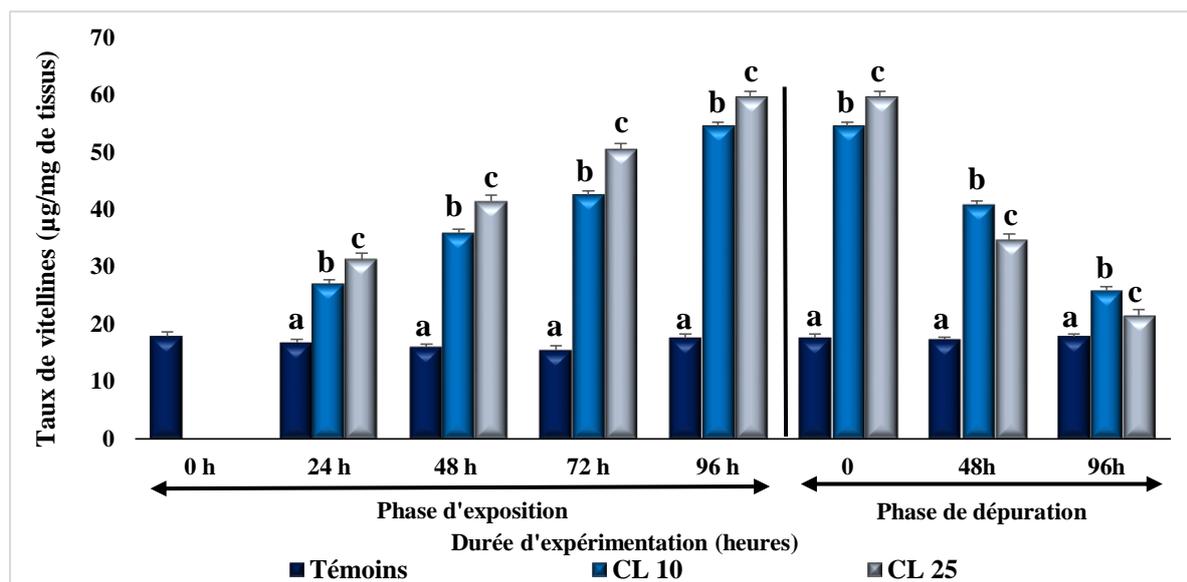
Durant **la phase d'exposition**, les résultats montrent une augmentation hautement significative des taux de Vn ( $P=0,000$ ) chez les traités CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> par rapport aux témoins pendant les quatre temps d'exposition, avec un impact plus marqué à 96 h d'exposition chez les traités avec la CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> (**Fig. 21 ; Tab. 21**). Trois groupes de classes par ordre décroissant ont été démontré par le test HSD de Tukey, le premier groupe renferme les individus traités avec la CL<sub>25</sub>, le deuxième groupe renferme les individus traités avec la CL<sub>10</sub>. Enfin le troisième groupe renferme les témoins (**Tab. 22**).

L'AV2 révèle un effet temps ( $F_{4,60} = 9698 ; P=0,000$ ) et un effet concentration ( $F_{2,60} = 3154 ; P=0,000$ ) hautement significatifs, et une interaction concentration/ temps hautement significative ( $F_{8,60} = 37536 ; P=0,000$ ) (**Tab. 23**).

Concernant les taux de vitellines pendant **la phase de dépuración**, les analyses statistiques révèlent un effet temps hautement significatif ( $P=0,000$ ) chez les traités avec la CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> (**Fig. 21 ; Tab. 24**). On note chez les traités avec la CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub>, trois groupes de classes par ordre décroissant révélé par le test HSD de Tukey, le premier groupe englobe les individus de 0j de dépuración, le deuxième groupe représente les individus de 48h de restauration, le troisième groupe renferme les individus après 96h de dépuración (**Tab. 25**).

À la fin de **la phase de dépuración**, les valeurs des Vn chez les traités sont presque comparables à celles des témoins révélant une capacité de restauration à un état normal.

L'AV2 montre un effet temps ( $F_{2,36} = 3718 ; P=0,000$ ) et un effet concentration ( $F_{2,36} = 3278 ; P=0,000$ ) hautement significatifs et une interaction concentration/temps hautement significative ( $F_{4,36} = 910,2 ; P=0,000$ ) (**Tab. 26**).



**Figure 21.** Effet du cadmium sur les taux de vitellines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissus) chez *D. trunculus* en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition et de dépuration (Moyenne  $\pm$  SD,  $n=5$ ). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes.

**Tableau 21 :** Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) des taux de vitellines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissus) chez *Donax trunculus* ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n=5$ ) en phase d'exposition.

Temps	Source de variation	DDL	SC	CM	F obs	P
24h	Concentration	2	565,81	282,90	$F_{(4.60)}=291,88$	0,000***
	Erreur	12	11,63	0,96		
	Totale	14	577,44			
48 h	Concentration	2	1794,26	897,132	$F_{(4.60)}=1793,76$	0,000***
	Erreur	12	6,00	0,500		
	Totale	14	1800,27			
72h	Concentration	2	3473,97	1736,99	$F_{(4.60)}=3200,54$	0,000***
	Erreur	12	6,51	0,54		
	Totale	14	3480,49			
96h	Concentration	2	5284,19	2642,10	$F_{(4.60)}=3261,11$	0,000***
	Erreur	12	9,72	0,81		
	Totale	14	5293,92			

**Tableau 22** : Classement des concentrations des taux de vitellines par le test HSD de Tukey en phase d'exposition.

Temps	Concentration	Valeurs moyennes	Groupes
24h	CL <sub>25</sub>	31,420	A
	CL <sub>10</sub>	27,032	B
	Témoins	16,764	C
48h	CL <sub>25</sub>	41,500	A
	CL <sub>10</sub>	35,920	B
	Témoins	16,018	C
72h	CL <sub>25</sub>	51,160	A
	CL <sub>10</sub>	42,574	B
	Témoins	15,452	C
96h	CL <sub>25</sub>	59,640	A
	CL <sub>10</sub>	54,628	B
	Témoins	17,556	C

**Tableau 23** : Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, concentration) des taux de vitellines (µg/mg de tissus) chez *D. trunculus* en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition.

Source de variation	Phase d'exposition				
	DDL	SCE	SC	Fobs	P
Temps	2	7786	3893	$F_{(2,60)}=5668$	P=0,001***
Concentration	4	6062	1515	$F_{(4,60)}=2206$	P=0,001***
Interaction temps/concentration	8	3328	416	$F_{(8,60)}=605,8$	P=0,001***
Erreur résiduelle	60	41,21	0,68		
Total	74	17217.21			

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

**Tableau 24** : Analyse de la variance à un critère de classification (temps) des taux de vitellines ( $\mu\text{l/ml}$  d'hémolymphe) chez les Témoins,  $\text{CL}_{10}$ ,  $\text{CL}_{25}$  de *Donax trunculus* ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n=5$ ) en phase de dépuración.

Concentrations	Source de variation	DDL	SC	CM	F obs	P
Témoins	Temps	2	0,2470	0,1235	$F_{(2,27)}=0,58$	0,574NS
	Erreur	12	2,5520	0,2127		
	Totale	14	2,7990			
$\text{CL}_{10}$	Temps	2	2140,14	1070,07	$F_{(2,27)}= 4160,84$	0,000***
	Erreur	12	3,09	0,26		
	Totale	14	2143,23			
$\text{CL}_{25}$	Temps	2	3806,76	1903,38	$F_{(2,27)}= 4169,32$	0,000***
	Erreur	12	5,48	0,46		
	Totale	14	3812,24			

**Tableau 25** : Classement des temps (heures) des taux de vitellines par le test HSD de Tukey en phase de dépuración.

Concentration	Temps	Valeurs moyennes	Groupes
Témoins	0	17,5960	A
	48h	17,556	A
	96h	17,306	A
$\text{CL}_{10}$	0	54,410	A
	48h	40,394	B
	96h	25,1600	C
$\text{CL}_{25}$	0	59,640	A
	48h	34,164	B
	96h	21,304	C

**Tableau 26** : Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, concentration) des taux de vitellines ( $\mu\text{g/mg}$  de tissus) chez *D. trunculus* en période d'activité sexuelle, et durant la phase de dépuración.

Source de variation	Phase de dépuración				
	DDL	SCE	SC	Fobs	P
Temps	2	191,4	95,71	$F_{(2,36)}=1256$	$P=0,001***$
Concentration	2	839	419,5	$F_{(2,36)}=2564$	$P=0,001***$
Interaction temps/concentration	4	312,1	78,04	$F_{(4,36)}=315,1$	$P=0,001***$
Erreur résiduelle	27	75,80	2,809		
Total	35	1418.3			

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

### **3.1.2. Etude électrophorétique**

#### **3.1.2.1. Etude électrophorétique des vitellogénines en période d'activité sexuelle**

Après vérification que la séparation électrophorétique des Vtg chez les témoins n'a pas subi des variations au cours du temps. **La figure 22 et le tableau 27** représentent l'effet du cadmium sur la qualité des vitellogénines en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition et de dépuración. La courbe de référence exprimant le logarithme décimal du poids moléculaire (PM) des protéines standards en fonction du rapport frontal est illustré dans **la figure 23**.

En **phase d'exposition**, la séparation électrophorétique des Vtg révèle une augmentation des bandes protéiques chez les traités CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> par rapport aux témoins, et a mis en évidence :

-Chez les témoins : présence de 7 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 8,44 à 250 kDa (**Fig. 22 ; Tab. 27**).

-Chez les individus traités avec la CL<sub>10</sub>-48h : 9 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 8,4 à 250 kDa, avec l'absence des poids moléculaires suivants : 68,4 kDa, et l'apparition de nouveaux poids moléculaires suivants : 195,6 kDa, 25 kDa, et 17 kDa (**Fig. 22 ; Tab. 27**).

-Chez les individus traités avec la CL<sub>25</sub>-48h : 13 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 5,62 à 250 kDa avec l'apparition de nouvelles bandes avec les poids moléculaires suivants : 195,6 kDa, 62,8 kDa, 25 kDa, 17 kDa, 15 kDa, et 10 kDa (**Fig. 22 ; Tab. 27**).

-Chez les individus traités avec CL<sub>10</sub>-96h, nous avons observés 11 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie de 5,6 à 250 kDa, avec l'apparition de nouvelles bandes dont les poids moléculaires sont : 180,5 kDa, 52,5 kDa, 30 kDa, et 17 kDa (**Fig. 22 ; Tab. 27**).

-Chez les individus traités avec CL<sub>25</sub>-96h, nous avons observés 14 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie de 5,66 à 250 kDa, avec l'absence d'une seule bande protéique au poids moléculaires de 68,4 kDa, ainsi que l'apparition de nouvelles bandes dont les poids moléculaires sont : 195,6 kDa, 180,5 kDa, 52,5 kDa, 25 kDa, 17 kDa, 15 kDa, et 10 kDa (**Fig. 22 ; Tab. 27**).

Concernant **la phase de dépuración**, le profil électrophorétique démontre une diminution des bandes protéiques chez les traités CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> comparativement aux témoins, et nous a permis de séparer ;

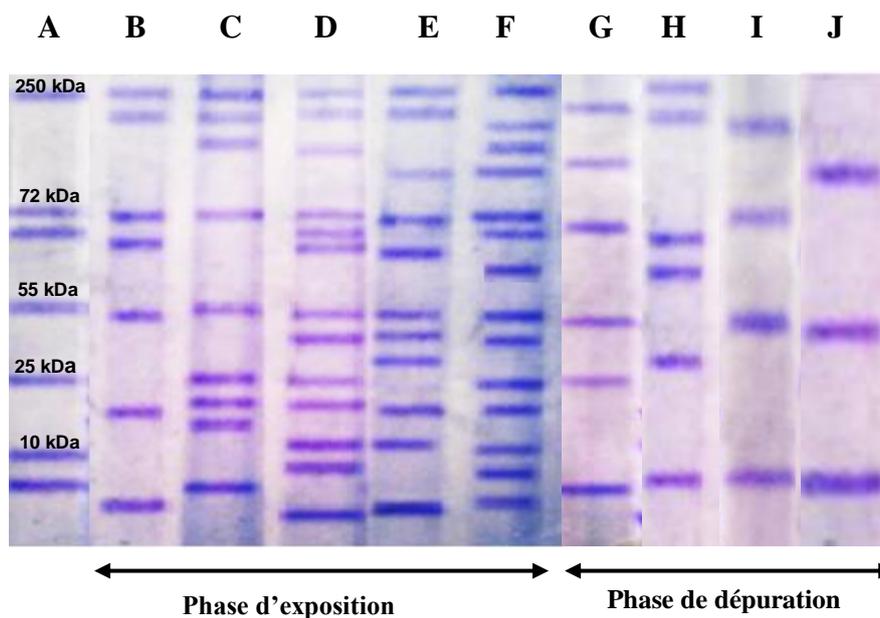
-Chez les témoins : avant le début du traitement nous avons observé 7 fractions protéiques avec des poids moléculaires qui varient entre 8,44 à 250 kDa (**Fig. 22 ; Tab. 27**).

-Chez les individus traités préalablement avec la CL<sub>10</sub>-48h : nos résultats révèlent la présence de 6 bandes protéiques dont le poids moléculaire varie entre 17 kDa et 250 kDa, avec l'absence des poids moléculaires suivants : 250 kDa, 68,4 kDa, et 23,11 kDa (**Fig. 23 ; Tab. 27**).

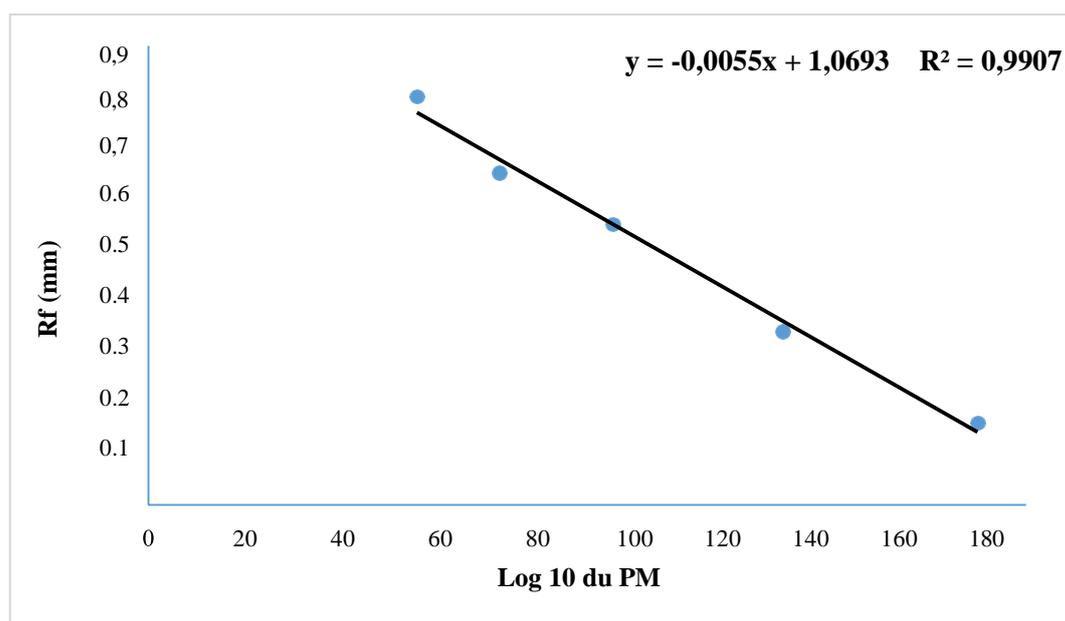
-Chez les individus traités préalablement avec la CL<sub>25</sub>-48h : nos résultats révèlent la présence de 6 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 8,44 KDa et 250 KDa, avec l'absence des poids moléculaires suivants : 72 kDa, 55 kDa, et 23,11 kDa (**Fig. 22 ; Tab. 27**).

-Chez les individus traités préalablement avec la CL<sub>10</sub>-96h : nos données démontrent la présence de 4 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 9,3 kDa et 240 kDa, avec l'absence des poids moléculaires suivants : 250 kDa, 68,4 kDa, 23,11 kDa, et 8,44 kDa (**Fig. 22 ; Tab. 27**).

-Chez les individus traités avec CL<sub>25</sub>-96h, nous avons observés 3 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie de 195,6 kDa et 8,4 kDa, avec l'absence d'une seule bande protéique dont le poids moléculaire est de 195,6 kDa (**Fig. 22 ; Tab. 27**).



**Figure 22.** Séparation électrophorétique des vitellogénines chez *D.trunculus* en période d'activité sexuelle. **A** : Protéines standards ; **B** : Témoin 0j ; **C** : CL<sub>10</sub> (48h) d'exposition ; **D** : CL<sub>25</sub> (48h) d'exposition ; **E** : CL<sub>10</sub> (96h) d'exposition ; **F** : CL<sub>25</sub> (96) d'exposition ; **G** : CL<sub>10</sub> (48h) de déuration ; **H** : CL<sub>25</sub> (48h) de déuration ; **I** : CL<sub>10</sub> (96h) de déuration ; **J** : CL<sub>25</sub> (96h) de déuration.



**Figure 23.** Courbe d'étalonnage exprimant le rapport frontal (Rf) en fonction du poids moléculaire des vitellogénines (PM en kDa) en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition et de déuration.

**Tableau 27** : Poids moléculaire (PM, kDa) des différentes fractions protéiques des vitellogénines chez *D. trunculus* en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition et de déuration (0 : fraction manquante ; + : fraction présente).

PM	Concentration	Durée d'exposition			Durée de déuration		
		0	48h	96h	0	48h	96h
250 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	+	+	+	0	0
	CL <sub>25</sub>	+	+	+	+	+	0
240,85 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>25</sub>	+	+	0	0	+	+
195,6 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	+	0	0	0	0
	CL <sub>25</sub>	+	+	+	+	0	0
180,5 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	0	+	+	+	0
	CL <sub>25</sub>	0	0	+	+	0	0
72 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>25</sub>	+	+	+	+	0	0
68,4 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	0	+	+	0	0
	CL <sub>25</sub>	+	+	0	0	+	0
55 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>25</sub>	+	+	+	+	0	+
52,5 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	0	+	+	0	0
	CL <sub>25</sub>	0	0	+	+	+	0
30 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	0	+	+	0	0
	CL <sub>25</sub>	0	0	0	0	0	0
25 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	+	0	0	+	0
	CL <sub>25</sub>	0	+	+	+	+	0
23,11 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	+	+	+	0	0
	CL <sub>25</sub>	+	+	+	+	0	0
17 kDa	Témoins	0	0	0	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	0	+	+	+	0	0
	CL <sub>25</sub>	0	+	+	+	0	0
15,32 kDa	Témoins				0	0	0
	CL <sub>10</sub>				+	0	0
	CL <sub>25</sub>				+	0	0
	Témoins	0	0	0	0	0	0

15 kDa	CL <sub>10</sub>	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>25</sub>	0	+	+	+	0	+
10 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>25</sub>	0	+	+	+	0	0
8,4 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	+	+	+	+	0
	CL <sub>25</sub>	+	+	+	+	+	0

### 3.1.2.2. Profil électrophorétique des vitellogénines en période de repos sexuel

Durant la phase d'exposition, l'étude électrophorétique montre une augmentation des fractions protéiques chez les traités CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> en comparaison avec les témoins (**Figure 25 ; Tableau 28**), et la droite de régression correspondant à ce profil électrophorétique est illustrée dans la **figure 25** ; les principaux résultats montrent :

-Chez les témoins : la présence de 4 bandes protéiques dont le poids moléculaire varie entre 17,6 à 250 kDa (**Fig. 24 ; Tab. 28**).

-Chez les individus traités avec la CL<sub>10</sub>-48h : 5 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 25 à 250 kDa, avec l'absence des poids moléculaires suivants : 55 kDa, et 17,6 kDa, 10 kDa, et 8,4 kDa et l'apparition de nouvelles bandes protéiques avec des poids moléculaires de : 135,1 kDa, 67,6 kDa, et 25 kDa (**Fig. 24 ; Tab. 28**).

-Chez les individus traités avec la CL<sub>25</sub>-48h : 6 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 10 à 250 kDa, avec l'absence du poids moléculaire suivant : 17,6 kDa, et l'apparition de nouveaux poids moléculaires suivants : 135,1 kDa, 25 kDa, et 10 kDa (**Fig. 24 ; Tab. 28**).

-Chez les individus traités avec CL<sub>10</sub>-96h, nous avons observés 5 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie de 10 à 135,1 kDa, avec l'absence des poids moléculaires suivants : 250 kDa, 72 kDa, 55 kDa, et 17,6 kDa ainsi que l'apparition de nouvelles bandes protéiques dont les poids moléculaires sont les suivants : 135,1 kDa, 67,6 kDa, 25 kDa, 17,6 kDa, et 10 kDa (**Fig. 24 ; Tab. 28**).

-Chez les individus traités avec CL<sub>25</sub>-96h, nous avons remarqués 7 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie de 8,20 à 250 kDa, avec l'absence d'un seul poids moléculaire de 17,6 kDa, 17,6, ainsi que l'apparition de nouvelles bandes dont les poids moléculaires sont : 135,1 kDa, 70,2 kDa, 25 kDa, et 8,20 kDa (**Fig. 24 ; Tab. 28**).

**En phase de dépuration**, l'analyse électrophorétique des vitellogénines démontre une diminution des bandes protéiques chez les traités CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> par rapport aux témoins, et a mis en évidence :

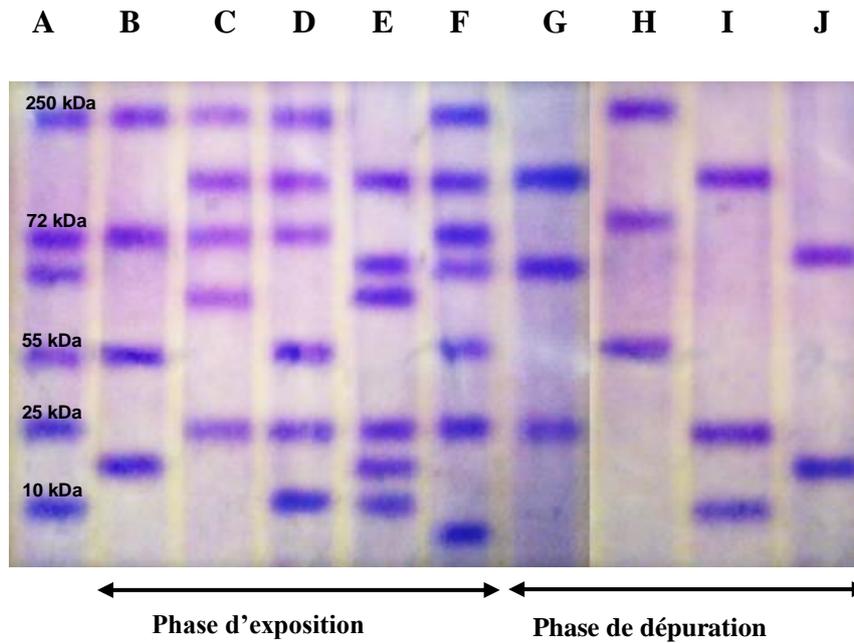
- Chez les témoins : la présence de 4 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 17,6 à 250 kDa.

- Chez les individus traités avec la CL<sub>10</sub>-48h : 4 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 25 à 250 kDa, avec l'absence des poids moléculaires suivants : 72k Da, 55 kDa, et 17,6kDa (**Fig. 24 ; Tab. 28**).

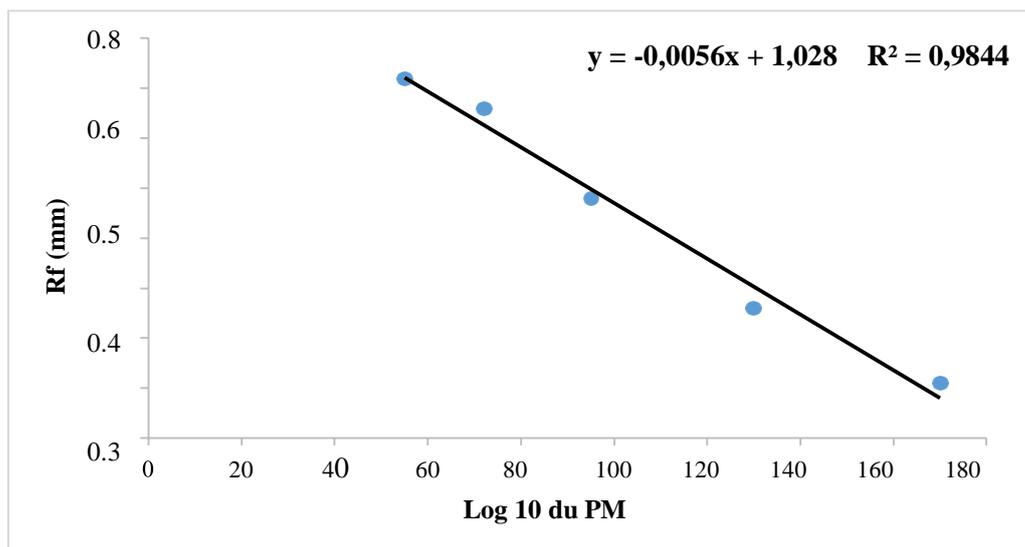
- Chez les individus traités avec la CL<sub>25</sub>-48h : 3 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 55 à 250 kDa, avec l'absence du poids moléculaire suivant : 17,6 kDa, et la récupération des poids moléculaires suivants : 250 kDa, 72 kDa, et 55 kDa (**Fig. 24 ; Tab. 28**).

- Chez les individus traités avec CL<sub>10</sub>-96h, nous avons constatés 3 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie de 10 à 135,1 kDa, avec l'absence des poids moléculaires suivants : 250 kDa, 72 kDa, 55 kDa, et 17,6 kDa (**Fig. 24 ; Tab. 28**).

- Chez les individus traités avec CL<sub>25</sub>-96h, nous avons notés la présence de 2 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie de 17,6 à 70,20 kDa, avec l'absence des poids moléculaires suivants : 250 kDa, 72 kDa, et 55 kDa (**Fig. 24 ; Tab. 28**).



**Figure 24.** Séparation électrophorétique des vitellogénines chez *D.trunculus* en période de repos sexuel. **A** : Protéines standards ; **B** : Témoin 0j ; **C** : CL<sub>10</sub> (48h) d'exposition ; **D** : CL<sub>25</sub> (48h) d'exposition ; **E** : CL<sub>10</sub> (96h) d'exposition ; **F** : CL<sub>25</sub> (96h) d'exposition ; **G** : CL<sub>10</sub> (48h) de déuration ; **H** : CL<sub>25</sub> (48h) de déuration ; **I** : CL<sub>10</sub> (96h) de déuration ; **J** : CL<sub>25</sub> (96h) de déuration.



**Figure 25.** Courbe d'étalonnage exprimant le rapport frontal (Rf) en fonction du poids moléculaire des vitellogénines (PM en kDa) en période de repos sexuel, et durant la phase d'exposition et de déuration.

**Tableau 28** : Poids moléculaire (PM, kDa) des différentes fractions protéiques des vitellogénines chez *D. trunculus* en période de repos sexuel, et durant la phase d'exposition et de déuration (0 : fraction manquante ; + : fraction présente).

PM	Concentration	Durée d'exposition			Durée de déuration		
		0	48h	96h	0	48h	96h
250 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	+	0	0	0	0
	CL <sub>25</sub>	+	+	+	+	+	0
135,1 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	+	+	+	+	+
	CL <sub>25</sub>	0	+	+	+	0	0
72 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	+	0	0	0	0
	CL <sub>25</sub>	+	+	+	+	+	0
70,2 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	0	+	+	+	0
	CL <sub>25</sub>	0	0	+	+	0	+
67,6 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	+	+	0	0	0
	CL <sub>25</sub>	0	0	0	0	0	0
55 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	0	0	0	0	0
	CL <sub>25</sub>	+	+	+	+	+	0
25 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	+	+	+	+	+
	CL <sub>25</sub>	0	+	+	+	0	0
17,6 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	0	+	+	0	0
	CL <sub>25</sub>	+	0	0	0	0	+
10 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	0	+	+	0	+
	CL <sub>25</sub>	0	+	0	0	0	0
8,2 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>25</sub>	0	0	+	+	0	0

### **3.1.2.3. Etude électrophorétique des vitellines en période d'activité sexuelle**

L'impact du cadmium sur la qualité des Vn en période d'activité sexuelle est présenté dans **la figure 26 et le tableau 29** ; et la courbe d'étalonnage exprimant le logarithme décimal du poids moléculaire (PM) des protéines standards en fonction du rapport frontal est exprimée dans **la figure 27**.

Durant **la phase d'exposition**, le profil électrophorétique révèle une augmentation dans le nombre de fractions protéiques chez les traités avec CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> comparativement aux témoins, et a mis en évidence ;

-Chez les témoins : la présence de 6 bandes protéiques dont le poids moléculaire varie entre 5 à 250 kDa (**Fig. 26 ; Tab. 29**).

-Chez les individus traités avec la CL<sub>10</sub>-48h : 8 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 5,1 à 250 kDa, avec l'absence des poids moléculaires suivants : 72 kDa, et l'apparition de nouvelles bandes avec des poids moléculaires de : 140,20 kDa, 62,30 kDa, 50,80 kDa, et 5,1 kDa (**Fig. 26 ; Tab. 29**).

-Chez les individus traités avec la CL<sub>25</sub>-48h : 9 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 5 à 250 kDa, avec l'absence des poids moléculaires suivants : 10 kDa, et l'apparition de nouveaux poids moléculaires : 62 kDa, 56,20 kDa, et 20,40 kDa (**Fig. 26 ; Tab. 29**).

-Chez les individus traités avec CL<sub>10</sub>-96h, nous avons constatés la présence de 9 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie de 5 à 240,5 kDa, avec l'absence des poids moléculaires suivants : 250 kDa ainsi que l'apparition de nouvelles bandes protéiques dont les poids moléculaires sont : 240,5 kDa, 62,30 kDa, 39,5 kDa, et 20,40 kDa (**Fig. 26 ; Tab. 29**).

-Chez les individus traités avec CL<sub>25</sub>-96h, 10 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie de 5 à 240,5 kDa, avec l'absence d'un seule poids moléculaires : 250 kDa, ainsi que l'apparition de nouvelles bandes dont les poids moléculaires sont : 240,5 kDa, 130,2 kDa, 62,30 kDa, 27,8 kDa, et 17 kDa (**Fig. 26 ; Tab. 29**).

Pendant **la phase de dépuration**, l'analyse électrophorétique des vitellines montre une diminution des bandes protéiques chez les traités CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> en comparaison avec les témoins et a mis en évidence ;

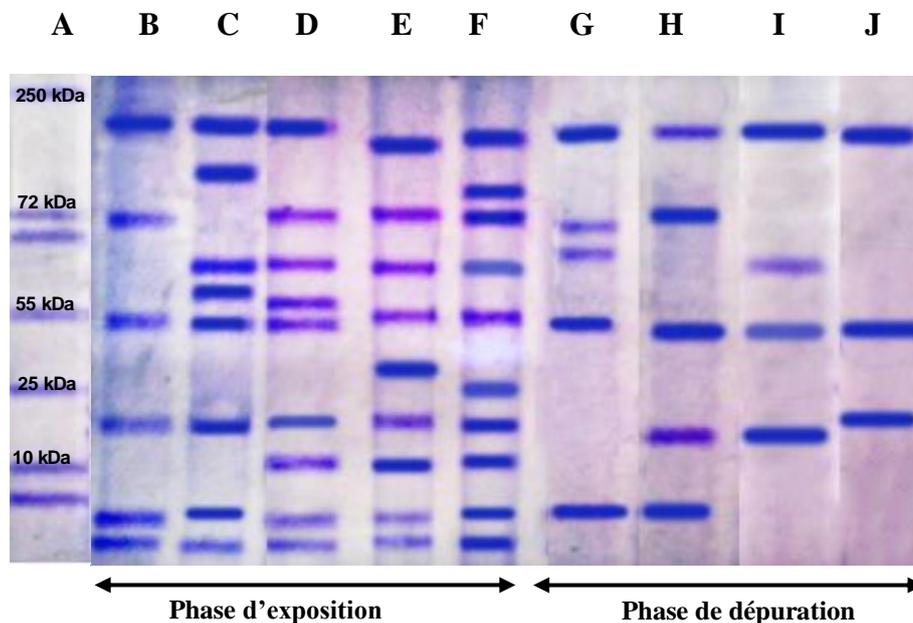
- Chez les témoins : la présence de 6 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 5 à 250 kDa (**Fig.26 ; Tab. 29**).

-Chez les individus traités avec la CL<sub>10</sub>-48h : 5 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 10 à 250 kDa, avec l'absence de deux poids moléculaires : 25 kDa, et 5 kDa (**Fig. 26 ; Tab. 29**).

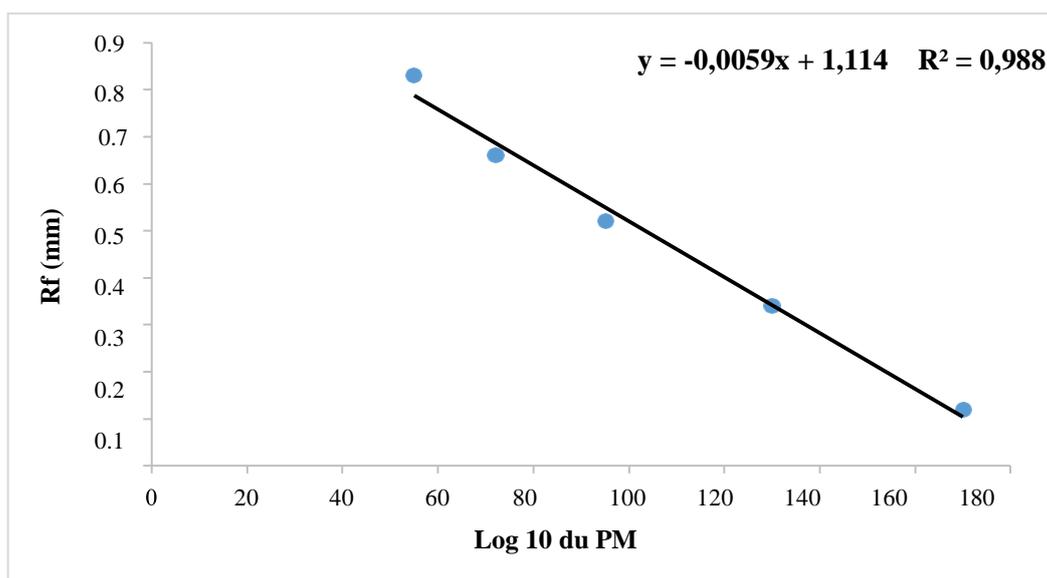
-Chez les individus traités avec la CL<sub>25</sub>-48h : 5 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie entre 10 à 250 kDa, avec l'absence d'un seule poid moléculaire : 5 kDa (**Fig. 26 ; Tab. 29**).

-Chez les individus traités avec CL<sub>10</sub>-96h, nous avons observés la présence de 4 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie de 25 à 250 kDa, avec l'absence des poids moléculaires suivants : 72 kDa, 10 kDa, et 5 kDa (**Fig.26 ; Tab. 29**).

-Chez les individus traités avec CL<sub>25</sub>-96h, nous avons remarqués 3 fractions protéiques dont le poids moléculaire varie de 7,8 à 240,85 kDa, avec aucune absence des poids moléculaires (**Fig. 26 ; Tab. 29**).



**Figure 26.** Séparation électrophorétique des vitellines chez *D.trunculus* en période d'activité sexuelle. **A** : Protéines standards ; **B** : Témoin 0j ; **C** : CL<sub>10</sub> (48h) d'exposition ; **D** : CL<sub>25</sub> (48h) d'exposition ; **E** : CL<sub>10</sub> (96h) d'exposition ; **F** : CL<sub>25</sub> (96h) d'exposition ; **G** : CL<sub>10</sub> (48h) de dépuration ; **H** : CL<sub>25</sub> (48h) de dépuration ; **I** : CL<sub>10</sub> (96h) de dépuration ; **J** : CL<sub>25</sub> (96h) de dépuration.



**Figure 27.** Courbe d'étalonnage exprimant le rapport frontal (Rf) en fonction du poids moléculaire des vitellines (PM en kDa) en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition et de déuration.

**Tableau 29 :** Poids moléculaire (PM, kDa) des différentes fractions protéiques des vitellines chez *D. trunculus* en période d'activité sexuelle, et durant la phase d'exposition et de déuration (0 : fraction manquante ; + : fraction présente).

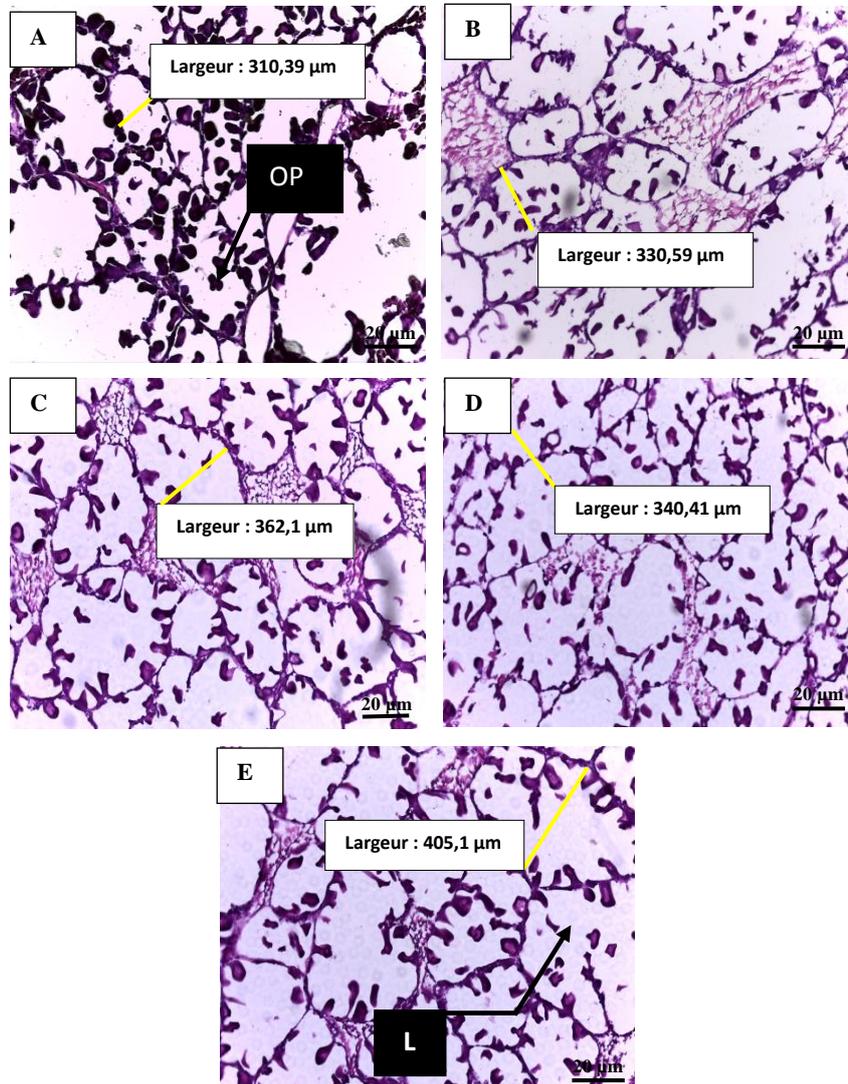
PM	Concentration	Durée d'exposition			Durée de déuration		
		0	48h	96h	0	48h	96h
250 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	+	0	0	+	+
	CL <sub>25</sub>	+	+	0	0	+	+
240,5 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	0	+	+	0	0
	CL <sub>25</sub>	0	0	+	+	0	0
140,20 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	+	0	0	0	0
	CL <sub>25</sub>	0	0	0	0		0
130,45 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>25</sub>	0	0	+	+	0	
72 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	0	+	+	+	0
	CL <sub>25</sub>	+	+	+	+	+	0
65,30 kDa	Témoins	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>10</sub>	+	+	+	+	+	+
	CL <sub>25</sub>	+	+	+	+	0	0
62,50 kDa	Témoins	0	0	0	0	0	0
	CL <sub>10</sub>	0	0	0	0	0	0

	<b>CL<sub>25</sub></b>	0	0	0	0		0
56,20 kDa	<b>Témoins</b>	0	0	0	0	0	0
	<b>CL<sub>10</sub></b>	0	+	0	0	0	0
	<b>CL<sub>25</sub></b>	0	+	0	0	0	0
55 kDa	<b>Témoins</b>	0	0	0	0	0	0
	<b>CL<sub>10</sub></b>	0	+	+	+	+	0
	<b>CL<sub>25</sub></b>	0	+	+	+	+	+
50,80 kDa	<b>Témoins</b>	0	0	0	0	0	0
	<b>CL<sub>10</sub></b>	0	0	0	0	0	0
	<b>CL<sub>25</sub></b>	0		0	0	0	0
39,5 kDa	<b>Témoins</b>	0	0	0	0	0	0
	<b>CL<sub>10</sub></b>	0	0	+	+	0	0
	<b>CL<sub>25</sub></b>	0	0	+	+	0	0
25 kDa	<b>Témoins</b>	+	+	+	+	+	+
	<b>CL<sub>10</sub></b>	+	+	+	+	0	+
	<b>CL<sub>25</sub></b>	+	+	+	+	+	+
20,40 kDa	<b>Témoins</b>	0	0	0	0	0	0
	<b>CL<sub>10</sub></b>	0	0	0	0	0	0
	<b>CL<sub>25</sub></b>	+	0	0	0	0	0
17 kDa	<b>Témoins</b>	0	0	0	0	0	0
	<b>CL<sub>10</sub></b>	0	0	+	+	0	0
	<b>CL<sub>25</sub></b>	0	+	+	+	0	0
10 kDa	<b>Témoins</b>	+	+	+	+	+	+
	<b>CL<sub>10</sub></b>	+	+	+	+	+	0
	<b>CL<sub>25</sub></b>	+	+	+	+	+	0
5 kDa	<b>Témoins</b>	+	+	+	+	+	+
	<b>CL<sub>10</sub></b>	+	+	+	+	0	0
	<b>CL<sub>25</sub></b>	+	+	+	+	0	0

### 3.2. Etude histologique

#### 3.2.1. Effet du cadmium sur la morphométrie de follicules ovariens

La figure 28 représente les résultats relatifs à l'effet du cadmium sur la morphométrie de follicules ovariens chez *D.trunculus*. De plus de trois répétitions ont été prises pour l'étude statistique à un grossissement (Gx10).



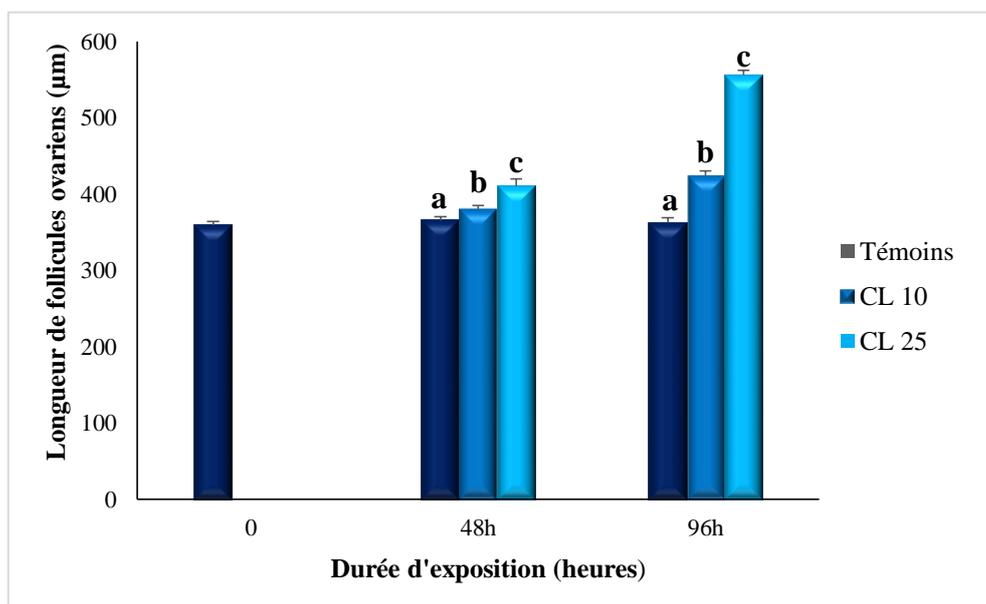
**Figure 28.** Coupes histologiques des ovocytes de *Donax trunculus* au stade de maturité sexuelle (Gx10). A : Témoins ; B : CL<sub>10</sub> (48h) ; C : CL<sub>10</sub> (96h) ; D : CL<sub>25</sub> (48h) ; E : CL<sub>25</sub> (96h) ; OP : Ovocyte pédonculé ; L : Lumière du follicule.

### 3.2.1.1. Effet du cadmium sur la longueur de follicules ovariens

Les résultats obtenus ont révélé une augmentation hautement significative de la longueur de follicules ovariens ( $P=0,000$ ) chez les individus traités avec la  $CL_{10}$  et  $CL_{25}$  comparativement aux témoins à 48h ( $F_{2,22} = 4109,88$  ;  $P=0,000$ ) et 96h ( $F_{2,22} = 87012,37$  ;  $P=0,000$ ) d'exposition, avec un impact plus marqué chez les individus traités à 96h d'exposition (**Fig. 29** ; **Tab. 30**).

Le test HSD de Tukey classant la longueur de follicules par concentration montre l'existence de trois groupes de classe par ordre décroissant, le premier groupe renferme les individus traités avec la  $CL_{25}$ , le deuxième groupe renferme les individus traités avec la  $CL_{10}$ . Enfin le troisième groupe renferme les témoins (**Tableau 31**).

L'AV2 montre un effet temps ( $F_{2,22}=204,00$ ,  $P=0,000$ ), un effet concentration ( $F_{2,22}=69,82$  ;  $P=0,000$ ) hautement significatifs, et une interaction concentration/temps ( $F_{2,22}=93,25$  ;  $P=0,000$ ) hautement significative (**Tableau 32**).



**Figure 29.** Effet du cadmium sur la longueur ( $\mu\text{m}$ ) de follicules ovariens chez *Donax trunculus* ( $m \pm SD$  ;  $n=3-4$ ). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes.

**Tableau 30** : Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) de la longueur ( $\mu\text{m}$ ) de follicules ovariens chez *D.trunculus* ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n=3-4$ ).

Temps	Source de variation	DDL	SC	CM	F obs	P
48h	Concentration	2	5174,23	2587,11	$F_{2,22} = 4109,88$	0,000***
	Erreur	12	7,55	0,63		
	Totale	14	5181,78			
96h	Concentration	2	97422,5	48711,3	$F_{2,22} = 87012,37$	0,000***
	Erreur	12	6,7	0,6		
	Totale	14	97429,2			

**Tableau 31** : Classement des concentrations de la longueur de follicules ovariens par le test HSD de Tukey.

Temps	Concentration	Valeurs moyennes	Groupes
48h	CL <sub>25</sub>	409,946	A
	CL <sub>10</sub>	380,780	B
	Témoins	365,126	C
96h	CL <sub>25</sub>	554,946	A
	CL <sub>10</sub>	422,600	B
	Témoins	361,926	C

**Tableau 32** : Analyse de la variance à deux critères de classification (temps, concentration) de la longueur de follicules ovariens chez *Donax trunculus* ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n=3-4$ ).

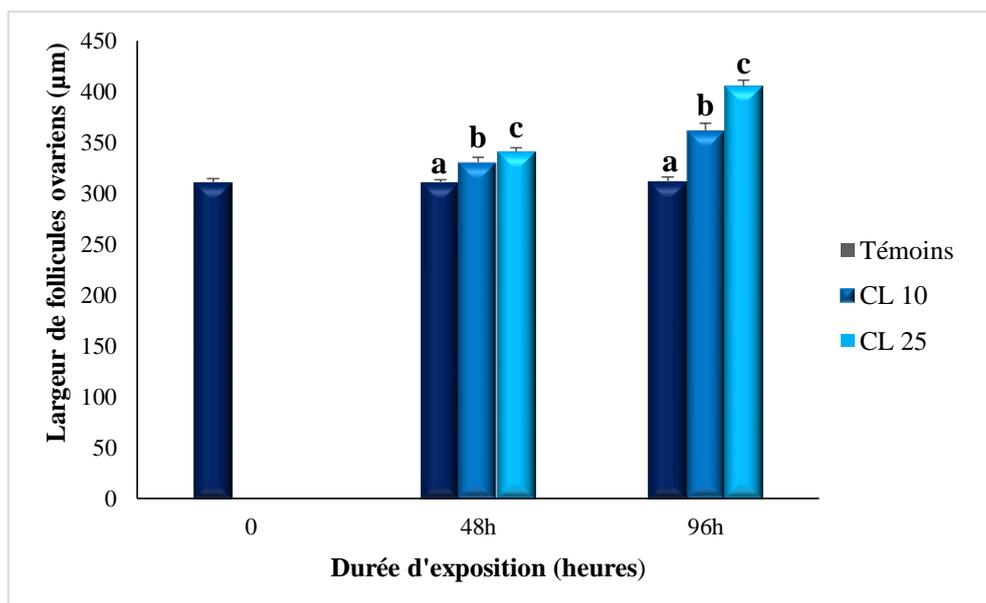
Source de variation	DDL	SCE	CM	F obs	P
Concentrations	2	23696	9816	$F_{2,22} = 69,82$	0,000***
Temps	2	60437	28681	$F_{2,22} = 204,00$	0,000***
Interaction concentration /temps	4	52440	13110	$F_{4,22} = 93,25$	0,000***
Erreur	22	3093	141		
Totale	30	139666			

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

### 3.2.1.2. Effet du cadmium sur la largeur de follicules ovariens

Après l'application de l'ANOVA à un critère de classification (concentration), les résultats indiquent une augmentation hautement significative de la largeur de follicules ovariens chez les individus traités avec la CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> par rapport aux témoins à 48h ( $F_{2,22}=2764,74$  ;  $P=0,000$ ) et à 96 h ( $F_{2,22}=55,79$  ;  $P=0,000$ ) d'exposition. L'effet est plus prononcé à 96 h d'exposition (**Fig. 31** ; **Tab. 33**). Le classement de la largeur de follicules ovariens par le test HSD de Tukey montre l'existence de trois groupes de classe, le premier groupe contient les individus traités avec la CL<sub>25</sub>, le deuxième groupe représente les individus traités avec la CL<sub>10</sub> et le troisième groupe renferme les témoins. Les valeurs moyennes les plus élevées sont enregistrées chez les traités avec la CL<sub>25</sub> (**Tableau 34**).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (temps, concentration) montre un effet temps ( $F_{2,22} = 74,33$  ;  $P=0,001$ ), un effet concentration ( $F_{2,22} = 20,03$  ;  $P=0,001$ ) hautement significatifs, et une interaction concentration/temps ( $F_{2,22} = 23,39$  ;  $P=0,000$ ) hautement significative (**Tableau 35**).



**Figure 30.** Effet du cadmium sur la largeur (µm) de follicules ovariens chez *Donax trunculus* ( $m \pm SD$  ;  $n=3-4$ ). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes.

**Tableau 33** : Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) de la largeur ( $\mu\text{m}$ ) de follicules ovariens chez *Donax trunculus* ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n=3-4$ ).

Temps	Source de variation	DDL	SC	CM	F obs	P
48h	Concentration	2	2602,63	1301,32	$F_{2,22} = 2764,74$	0,000***
	Erreur	12	5,65	0,47		
	Totale	14	2608,28			
96h	Concentration	2	23568	11784,2	$F_{2,22} = 55,79$	0,000***
	Erreur	12	2535	211,2		
	Totale	14	26103			

**Tableau 34** : Classement des concentrations de la largeur de follicules ovariens par le test HSD de Tukey.

Temps	Concentration	Valeurs moyennes	Groupes
48h	CL <sub>25</sub>	340,60	A
	CL <sub>10</sub>	330,90	B
	Témoins	309,10	C
96h	CL <sub>25</sub>	404,80	A
	CL <sub>10</sub>	343,70	B
	Témoins	308,90	C

**Tableau 35** : Analyse de la variance à deux critères de classification (temps, concentration) de la largeur de follicules ovariens chez *Donax trunculus* ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n=3-4$ ).

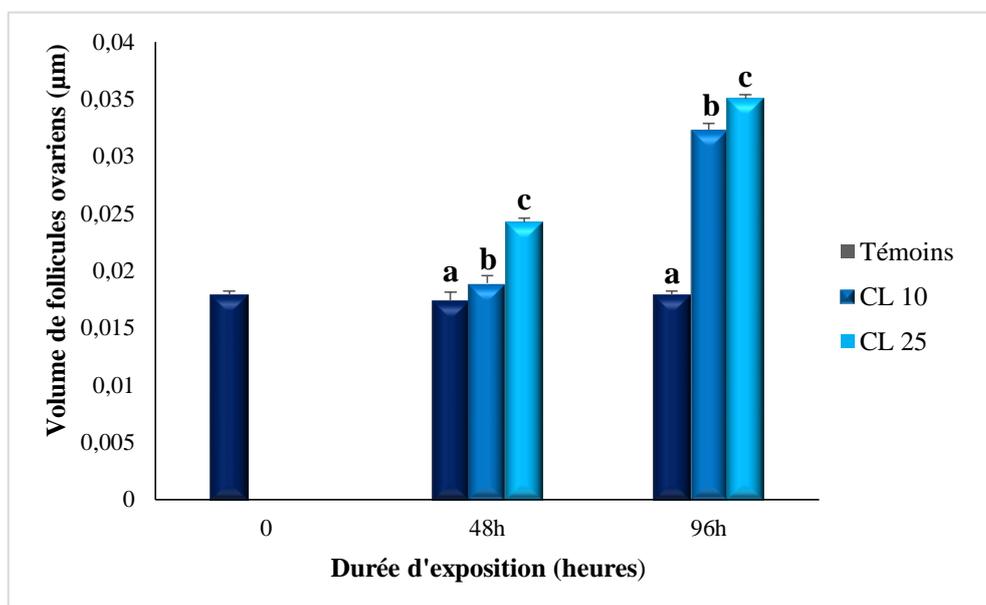
Source de variance	DDL	SCE	CM	F obs	P
Concentration	2	19494	6647	$F_{2,22} = 20,03$	0,001***
Temps	2	53833	24672	$F_{2,22} = 74,33$	0,001***
Interaction concentration/temps	4	31057	7764	$F_{4,22} = 23,39$	0,000***
Erreur	22	7302	332		
Totale	30	111687			

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

### 3.2.1.3. Effet du cadmium sur le volume de follicules ovariens

Les analyses statistiques montrent une augmentation hautement significative ( $P=0,001$ ) du volume de follicules ovariens chez les traités avec la CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> comparativement aux témoins à 48h ( $F_{2,19}= 6851,19$  ;  $P=0,000$ ) et 96h ( $F_{2,19}=63807,30$  ;  $P=0,000$ ) d'exposition. Ainsi une augmentation plus marquée est observée à 96h d'exposition (**Fig. 31** ; **Tab. 36**). Le test HSD de Tukey démontre l'existence de trois groupes de classes par ordre décroissant, le premier groupe renferme les individus traités avec la CL<sub>25</sub>, le deuxième groupe renferme les individus traités avec la CL<sub>10</sub>. Enfin le troisième groupe renferme les témoins (**Tableau 37**).

L'AV2 (Concentration, temps) indique un effet temps ( $F_{2,19} = 19,85$ ,  $P=0,000$ ), un effet concentration ( $F_{2,19}=34,52$  ;  $P=0,000$ ) hautement significatifs, et une interaction concentration, temps ( $F_{4,19} = 9,69$  ;  $P=0,001$ ) hautement significative (**Tableau 38**).



**Figure 31.** Effet du cadmium sur le volume (mm<sup>3</sup>) de follicules ovariens chez *Donax trunculus* ( $m \pm SD$  ;  $n=3-4$ ). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes.

**Tableau 36** : Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) du volume (mm<sup>3</sup>) de follicules ovariens chez *D.trunculus* (m ± SD, n=3-4).

Temps	Source de variation	DDL	SC	CM	F obs	P
48h	Concentration	2	0,000123	0,000062	F <sub>2,19</sub> = 6851,19	0,000***
	Erreur	12	0,000000	0,000000		
	Totale	14	0,000123			
96h	Concentration	2	0,000851	0,000425	F <sub>2,19</sub> = 63807,30	0,000***
	Erreur	12	0,000000	0,000000		
	Totale	14				

**Tableau 37** : Classement des concentrations du volume de follicules ovariens par le test HSD de Tukey.

Temps	Concentration	Valeurs moyennes	Groupes
48h	CL <sub>25</sub>	0,024120	A
	CL <sub>10</sub>	0,018740	B
	Témoins	0,017520	C
96h	CL <sub>25</sub>	0,035120	A
	CL <sub>10</sub>	0,032240	B
	Témoins	0,017900	C

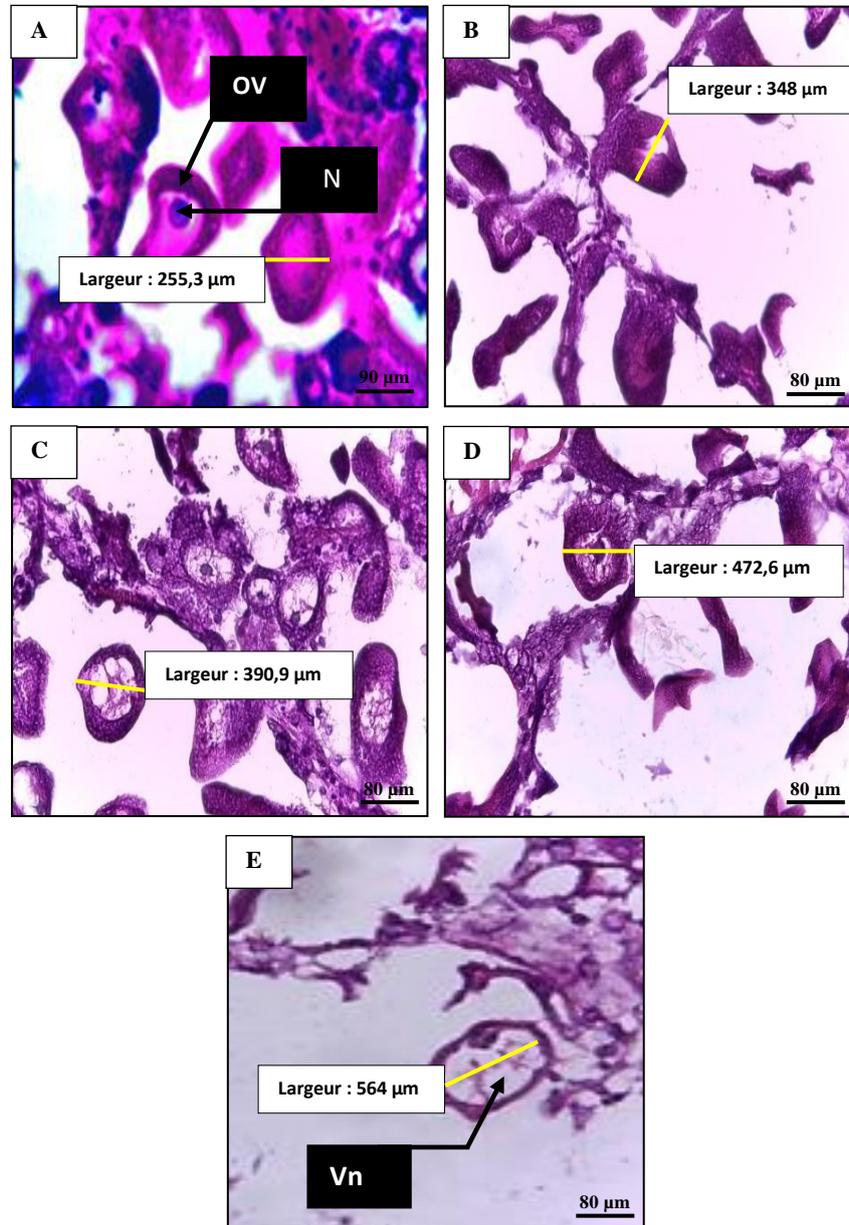
**Tableau 38** : Analyse de la variance à deux critères de classification (temps, concentration) du volume (mm<sup>3</sup>) de follicules ovariens chez *Donax trunculus* (m ± SD, n=3-4).

Source de variance	DDL	SCE	CM	FOB	P
Concentration	2	0,00026	0,00013	F <sub>2,19</sub> = 19,85	0,000***
Temps	2	0,00045	0,00022	F <sub>2,19</sub> = 34,52	0,000***
Interaction concentration/temps	4	0,00025	0,00006	F <sub>4,19</sub> = 9,69	0,001***
Erreur	19	0,00012	0,000006		
Totale	27	0,0010			

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

### 3.2.2. Effet du cadmium sur la morphométrie des ovocytes

Les coupes histologiques relatives aux effets du cadmium sur la morphométrie des ovocytes sont illustrées dans la **figure 32**. De plus de trois répétitions ont été étudiées à un grossissement (Gx40).

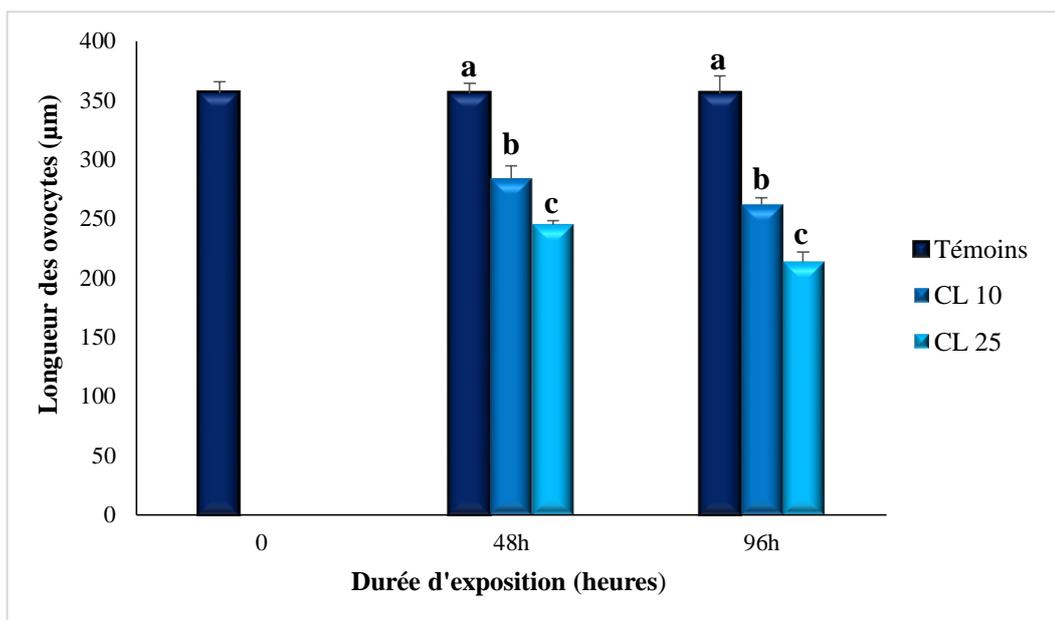


**Figure 32.** Coupes histologiques des ovocytes de *Donax trunculus* au stade de maturité sexuelle (Gx40). **A** : Témoins ; **B** : CL<sub>10</sub> (48h) ; **C** : CL<sub>10</sub> (96h) ; **D** : CL<sub>25</sub> (48h) ; **E** : CL<sub>25</sub> (96h) ; OV : Ovocyte mature ; N : Noyau ; Vn : Vitelline.

### 3.2.2.1. Effet du cadmium sur la longueur des ovocytes

La **figure 33** ci-dessous représente l'effet du cadmium sur la longueur des ovocytes. Les résultats obtenus montrent une diminution hautement significative ( $P=0,000$ ) de la longueur des ovocytes chez les individus traités avec la CL<sub>10</sub> et la CL<sub>25</sub> à 48 h ( $F_{2,18} = 235,10$  ;  $P=0,000$ ) et 96 h ( $F_{2,18} = 248,17$  ;  $P=0,000$ ) d'exposition ; la diminution est plus marquée à 96h d'exposition (**Tableau 39**). Le test HSD de Tukey classant la longueur des ovocytes par concentration montre l'existence de trois groupes de classes, le premier groupe renferme les témoins, le deuxième groupe renferme les individus traités avec la CL<sub>10</sub>. Enfin le troisième groupe renferme les individus traités avec la CL<sub>25</sub>. Les valeurs moyennes les plus élevées sont enregistrées chez les traités av la CL<sub>25</sub> (**Tableau 40**).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (temps, concentration) montre un effet temps ( $F_{2,18} = 6,18$  ;  $P=0,000$ ), un effet concentration ( $F_{2,18} = 23,93$  ;  $P=0,009$ ) hautement significatifs et une interaction concentration/temps ( $F_{4,18} = 7,45$  ;  $P=0,001$ ) hautement significative (**Tableau 41**).



**Figure 33.** Impact du cadmium sur la longueur des ovocytes ( $\mu\text{m}$ ) de *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n= 3-4$ ). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes.

**Tableau 39 :** Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) de la longueur des ovocytes ( $\mu\text{m}$ ) chez *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ).

Temps	Source de variation	DDL	SC	CM	F obs	P
48h	Concentration	2	31572,8	15786,4	$F_{2.18} = 235,10$	0,000***
	Erreur	12	805,8	67,1		
	Totale	14	32378,5			
96h	Concentration	2	52467	26233,3	$F_{2.18} = 248,17$	0,000***
	Erreur	12	1268	105,7		
	Totale	14	53735			

**Tableau 40 :** Classement des concentrations de la longueur des ovocytes par le test HSD de Tukey.

Temps	Concentration	Valeurs moyennes	Groupes
48h	Témoins	355,70	A
	CL <sub>10</sub>	283,85	B
	CL <sub>25</sub>	244,94	C
96h	Témoins	355,98	A
	CL <sub>10</sub>	261,89	B
	CL <sub>25</sub>	213,54	C

**Tableau 41 :** Analyse de la variance à deux critères de classification (concentration, temps) de la longueur des ovocytes de *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ).

Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Concentration	2	347774,2	17387,1	$F_{2.18} = 23,93$	0,000***
Temps	2	8983,9	4492,0	$F_{2.18} = 6,18$	0,000***
Interaction concentration/temps	4	21637,1	5409,3	$F_{4.18} = 7,45$	0,000***
Erreur résiduelle	18	13077,6	726,5		
Totale	26	78472,7			

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

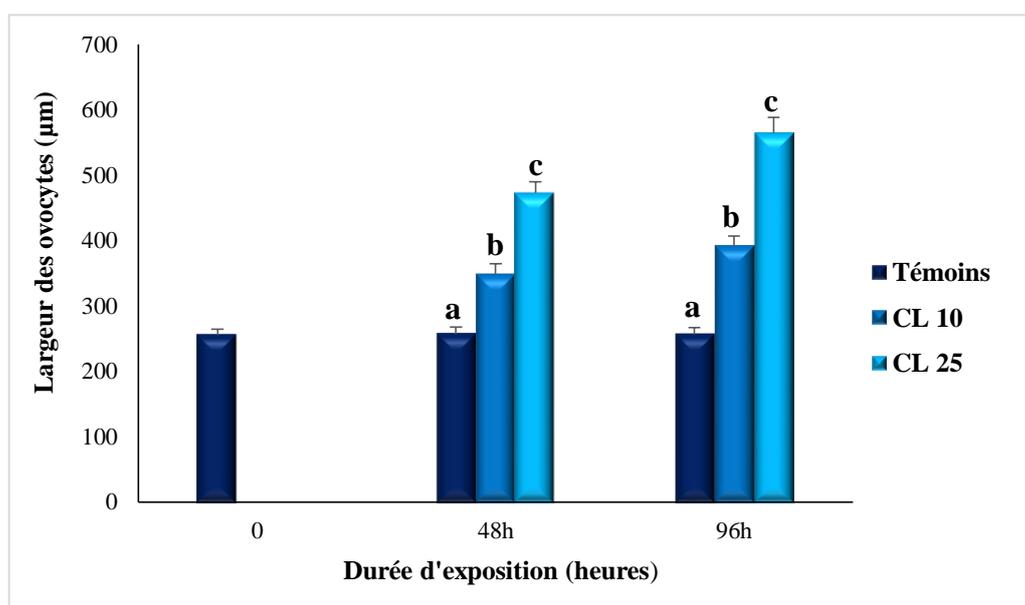
### 3.2.2.2. Effet du cadmium sur la largeur des ovocytes

Les résultats obtenus concernant l'effet du cadmium sur la largeur des ovocytes de *Donax trunculus* sont résumés dans la **figure 34**.

L'ANOVA à un critère de classification révèle une augmentation hautement significative ( $P=0,000$ ) de la largeur des ovocytes chez les individus traités avec la CL<sub>10</sub> et la CL<sub>25</sub> par rapport aux témoins à 48h ( $F_{2,18} = 8356,88$  ;  $P=0,000$ ) et à 96h ( $F_{2,18} = 2867,79$  ;  $P=0,000$ ) d'exposition avec un effet plus marqué à 96h d'exposition (**Tableau 42**).

Le test HSD de tukey à indiquer l'existence de trois groupes de classes par ordre décroissant, le premier groupe renferme les individus traités avec la CL<sub>25</sub>, le deuxième groupe contient les traités avec la CL<sub>10</sub>. Le troisième groupe renferme les témoins (**Tableau 43**).

L'AV2 révèle un effet temps ( $F_{2,20} = 65,37$  ;  $P=0,000$ ), un effet concentration ( $F_{2,20} = 45,81$  ;  $P=0,000$ ) hautement significatifs et une interaction concentration/temps ( $F_{4,20} = 20,19$  ;  $P=0,001$ ) hautement significative (**Tableau 44**).



**Figure 34.** Impact du cadmium sur la largeur des ovocytes de *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n = 3-4$ ). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes.

**Tableau 42 :** Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) de la largeur ( $\mu\text{m}$ ) des ovocytes chez *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ).

Temps	Source de variation	DDL	SC	CM	F obs	P
48h	Concentration	2	121711	60855,7	$F_{2.18} = 8356,88$	0,000***
	Erreur	12	87	7,3		
	Totale	14	121799			
96h	Concentration	2	243126	121563	$F_{2.18} = 2867,79$	0,000***
	Erreur	12	509	42		
	Totale	14	243635			

**Tableau 43 :** Classement des concentrations de la largeur des ovocytes par le test HSD de Tukey.

Temps	Concentration	Valeurs moyennes	Groupes
48h	CL <sub>25</sub>	473,09	A
	CL <sub>10</sub>	347,742	B
	Témoins	253,16	C
96h	CL <sub>25</sub>	563,58	A
	CL <sub>10</sub>	390,81	B
	Témoins	255,8	C

**Tableau 44 :** Analyse de la variance à deux critères de classification (concentration, temps) de la largeur des ovocytes de *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ).

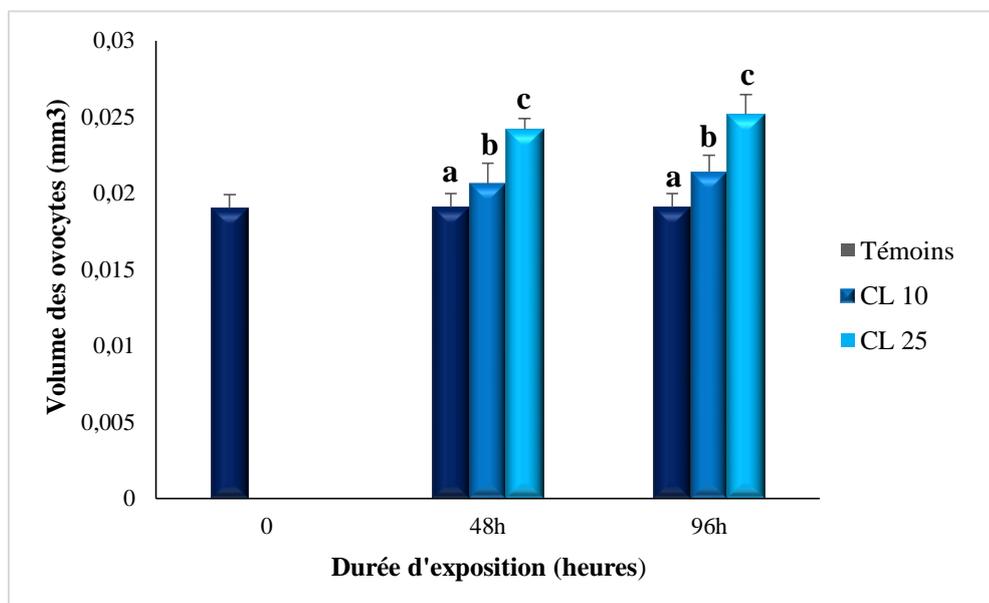
Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Concentration	2	21278,3	10639,1	$F_{2.20} = 45,81$	0,000***
Temps	2	30362,8	15181,4	$F_{2.20} = 65,37$	0,000***
Interaction concentration/temps	4	18750,3	4687,6	$F_{4.20} = 20,19$	0,001***
Erreur résiduelle	20	4180,2	232,2		
Totale	28	74571,6			

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

### 3.2.2.3. Effet du cadmium sur le volume des ovocytes.

L'AV1 des individus traités avec la CL<sub>10</sub> et la CL<sub>25</sub> affiche une augmentation hautement significative (P=0,000) du volume des ovocytes par rapport aux témoins après 48h ( $F_{2,18} = 19,96$  ; P=0,000) et 96h ( $F_{2,18} = 62472,10$  ; P=0,000) d'exposition, avec une augmentation plus accentuée à 96h d'exposition (**Fig. 35** ; **Tab. 45**). Le test HSD de Tukey révèle l'existence de trois groupes de classe par ordre décroissant, le premier groupe renferme les individus traités avec la CL<sub>25</sub>, le deuxième groupe renferme les individus traités avec la CL<sub>10</sub>. Enfin le troisième groupe renferme les témoins (**Tableau 46**).

L'ANOVA 2 montre un effet temps ( $F_{2,18} = 15,34$  ; P=0,001), un effet concentration ( $F_{2,18} = 10,36$  ; P=0,001) hautement significatifs et une interaction concentration/temps ( $F_{4,18} = 4,07$  ; P=0,001) hautement significative (**Tableau 47**).



**Figure 35.** Impact du cadmium sur le volume des ovocytes (mm<sup>3</sup>) de *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ , n= 3-4). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes.

**Tableau 45 :** Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) du volume ( $\text{mm}^3$ ) des ovocytes chez *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ).

Temps	Source de variation	DDL	SC	CM	F obs	P
48h	Concentration	2	0,000129	0,000064	$F_{2,18} = 19,96$	0,000***
	Erreur	12	0,000039	0,000003		
	Totale	14	0,000168			
96h	Concentration	2	0,000207	0,000103	$F_{2,18} = 62472,10$	0,000***
	Erreur	12	0,000000	0,000000		
	Totale	14	0,000207			

**Tableau 46 :** Classement des concentrations du volume des ovocytes par le test HSD de Tukey.

Temps	Concentration	Valeurs moyennes	Groupes
48h	CL <sub>25</sub>	0,02619	A
	CL <sub>10</sub>	0,02290	B
	Témoins	0,01902	C
96h	CL <sub>25</sub>	0,028194	A
	CL <sub>10</sub>	0,023168	B
	Témoins	0,019112	C

**Tableau 47 :** Analyse de la variance à deux critères de classification (concentration, temps) du volume des ovocytes de *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ).

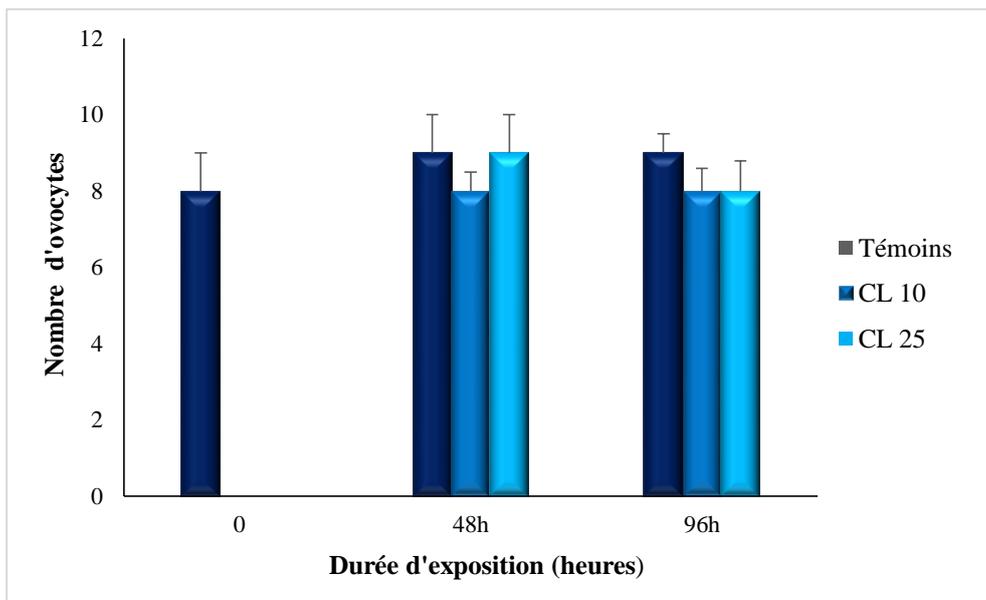
Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Concentration	2	0,0000361	0,0000180	$F_{2,18} = 10,36$	0,001***
Temps	2	0,0000534	0,0000267	$F_{2,18} = 15,34$	0,001***
Interaction concentration/temps	4	0,0000284	0,0000071	$F_{4,18} = 4,07$	0,001***
Erreur résiduelle	18	0,0000313	0,0000017		
Totale	26	0,0001492			

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

### 3.2.2.4. Effet du cadmium sur le nombre des ovocytes

La **figure 36** résume l'effet du cadmium sur le nombre d'ovocytes de *Donax trunculus*. L'analyse de la variance à un seul critère de classification n'a enregistré aucun effet concentration par rapport aux témoins après 48h ( $F_{2,18} = 1,29$  ;  $P=0,721$ ) et 96h ( $F_{2,18}=1,45$  ;  $P=0,721$ ) d'exposition (**Tableau 48**).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (temps, concentration) confirme les résultats obtenus, et n'a pas révélé d'effet temps ( $F_{2,18} = 0,23$  ;  $P=0,800$ ), ou effet concentration et ni une interaction temps/concentration ( $F_{4,18} = 0,40$  ;  $P=0,803$ ) (**Tableau 49**).



**Figure 36.** Impact du cadmium sur le nombre d'ovocytes de *Donax trunculus* ( $m\pm SD$ ,  $n= 3-4$ ). Les différentes significatives entre les multiples moyennes sont représentées par des lettres différentes.

**Tableau 48** : Analyse de la variance à un critère de classification (concentration) du nombre d'ovocytes chez *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ).

Temps	Source de variation	DDL	SC	CM	F obs	P
48h	Concentration	2	0,5333	0,2667	$F_{2.18} = 1,29$	0,311 NS
	Erreur	12	2,4800	0,2067		
	Totale	14	3,0133			
96h	Concentration	2	0,9333	0,4667	$F_{2.18} = 1,45$	0,273 NS
	Erreur	12	3,8600	0,3217		
	Totale	14	4,7933			

**Tableau 49** : Analyse de la variance à deux critères de classification (concentration, temps) du nombre d'ovocytes de *Donax trunculus* ( $m \pm SD$ ,  $n=3-4$ ).

Source	DDL	SC	CM	F obs	P
Concentration	2	2,074	1,037	$F_{2.18} = 0,33$	0,721 NS
Temps	2	1,407	0,704	$F_{2.18} = 0,23$	0,800 NS
Interaction concentration/temps	4	5,037	1,259	$F_{4.18} = 0,40$	0,803 NS
Erreur	18	56	3,111		
Totale	26	64,519			

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

### **3.3. Test de corrélation**

Après application du test de corrélation Pearson entre les différents paramètres étudiés chez *D. trunculus*. L'ensemble des résultats montre une corrélation positive hautement significative ( $p=0,000$ ) entre les teneurs de Vtg et Vn, les teneurs de Vn et la longueur de follicules, les teneurs de Vn et la largeur de follicules, les teneurs de Vn et le volume de follicules, les teneurs de Vn et largeur de l'ovocyte, les teneurs de Vn et le volume de l'ovocyte, les teneurs de Vtg et la longueur de follicules, les teneurs de Vtg et la largeur de follicules, les teneurs de Vtg et le volume de follicules, les teneurs de Vtg et largeur de l'ovocyte, les teneurs de Vtg et le volume de l'ovocyte, longueur des ovocytes et la largeur de follicules, largeur des ovocytes et la longueur de follicules, largeur des ovocytes et la largeur de follicules, largeur des ovocytes et le volume de follicules, volume des ovocytes et la longueur de follicules, volume des ovocytes et la largeur de follicules, volume des ovocytes et volume de follicules, la longueur et la largeur de follicules, la longueur et le volume de follicules, la largeur et le volume de follicules, la largeur et le volume de l'ovocyte (**Tableau 50**).

Une corrélation négative hautement significative ( $p= 0,000$ ) a été également révélée entre les taux de Vtg et la longueur de l'ovocyte, les taux de Vn et la longueur de l'ovocyte, la longueur et la largeur de l'ovocyte, la longueur et le volume de l'ovocyte, la longueur des ovocytes et la longueur de follicules, la longueur des ovocytes et le volume de follicules (**Tableau 50**).

**Tableau 50** : Corrélation entre tous les différents paramètres étudiés chez *Donax trunculus* (R= coefficient de corrélation ; P= niveau de signification).

Paramètres	Corrélation	
	R	P
Vitelline – vitellogénine	0,983	0,000
Vitelline – longueur de follicules	0,814	0,000
Vitelline – largeur de follicules	0,895	0,000
Vitelline – volume de follicules	0,850	0,000
Vitellogénine – longueur de follicules	0,791	0,000
Vitellogénine – largeur de follicules	0,866	0,000
Vitellogénine – volume de follicules	0,821	0,000
Longueur – largeur de follicules	0,975	0,000
Longueur – volume de follicules	0,910	0,000
Largeur – volume de follicules	0,941	0,000
Vitelline – longueur des ovocytes	-0,909	0,000
Vitelline – largeur des ovocytes	0,865	0,000
Vitelline – volume des ovocytes	0,749	0,000
Vitellogénine – longueur des ovocytes	-0,937	0,000
Vitellogénine – largeur des ovocytes	0,900	0,000
Vitellogénine – volume des ovocytes	0,799	0,000
Longueur – largeur des ovocytes	-0,957	0,000
Longueur – volume des ovocytes	-0,828	0,000
Largeur – volume des ovocytes	0,938	0,000
Longueur des ovocytes – longueur de follicules	-0,847	0,000
Longueur des ovocytes – largeur de follicules	0,907	0,000
Longueur des ovocytes – volume de follicules	-0,842	0,000
Largeur des ovocytes – longueur de follicules	0,911	0,000
Largeur des ovocytes – largeur de follicules	0,929	0,000
Largeur des ovocytes – volume de follicules	0,864	0,000
Volume des ovocytes – longueur de follicules	0,808	0,000
Volume des ovocytes – largeur de follicules	0,817	0,000
Volume des ovocytes – volume de follicules	0,765	0,000



# DISCUSSION

*« Tout travail scientifique est une réalisation communautaire et non pas l'œuvre d'un cavalier seul »*

*Stephen Jay.*

## 4. Discussion

La pollution du milieu marin peut engendrer un stress important au niveau des organismes aquatiques (**Carrier-Belleau et al., 2021**) qui se traduit par des réponses biochimiques ou cellulaires (**Briffa et al., 2020**). Ces réponses induites par les polluants sont considérées comme des biomarqueurs écotoxicologiques traduisant une réponse spécifique et/ou non spécifique au stress mesuré chez des espèces bioindicatrices de la pollution (**Tlili et al., 2010 ; Sussarellu et al., 2012 ; Martínez-Morcillo et al., 2020**).

Certains polluants sont capables d'altérer l'équilibre du système endocrinien chez les bivalves ainsi que le développement et la fonctionnalité de différents systèmes, et ce, de manière parfois irréversible (**Depledge & Billinghamurst, 1999**). En particulier, le système reproducteur a été identifié comme une cible particulièrement exposée (**Gagné et al., 2002 ; Baudrimont et al., 2020**). En effet, les perturbations structurelles et fonctionnelles causées par les polluants et leurs métabolites entraînent des modifications des performances physiologiques et comportementales, notamment la stéroïdogénèse et la vitellogénèse (**Benelli et al., 2001 ; Arab et al., 2004 ; Ortiz-Zarragoitia et Cajaraville, 2005 ; Zheng et al., 2017 ; Paschoalini et al., 2019**).

La vitellogénèse représente le processus de stockage de réserves, au sein de l'ovocyte, pour le développement du futur embryon. Chez les bivalves, les informations sont beaucoup moins nombreuses quant à la caractérisation de vitellines et/ou de précurseurs. Bien qu'il n'existe que très peu d'informations sur le système endocrinien des invertébrés, la synthèse de la vitelline (Vn), protéine majeure trouvée dans les ovocytes d'invertébrés synthétisée depuis la vitellogénèse, a été montrée comme étant régulée par les œstrogènes chez les bivalves d'eau douce et marins (**Quinn et al., 2004**).

Les métaux lourds constituent un groupe de polluants aquatiques majeurs en raison de leur persistance (**Yap et al., 2020 ; Amankwaa et al., 2021**). Le cadmium (Cd) est considéré parmi les métaux lourds les plus dangereux du fait de sa similarité ionique intrinsèque avec le calcium (**Vercauteren & Blust, 1999 ; Järup, 2003 ; Xie et al., 2014 ; Shi et al., 2018**). La toxicité du Cd peut provoquer une série de dysfonctionnements biochimiques et physiologiques tant chez l'homme que chez l'animal (**Santovito et al., 2015 ; Silva et al., 2017**). Comme l'épuisement des réserves énergétiques (**Merad & Soltani, 2017**), l'augmentation de la consommation d'oxygène (**Chandurvelan et al., 2017**) et les dommages à l'ADN (**Michel &**

**Vincent-Hubert, 2015**). De plus, la reprotoxicité du Cadmium a été bien documentée chez de nombreuses espèces aquatiques à différents niveaux (**Ketata et al., 2007**; **Baudrimont et al., 2019** ; **Smaoui-Damak et al., 2006** ; **Sieratowicz et al. ,2011** ; **Piscopo et al., 2019** ; **Cheng et al., 2021**).

#### **4.1. Effet sublétal du cadmium sur les taux de vitellogénines et vitellines**

Les vitellogénines (Vtg) et les vitellines (Vn) ont été classés comme des biomarqueurs biochimiques spécifiques aux contaminants œstrogéniques (**Jubeaux, 2015**), et leur utilisation en tant que biomarqueur de reprotoxicité chez les bivalves a fait l'objet de nombreux travaux (**Blaise et al., 1999** ; **Aarab et al., 2004** ; **Driessnack et al., 2017**).

Nos résultats ont révélé que l'exposition de *D. trunculus* à des concentrations sublétales du Cd entraîne une induction significative des teneurs en Vtg et Vn. Les réponses observées varient en fonction de la concentration, du temps d'exposition et des périodes du cycle sexuel. Ainsi, l'effet est relativement plus marqué avec la concentration la plus élevée et à 96h d'exposition. L'induction de ces teneurs pourrait être due au caractère métallo-œstrogène du Cd. En effet, de nombreuses études menées chez les mollusques bivalves démontrent que la synthèse des Vtg et Vn est régulée par les œstrogènes (**Quinn et al., 2004** ; **Matozzo et al., 2008**). Certaines xœstrogènes peuvent mimer l'action des œstrogènes, notamment en se liant aux récepteurs œstrogéniques produisant une réaction cellulaire identique, et on parle alors « d'hormone mimickers » ou hormone mimétiques (agoniste), ce qui provoquerait une induction de cette hormone et par conséquent une induction dans la synthèse des Vtg et Vn (**Morcillo et al., 1999** ; **Gagné et al.,2001** ; **Christian et al.,2002** ; **Quinn et al., 2004**).

Nos résultats concordent avec les données rapportées dans l'hémolymphe du bivalve *Mytilus edulis* exposé à une toxicité aiguë de cuivre et aux injections de nonylphénol (**Blaise et al., 1999** ; **Zorita et al., 2006**), et dans l'hémolymphe d'autres bivalves tels que *Elliptio complanata* durant une expérience de transplantation près d'une mine (**Gagné & Blaise, 2003**) ; ainsi que chez *Dreissena polymorpha* suite à l'exposition aux effluents toxiques renfermant du mercure et du cadmium (**Gnatyshyna et al., 2020**). De même, une induction de ces taux a été démontrée chez *Argopecten gibbus* et chez *Dreissena polymorpha* après une exposition à des effluents (**Quinn et al., 2004** ; **Quinn et al., 2005**). L'induction des Vtg et Vn a été également illustrée chez *Mytilus galloprovincialis* suite à l'exposition aux herbicides à base de glyphosate (**Fabrello et al., 2020**) .

D'autre part, nos résultats montrent une influence du cycle sexuel sur les teneurs en Vtg. En effet, les teneurs en Vtg sont plus élevées en période d'activité sexuelle qu'en période de repos sexuel. Cette différence peut s'expliquer par les variations des niveaux de Vtg qui se produisent durant le cycle sexuel d'un bivalve, et qui ont tendance à être beaucoup plus élevés durant la période d'activité sexuelle à fin de synthétiser les Vn au cours de la vitellogenèse (Mori *et al.*, 1965a ; Mori *et al.*, 1965b ; Charniaux-coton & Payen, 1988 ; Fingermen *et al.*, 1998 ; Gautier-Clerc *et al.*, 2002). La période de repos sexuel est caractérisée par une réduction de la synthèse de la Vtg chez les bivalves en raison de la réduction de l'activité gonadique. (Martin *et al.*, 1997), et la vitellogenèse serait inhibée par une neuro-hormone gonado-inhibitrice, également dénommée hormone d'inhibition de la vitellogenèse (Vitellogenesis-inhibiting hormone, VIH) (Tsutsui *et al.*, 2005, Ohira *et al.*, 2006). Nous rappelons que l'effet du cadmium est plus marqué à 96h d'exposition. Ceci suggère que la durée de l'exposition est très importante car la sensibilité d'un organisme aux perturbateurs endocriniens peut varier au fil du temps (Colborn et Clement, 1992).

#### **4.2. Effet sublétal du cadmium sur le profil électrophorétique**

Les changements dans l'expression des protéines sont souvent le signe d'une exposition ou d'un effet toxique (Witzmann *et al.*, 2000) qui peuvent être produits spécifiquement en réponse à un contaminant particulier (Shepard *et al.*, 2000). Ces changements peuvent être considérés comme des biomarqueurs intéressants étant donné qu'ils reflètent les réponses physiologiques aux conditions environnementales changeantes et stressantes (Gotelli *et al.*, 2012, Pedrosa *et al.*, 2017).

L'ensemble de nos résultats nous a permis d'enregistrer une induction dans le nombre des fractions protéiques des Vtg et Vn chez les traités CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub> comparativement aux témoins. L'induction observée varie en fonction de la concentration, du temps, et de la période du cycle sexuel, et la réponse est plus prononcée à 96h d'exposition. Ceci pourrait être dû en premier lieu à l'augmentation des taux de Vtg et Vn observée précédemment traduisant une augmentation dans le nombre des expressions protéiques. Par ailleurs, de nombreux travaux montrent que les récepteurs œstrogéniques possèdent une grande affinité pour les métaux y compris le cadmium. De ce fait, ces métaux peuvent interférer dans le mécanisme de synthèse et de structure de ces protéines, en agissant sur les phases post- traductionnelles (Varo *et al.*, 2007 ; Jakimska *et al.*, 2011 ; Meng *et al.*, 2017 ; Genchi *et al.*, 2020). Les réactions sont

complexes et multiples mais la génotoxicité du Cd a été démontrée chez de nombreux organismes aquatiques et également chez *D. trunculus* (**Lemoine et al., 2000**; **Ahmed et al., 2010**; **Nardi et al., 2017** ; **Merad et al., 2017**).

Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Lee et al. (2008b)** chez le copépode *Tigriopus japonicus*, révèlent une induction dans le nombre d'expressions des Vtg après 96h d'exposition au Cd. L'étude de **Chen et al. (2017)** chez *Tegillarca granosa* montre également que l'expression de la Vtg est très sensible à l'induction du Cd. Les travaux de **Shepard et al. (2000)** rapportent des altérations dans l'expression des Vtg chez *M. edulis*, suite à une exposition au cuivre dans des conditions contrôlées au laboratoire.

En milieu naturel, une induction dans le nombre des protéines gonadiques a été également révélée chez les femelles de *D. trunculus* et chez d'autre mollusque bivalves collectés d'un site pollué (**Rodriguez-Ortega et al., 2003** ; **Jurgen et al., 2011** ; **Hamdani et al., 2014** ; **Riva et al., 2011**). À notre connaissance, peu d'études ont abordé l'influence des polluants sur l'aspect qualitatif des Vtg et Vn chez les mollusques.

### 4.3. Effet sublétal du cadmium sur la morphométrie de l'ovaire

L'étude histologique des gonades par des mesures morphométriques des ovocytes est connu pour être un biomarqueur pertinent, et un complément aux études de reprotoxicité de manière à identifier les effets délétères de la perturbation endocrinienne au niveau cellulaire (**Yasmeen et al., 2019**), selon les doses d'exposition et les modes de contamination (**Alonzo et al., 2020**). L'étude histologique a été mis en évidence dans plusieurs travaux concernant les effet reprotoxiques induits par le Cd à différents niveaux tissulaires notamment, l'ovaire, la glande digestive, hépatopancréas ou les muscles adducteurs de plusieurs bivalves : *Mytilus galloprovincialis* (**Rocha et al., 2016**) ; *Lamellidens marginalis* (**Yasmeen et al., 2019**) et *Caelatura nilotica* (**Sheir et al., , 2020**).

La présente étude a révélé que l'exposition de *D. trunculus* aux deux concentrations sublétales du Cd entraîne une augmentation de la largeur et du volume des ovocytes, et une diminution de leur longueur. Autant, qu'il provoque également une augmentation de la largeur, longueur et du volume de follicules ovariens. Ces réponses varient en fonction de la concentration et du temps d'exposition. Ainsi, les réponses sont plus marquées à 96 d'exposition. Ces réponses pourraient être dues à l'augmentation des teneurs en Vtg et Vn mentionnées précédemment dans nos résultats. Les travaux d'**Arcos et al. (2009)** chez

*Crassostrea corteziensis* confirme cette hypothèse et ont montré que l'augmentation des teneurs en Vtg et Vn est synchronisée avec l'augmentation de la surface et du diamètre des ovocytes. De plus, plusieurs études chez d'autres espèces ont rapporté une corrélation positive entre les concentrations de Vtg, Vn et le diamètre des ovocytes (**Vazquez-Boucard, 2002 ; Qunitio & Millamena 1992 ; Li et al., 1998**). L'augmentation de la surface de follicules ovariens est due forcément à l'augmentation du volume des ovocytes. Cependant, il n'y avait aucun effet sublétal du cadmium sur le nombre d'ovocytes.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Yee-Duarte et al. (2018)** et **Yasmeen (2019)**, qui ont rapporté une augmentation du volume des ovocytes et des follicules ovariens chez les bivalves *Crassostrea gigas* et *Lamellidens marginalis* respectivement, suite à leurs expositions aiguës au cadmium.

#### 4.4. Dépuration du cadmium

Ces dernières années, les études se sont intéressées de plus en plus à la possibilité de purification des produits chimiques toxiques pour l'organisme aquatique lui-même, mais aussi pour ses consommateurs (**Belabed & Solatni, 2013 ; Zhang et al., 2015 ; Belabed & Solatni, 2018**). Le Cd pénètre dans la chaîne alimentaire aquatique par voie directe à partir de la colonne d'eau ou par voie indirecte trophique à partir de biote (**Cosson et al., 2008**). Les Mollusques Bivalves ont une grande capacité d'accumulation du Cd, avec des concentrations proportionnelles à la durée d'exposition (**Gu et al., 2021**). De plus, chez les mollusques bivalves, l'exposition chronique à ce métal augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui entraîne un stress oxydatif endommageant les compartiments intracellulaires à différents niveaux (**Belabed & Soltani, 2013 ; Pedrosa et al., 2017 ; Parra et al., 2021**). Pour ses raisons, le mécanisme de dépuration du Cd chez les bivalves doit être pris en considération pour réduire l'exposition des mollusques aux métaux lourds (**Zhang et al., 2015**). En effet, la dépuration permet aux bivalves de chasser et d'isoler les contaminants de leurs branchies et de leur tube digestif sur une longue période (**Heiba et al., 2021**). De plus, l'étude du processus de dépuration est importante car elle permet de révéler si les effets du contaminant persistent longtemps après sa disparition ou non (**Sanghvi et al., 2003 ; Sundin et al., 2019**). **Barile et al. (2009)** montrent que la capacité de l'espèce à surmonter les effets nocifs d'un polluant dépend de la durée de dépuration, de l'espèce elle-même et de son état de santé,

de la nature du polluant et son mode de pénétration, mais également de la quantité de polluant introduite dans l'organisme.

Dans cette étude et durant la phase de restauration, nos résultats révèlent une diminution progressive des taux de Vtg et Vn. Cette diminution varie en fonction des concentrations sublétales testées (CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub>), du temps et de la période du cycle sexuel étudié (repos / activité sexuelle) ; la réduction de ces taux pourrait être due à une récupération des activités anti-œstrogéniques (**Cruzeiro et al., 2016** ; **Moncaleano-Nino et al., 2017** ; **Xu et al., 2020**).

Nos résultats concordent avec les travaux de **Hemmer et al. (2002)** chez le poisson *Cyprinodon variegatus* qui révèlent une récupération complète des taux de Vtg et Vn à 96 h de dépuración, les travaux de **Moffatt et al. (2010)** montre un potentiel de récupération après 48h de dépuración chez le poisson *Oryzias latipes*, les travaux de **Guo et al. (2019)** chez la crevette *Macrobrachiu mrosenbergii*, ont rapporté une récupération de ces taux après 192h de dépuración.

En ce qui concerne les profils protéiques des Vtg et Vn, une diminution dans le nombre des fractions protéiques a été constatée durant la période de repos sexuel et l'activité sexuelle de *D.trunculus*. On pourrait expliquer cette diminution par le fait que les teneurs en Vtg et Vn ont baissé significativement traduisant une réduction au niveau des expressions protéiques. L'ensemble des résultats confirme les travaux antérieurs et révèle un potentiel de purification important chez *D. trunculus*, montrant une capacité de récupération au bout de 96 heures de dépuración (**Belabed & Solatni, 2013** ; **Merad, 2017**). À notre connaissance, très peu d'études ont abordé l'influence de la phase de dépuración sur les taux Vtg et Vn et également sur leurs profils électrophorétiques chez les mollusques bivalves.



# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

*«Le signe premier de la certitude scientifique, C' est qu'elle peut être revécue aussi bien dans son analyse que dans sa synthèse.»*

*Gaston Bachelard*

## **5. Conclusion et perspectives**

La présente thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche P.R.F.U «Préservation des produits de la pêche et la lutte contre les insectes des denrées stockées » du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée. Elle a pour objectif d'évaluer les effets sublétaux du cadmium (Cd) sur l'aspect reproductif d'une espèce comestible et bioindicatrice de la pollution, *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) ; et vise également à évaluer la capacité de cette espèce à surmonter le stress chimique induit par le Cd. Les études ont été menées en condition contrôlées du laboratoire et durant une période d'exposition aiguë (96 heures) et une période de dépuración de la même durée. En utilisant deux concentrations sublétales du Cd (CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub>) déterminées précédemment par **Merad et Soltani (2015)** et en considérant les périodes du cycle sexuel (activité/ repos), deux volets ont été abordés :

- Le volet biochimique est consacré aux dosages biochimiques et aux études électrophorétiques des biomarqueurs de reprotoxicité : la vitellogénine (Vtg) et la vitelline (Vn) au niveau de l'hémolymphe et des ovaires de *Donax trunculus* respectivement.
- Le volet cytologique est relatif à une étude histologique des ovaires de *Donax trunculus*.

**Concernant l'aspect biochimique et durant la période d'exposition** : l'ensemble des résultats montre une augmentation des teneurs en Vtg et Vn chez les traités comparativement aux témoins. Cette induction varie en fonction du temps, de la concentration et de la période du cycle sexuel. Ces résultats évoquent que le Cd agit comme un métallo-œstrogène sur le système endocrinien de *D.trunculus* avec une relation concentration-effet. D'autre part, l'influence du cycle sexuel sur le biomarqueur de reprotoxicité des Vtg est due à la vitellogenèse et à la reprise de l'activité gonadique.

Relativement aux données du profil électrophorétique de ces biomarqueurs de reprotoxicité, nos résultats montrent une induction dans le nombre des fractions protéiques chez les traités comparativement aux témoins. Cette induction varie en fonction du temps, de la concentration et de la période du cycle sexuel, et ceci pourrait être dû en premier lieu à l'augmentation des taux Vtg et Vn observée précédemment traduisant une augmentation dans le nombre des expressions protéiques.

En ce qui concerne **l'aspect cytologique** : Nos résultats ont permis de mettre en évidence une induction dans la morphométrie de follicules ovariens chez les traités comparativement aux témoins. Par ailleurs, nos données concernant la morphométrie d'ovocyte et en comparaison avec les témoins, montrent une augmentation de la largeur et du volume d'ovocyte et une diminution de sa longueur. Ces réponses varient en fonction de la concentration et du temps d'exposition ; cette augmentation de la surface d'ovocyte est probablement liée à l'augmentation des taux de Vn induite par le Cd ; En revanche, aucun effet temps ou concentration n'a été observé pour le nombre d'ovocytes et aucune lésion histologique n'a été révélée.

**Concernant la phase de dépuración** : Les résultats ont indiqué une diminution progressive des taux des Vtg et Vn. ainsi, qu'une diminution dans le nombre de fractions protéiques des Vtg et Vn a été également observé ; cette réduction varie en fonction du temps, concentration et de la période du cycle sexuel. L'ensemble des résultats suggèrent que *D.trunculus* possède un potentiel de purification important, montrant une capacité de récupération au bout de 96 heures de dépuración.

En perspective à ce travail nous envisagerons essentiellement de faire :

- Un dosage du cadmium dans le sédiment et la chair de *Donax trunculus*.
- Une prolongation de la durée d'exposition au cadmium (exposition chronique), afin d'identifier les mécanismes d'action, et les effets à long terme.
- Un dosage des hormones stéroïdiennes dans la gonade comme l'œstradiol E2, de manière à déterminer le rôle de l'œstrogène dans la synthèse des Vtg/ Vn.
- Une approche protéomique des Vtg et Vn à l'aide d'une spectrométrie de masse couplés à l'utilisation des banques génomiques (GenBank), afin d'identifier les séquences peptidiques des Vtg et Vn.
- Une étude complémentaire portant sur d'autres biomarqueurs de reprotoxicité, comme l'étude de la qualité des gamètes et des larves (Vitesse de déplacement des gamètes, survis des larves D), et ceci dans le but de mieux caractériser les éventuelles perturbations de la reproduction chez les bivalves.



# RÉSUMÉ

*«Une science est un ensemble ordonné de paradoxes testables, et d'erreurs rectifiées».*

*Comte-Sponville*

## 6. Résumé

Le Cd est un métal lourd très toxique dont sa présence a été détectée dans le golfe d'Annaba. Les recherches menées au cours de la réalisation de cette thèse, ont pour objectif d'étudier en conditions de laboratoire, les effets sublétaux du cadmium (Cd) sur l'aspect reproductif d'une espèce comestible et bioindicatrice de la pollution, *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) ; et vise également à évaluer la capacité de cette espèce à surmonter le stress chimique induit par le Cd, en utilisant des réponses biochimiques et cytologiques chez *Donax trunculus*.

Les études se sont déroulées en deux phases : une première phase d'exposition aigüe au Cd d'une durée de 96 h, suivis d'une seconde phase de dépuración d'une même durée. En considérant les périodes du cycle sexuel : la période d'activité sexuelle et la période de repos sexuel. L'échantillonnage a été effectué au niveau de la plage d'El Battah, un site éloigné des sources de pollution. Les échantillons ont été élevés au laboratoire et les paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH, la salinité et l'oxygène dissout ont été mesurés. Le chlorure de Cd a été additionné à l'eau d'élevage à deux concentrations sublétales (CL<sub>10</sub> et CL<sub>25</sub>) déterminées précédemment par **Merad et Soltani (2015)**.

Concernant les réponses biochimiques, nos résultats ont montré que le cadmium entraîne une augmentation des teneurs en vitellogénines et vitellines chez *D. trunculus* avec une relation concentration-effet. De plus, il provoque une induction dans le nombre des fractions protéiques des Vtg et Vn ; ces inductions varient en fonction du temps, de la concentration et de la période du cycle sexuel.

En ce qui concerne les réponses cytologiques, nos résultats ont permis de mettre en évidence que le cadmium a pu causer une hypertrophie de follicule ovarien due à l'augmentation de la largeur et du volume d'ovocyte ; ces réponses varient en fonction du temps et de la concentration ; En revanche, aucun effet temps ou concentration n'a été observé pour le nombre d'ovocytes et aucune lésion histologique n'a été révélée.

Relativement à la phase de dépuración, les résultats de notre étude ont révélé une réduction progressive des taux de Vtg et Vn suivie d'une diminution dans le nombre des fractions protéiques ; cette réduction varie en fonction du temps, de la concentration et de la période du cycle sexuel.

L'ensemble des résultats confirme le caractère métallo-œstrogénique du Cd pour *D. trunculus*, qui pourrait agir sur son système endocrinien en induisant la synthèse des Vtg et Vn, il pourrait également modifier l'expression des profils électrophorétiques de ces derniers. De plus, le Cd pourrait être en mesure de provoquer des modifications dans la morphométrie des follicules ovariens et des ovocytes de *D. trunculus*, qui sont probablement liés à l'augmentation des teneurs en Vn dans l'ovocyte. Par ailleurs, l'influence du cycle sexuel sur le biomarqueur de reprotoxicité Vtg est due à la vitellogenèse et à la reprise de l'activité gonadique. D'autre part, cette espèce a révélé un potentiel de restauration assez important avec une éventuelle récupération d'effets anti-œstrogéniques qui confirme l'efficacité de la phase de dépuración pour réduire le stress subit après une contamination métallique à faible concentration.

**Mots clés :** *Donax trunculus*, Cadmium, Biomarqueurs de reprotoxicité, Ovaires, Hémolymphe, Dépuración.

## Abstract

Cd is a very toxic heavy metal whose presence has been detected in the Gulf of Annaba. The research conducted during the realization of this thesis, aims to study under laboratory conditions, the sublethal effects of cadmium (Cd) on the reproductive aspect of an edible species and bioindicator of pollution, *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) ; and also aims to assess the ability of this species to overcome the chemical stress induced by Cd, using biochemical and cytological responses in *Donax trunculus*.

The studies were carried out in two phases : a first phase of acute exposure to Cd lasting 96 h, followed by a second phase of depuration of the same duration. Considering the periods of the sexual cycle : the period of sexual activity and the period of sexual rest. The sampling was carried out at the beach of El Battah, a site far from the sources of pollution. The samples were reared in the laboratory and physico-chemical parameters such as temperature, pH, salinity and dissolved oxygen were measured. Cd chloride was added to the rearing water at two sublethal concentrations (LC<sub>10</sub> and LC<sub>25</sub>) determined previously by **Merad & Soltani (2015)**.

Concerning the biochemical responses, our results showed that cadmium causes an increase in the levels of vitellogenins and vitellines in *D. trunculus* with a concentration-effect relationship. Moreover, it causes an induction in the number of protein fractions of vitellogenins and vitellins ; these inductions vary according to time, concentration and period of the sexual cycle.

Regarding the cytological responses, our results showed that cadmium could cause ovarian follicle hypertrophy due to the increase in oocyte width and volume ; these responses varied according to time and concentration ; on the other hand, no time or concentration effect was observed for the number of oocytes and no histological lesions were revealed.

Regarding the depuration phase, the results of our study revealed a progressive reduction in the levels of Vtg and Vn followed by a decrease in the number of protein fractions; this reduction varies according to time, concentration and period of the sexual cycle.

All the results confirm that cadmium has the character of a metallo-estrogen for *D. trunculus*, it could act on its endocrine system by inducing the synthesis of Vtg and Vn, and could also modify the expression of the electrophoretic profiles of the latter. Moreover, it could induce changes in the morphometry of ovarian follicles and oocytes of *D. trunculus*, which are probably related to the increase of Vn contents in the oocyte. On the other hand, the influence of the sexual cycle on the biomarker of reprotoxicity Vtg is due to vitellogenesis and the resumption of gonadal activity. On the other hand, this species revealed a rather important restoration potential with a possible recovery of anti-estrogenic effects which confirms the effectiveness of the depuration phase to reduce the stress undergone after a metallic contamination at low concentration.

**Key words** : *Donax trunculus*, Cadmium, Biomarkers of reprotoxicity, Ovaries, Hemolymph, Depuration.

الكادميوم معدن ثقيل شديد السمية تم الكشف عن وجوده في خليج عنابة. يهدف البحث الذي تم إجراؤه أثناء تحقيق هذه الأطروحة إلى الدراسة في ظروف معملية ، التأثيرات غير المميتة للكادميوم (Cd) على الجانب التناسلي للأنواع الصالحة للأكل والمؤشر الحيوي للتلوث *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) ، ؛ ويهدف أيضاً إلى تقييم قدرة هذا النوع على التغلب على الإجهاد الكيميائي الناجم عن الكادميوم ، باستخدام الاستجابات البيوكيميائية والخلوية في *Donax trunculus*.

أجريت الدراسات على مرحلتين: المرحلة الأولى من التعرض الحاد للكاديوم لمدة 96 ساعة ، تليها مرحلة ثانية من التنقية لنفس المدة. النظر في فترات الدورة الجنسية: فترة النشاط الجنسي وفترة الراحة الجنسية. وجرى أخذ العينات على شاطئ البطاح، وهو موقع بعيد عن مصادر التلوث. تمت إضافة كلوريد الكادميوم إلى مياه التربية بتركيزين شبه مميئين تم تحديدهما مسبقاً (Merad & Soltani 2015).

فيما يتعلق بالاستجابات الكيميائية الحيوية ، أظهرت نتائجنا أن الكادميوم يؤدي إلى زيادة في مستويات Vn و Vtg في *D. trunculus* مع علاقة تأثير التركيز. بالإضافة إلى ذلك ، فإنه يسبب الحث في عدد أجزاء البروتين من Vn و Vtg. تختلف هذه التحريصات وفقاً للوقت والتركيز وفترة الدورة الجنسية.

فيما يتعلق بالاستجابات الخلوية ، أظهرت نتائجنا أن الكادميوم ربما تسبب في تضخم بصيلات المبيض بسبب زيادة عرض وحجم البويضة ؛ هذه الاستجابات تختلف مع الوقت والتركيز ؛ من ناحية أخرى ، لم يلاحظ أي تأثير زمني أو تركيز لعدد البويضات ولم يتم الكشف عن آفات نسيجية. متبوعاً بانخفاض في عدد أجزاء البروتين ؛ تختلف هذه التحريصات حسب الوقت والتركيز وفترة الدورة الجنسية.

تؤكد جميع النتائج أن الكادميوم له طابع معدني - استروجين ل *D. trunculus* ، ويمكن أن يعمل على نظام الغدد الصماء الخاص به عن طريق تحفيز تخليق Vn و Vtg ، ويمكن أيضاً تعديل التعبير عن الملامح الكهربائية لهذا الأخير. بالإضافة إلى ذلك ، يمكن أن يسبب تغيرات في مورفومتريا بصيلات المبيض وبويضات *D. trunculus* ، والتي ربما تكون مرتبطة بزيادة محتويات Vn في البويضة. بالإضافة إلى ذلك ، فإن تأثير الدورة الجنسية على العلامة الحيوية للسمية Vtg يرجع إلى تكوين vitellogénese واستئناف نشاط الغدد التناسلية. من ناحية أخرى ، كشف هذا النوع عن إمكانية استعادة مهمة إلى حد ما مع إمكانية استعادة الآثار المضادة للاستروجين التي تؤكد فعالية مرحلة التنقية للحد من الإجهاد الذي يعاني منه التلوث المعدني بتركيزات منخفضة.

**الكلمات المفتاحية:** *D. trunculus* ، الكادميوم ، المؤشرات الحيوية سامة للتكاثر ، البويضة ، لف الدموي ، ، نقاهة.



# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

*«Pour un esprit scientifique, toute connaissance est une réponse à une question. S'il n'y a pas eu de question, il ne peut y avoir connaissance scientifique. Rien ne va de soi. Rien n'est donné. Tout est construit.»*

*Gaston Bachelard*

## 7. Références bibliographiques

### A

---

- Aarab N., 2004.** Les biomarqueurs chez les Poissons et les Bivalves : de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Thèse de doctorat en sciences du vivant, géosciences, et sciences de l'environnement, option : Ecotoxicologie des milieux aquatiques, Université de bordeaux. P 19.
- Adhya, M., Kim, BK., Jeung, HD. et al., 2018.** Purification and Characterization of Vitellin from the Egg of the Suminoe Oyster *Crassostrea ariakensis* and Cross-Reactivity of Anti-vitellin Antibody with Other Marine Invertebrate Egg Proteins. *Protein J* **37**, 82–92. [Doi.org/10.1007/s10930-017-9753-7](https://doi.org/10.1007/s10930-017-9753-7).
- Adriano, D.C., 1986.** Trace Elements in the Terrestrial, 574.19'214 85-9914. [Doi. 10.1007/978-1-4757-1907-9](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1907-9).
- Aguirre-Martinez, G., 2021.** Chapter 14 - Effective biomarkers to assess the toxicity of pharmaceutical residues on marine bivalves, In Estuarine and Coastal Sciences Series, Pharmaceuticals in Marine and Coastal Environments, Elsevier, Volume **1**, Pages 419-455. [Doi.org/10.1016/B978-0-08-102971-8.00003-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102971-8.00003-2).
- 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. *Environmental toxicology and pharmacology*, **30(1)**, 80-84. [Doi.org/10.1016/j.etap.2010.04.003](https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.04.003).
- Al-Alam, J., 2017.** Polluants organiques : analyse, application au « biomonitoring » environnemental et introduction des biopesticides (algues marines) comme alternative. Page. 35.
- Alderdice, D.F., Rosenthal, H., & Velsen, F.P.J., 1979.** Influence of salinity and cadmium on capsule strength in Pacific herring eggs. *Helgolander Wiss. Meeresunters* **32**, 149–162 (1979). [Doi.org/10.1007/BF02189894](https://doi.org/10.1007/BF02189894).
- Alonzo, M., Delgado, M., Cleetus, C., Kumar, S. A., Thakur, V., Chattopadhyay, M., & Joddar, B., 2020.** Methods for histological characterization of cryo-induced myocardial infarction in a rat model. *Acta histochemica*, **122(7)**, 151624.

[Doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151624](https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151624).

**Amamra, F., Sifi, K., Kaouachi, N., & Soltani, N. 2019.** Evaluation of the impact of pollution in the gulf of Annaba (Algeria) by measurement of environmental stress biomarkers in an edible mollusk bivalve *Donax trunculus*. *Fresenius Environ Bull*, **28(2)**, 908-915.

**Amankwaa, G., Yin, X., Zhang, L. et al., 2021.** Spatial distribution and eco-environmental risk assessment of heavy metals in surface sediments from a crater lake (Bosomtwe/Bosumtwi).

**Amiard, 2017.** Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, 2e édition. *Environ Sci Pollut Res* **28**, 19367–19380. [Doi.org/10.1007/s11356-020-12112-0](https://doi.org/10.1007/s11356-020-12112-0).

**Amira, A., Merad, I., Marisa, C., Almeida, R., Guimarães, L., Soltani, N., 2018.** Seasonal variation in biomarker responses of *Donax trunculus* from the Gulf of Annaba (Algeria) : Implication of metal accumulation in sediments, *Comptes Rendus Geoscience*, Volume **350**, Issue **4**, Pages 173-179. [Doi.org/10.1016/j.crte.2018.02.002](https://doi.org/10.1016/j.crte.2018.02.002).

**Ammamra, F., 2021.** Biosurveillance du golfe d'Annaba par utilisation d'une espèce bioindicatrice de la pollution *Donax trunculus* (Mollusque, Bivalve) : croissance, reproduction et biomarqueurs du stress environnemental (*Doctoral dissertation, Université Souk Ahras, Algérie*, pp.25).

**Ansell A.D. & Bodoy A., 1979.** Comparaison of events in the seasonal cycle for ; *Donax vitallus* and *D. trunculus*. Dans : *cyclic phenomena in marine plants and animal*, *Proc, Europ. Mal. Biol. Symp.* NAYLOR, E. & Hartno, R.G. (eds). Pergamon Press, Oxford et New York, pp. 191-198.

**Ansell A.D. & Lagardère F., 1980.** Observation on the biology of *Donax trunculus* and *Donax vittatus* at ile d'Oleron (French Atlantic Coast). *Mar. Biol.*, **57**: 287-300.

**Aouadene A., 2003.** Evaluation spatio-temporelle de quelques paramètres biométriques et biochimique chez *D. trunculus* (Mollusca, Bivalvia) dans un environnement pollué (golfe D'Annaba) (*Thèse de Magistère en Biologie Animale option Ecologie Animale Appliquée Université d'Annaba*, 88p).

**Arcos, F. G., Ibarra, A. M., Rodríguez-Jaramillo, M. D. C., García-Latorre, E. A., & Vazquez-Boucard, C. 2009.** Quantification of vitellin/vitellogenin-like proteins in the

oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) as a tool to predict the degree of gonad maturity. *Aquaculture research*, **40**(6), 644-655. [Doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02138.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02138.x).

## B

---

**Barbier, E.D., 2017.** Marine ecosystem services, *Current Biology*, Volume **27**, Issue **11**, Pages R507-R510. [Doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.020](https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.020).

**Barile, N.B., Scopa, M., Nerone, E., Mascilongo, G., Recchi, S., Cappabianca, S. and Antonetti, L., 2009.** Study of the efficacy of a closed cycle depuration system on bivalve mollusks *Veterinary Italiana*, **45**: 555-566.

**Baudrimont, M., Gonzalez, P. & Mesmer-Dudons, N., 2019.** Sensitivity to cadmium of the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* from the Dronne River (France) : experimental exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, **27** : 3715–3725. [Doi.org/10.1007/s11356-019-05025-0](https://doi.org/10.1007/s11356-019-05025-0).

**Bayed A., 1990.** Reproduction de *Donax trunculus* sur la côte Atlantique marocaine. *Cah. Bio. Mar.*, **31**: 159-169.

**Belabed, S., & Soltani, N., 2013.** Acute toxicity of cadmium on *Donax trunculus* : Acetylcholinesterase, glutathione S-transferase activities and pattern of recovery, *European Journal of Experimental Biology*, **3**(2) :54-61.

**Belabed, S., & Soltani, N., 2018.** Effects of cadmium concentrations on bioaccumulation and depuration in the marine bivalve *Donax trunculus*. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, **3**(1), 1-5.

**Beldi, H., 2007.** Etude de *Gambusia affinis* (Poisson, Téléostéen) et *Donax trunculus* (Mollusque, Pélécy-pode) : écologie, physiologie et impacts de quelques altéragènes. (*Doctoral dissertation, Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Université d'Annaba*).

**Beldi H., Gimbert F., Maas S., Scheifler R. & Soltani N., 2006.** Seasonal variations of Cd, Cu, Pb and Zn in the edible mollusk *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba, Algéria. *Afric. J. Agricul. Res.*, **1**(4) : 85-90.

- Bellon-Humbert C., 1962.** Les mollusques marins testacés du Maroc. II- Lamellibranches et Scaphopodes. *Travaux de l'institut scientifique Chérifien Série Zoologique Rabat.*, **28** : 184 p.
- Bélangier, D., 2009.** Utilisation de la faune macrobenthique comme bio-indicateur de la qualité de l'environnement marin côtier (*Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Québec*), 67p.
- Benchamma F., 1995.** Contribution à l'étude de la croissance et de la reproduction de *Donax trunculus* sur les côtes algéroises (*Mémoire d'ingénieur d'état en halieutique, ISMAL, Alger*.74p).
- Benelli C., Fabbri A., Grassi S, Lambardi M., Rugini E., 2001.** Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*Olea europaea L.*). *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, **76** (1): 112-119.
- Betim, F.L., Galvan, G.L., Cestari, M.M., Yamamoto, C.I., & Silva de Assis, H.C., 2016.** Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline. *Chemosphere*, **144** : 1467, 1474. [Doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.109](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.109).
- Binelli, A., Della Torre, C., Magni, S., & Parolini, M. 2015.** Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environmental pollution*, **196**, 386-403. [Doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.023](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.023).
- Blaise. C., Gagne, F., Pellerin, J., & Hansen, P., 1999.** Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* Vitellogenin expression in a scallop hemolymph (Saguenay Fjord, Canada), a potential biomarker for endocrine disruption. *Environ. Toxicol.* **14** : 455–465. [Doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7278\(199912\)14:5<455::AID-TOX2>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7278(199912)14:5<455::AID-TOX2>3.0.CO;2-8)
- Botelho, M.J., Vale, C., Joaquim, S., Costa, S.T., Soares, F., Roque, C., Matias, M., 2018.** Combined effect of temperature and nutritional regime on the elimination of the lipophilic toxin okadaic acid in the naturally contaminated wedge shell *Donax trunculus*, *Chemosphere*, Volume **190**, Pages. 166173. [Doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.100](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.100).
- Bougis, 1976 .**Océanographie biologique appliquée, l'exploitation de la vie marine (edition

Masson).pp.17-23.

- Boussoufa, D., Ghazali, N., Masmoudi, W., & El Cafsi, M., 2012.** Suivi saisonnier de l'activité acétylcholinestérase et de quelques métaux traces chez le bivalve *Donax trunculus* du golfe de tunis. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, **14**, 83-94.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72(1-2)**, 248-254.
- Briffa, J., Sinagra, E. & Blundell, R., 2020.** Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans, *Heliyon*, Volume **6**, Issue **9**, e04691. [Doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691).
- Bryhn, A., Kraufvelin, P., Bergström, U. et al., 2020.** A Model for Disentangling Dependencies and Impacts among Human Activities and Marine Ecosystem Services. *Environmental Management* **65**, 575–586. [Doi.org/10.1007/s00267-020-01260](https://doi.org/10.1007/s00267-020-01260).

## C

---

- Carreira, S., Costa, P.M., Martins, M. et al., 2013.** Ecotoxicological Heterogeneity in Transitional Coastal Habitats Assessed Through the Integration of Biomarkers and Sediment-Contamination Profiles : A Case Study Using a Commercial Clam. *Arch Environ Contam Toxicol*, **64**, 97–109. [Doi.org/10.1007/s00244-012-9812-1](https://doi.org/10.1007/s00244-012-9812-1).
- Carrier-Belleau, C., Drolet, D., McKindsey, C.W. et al., 2021.** Environmental stressors, complex interactions and marine benthic communities' responses. *Sci Rep* **11**, 4194. [Doi.org/10.1038/s41598-021-83533-1](https://doi.org/10.1038/s41598-021-83533-1).
- Chandurvelan R., Marsden I., Gaw S. & Glover C.N., 2017.** Acute and sub-chronic effects of sub-lethal cadmium exposure on energy metabolism in the freshwater shrimp *Paratya curvirostris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **135**: 60–67. [Doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.09.018](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.09.018).
- Charniaux-Cotton, H. and Payen, G., 1988.** Crustacean reproduction. Endocrinologie of selected invertebrate types. *Laufer, H. and Downer, R. G. H. New York, Liss, A.R*, **2**: 279-303.
- Chen, X., Yuan, L., Chen, X., Shi, Y., & Zhu, D., 2017.** A strategy for rapid identification of

healthy *Tegillarca granosa* from among those contaminated with unspecified heavy metals using infrared spectroscopy. *Analytical Methods*, **9(30)**,4447-4454. [Doi.org/10.1039/C7AY00912G](https://doi.org/10.1039/C7AY00912G).

**Cheng, C. H., Ma, H. L., Deng, Y. Q., Feng, J., Jie, Y. K., & Guo, Z. X., 2021.** Oxidative stress, cell cycle arrest, DNA damage and apoptosis in the mud crab (*Scylla paramamosain*) induced by cadmium exposure. *Chemosphere*, **263**, 128277.

**Cheng, C.H., Ma, H.L., Deng, Y.Q., Feng, J., Jie, Y.K., Guo, Z.X., 2021.** Oxidative stress, cell cycle arrest, DNA damage and apoptosis in the mud crab (*Scylla paramamosain*) induced by cadmium exposure, *Chemosphere*, Volume **263**, 128277.[Doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128277](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128277).

**Christian, M. Blaise, M.N. et François G., 2002.** Réponses de biomarqueurs de mollusques bivalves *Elliptio. Complanata* exposés à diverses sources de pollution produisant des effets hormonaux. Environnement Canada.

**Ciocan, C. M., Cubero-Leon, E., Puinean, A. M., Hill, E. M., Minier, C., Osada, M., ... & Rotchell, J. M. (2010).** Effects of estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*, at different stages of gametogenesis. *Environmental Pollution*, **158(9)**, 2977-2984.

**Coelho, J.P., Pimenta, J., Gomes, R., Barroso, C.M., Pereira, M.E., Pardal, M.A., Duarte, A.,** Can *Nassarius reticulatus* be used as a bioindicator for Hg contamination ? Results from a longitudinal study of the Portuguese coastline, *Marine Pollution Bulletin*, Volume **52**, Issue **6**, Pages 674-680. [Doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.10.020](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.10.020).

**Cosson, R. P., Thiébaud, É., Company, R., Castrec-Rouelle, M., Colaço, A., Martins, I., ... & Bebianno, M. J., 2008.** Spatial variation of metal bioaccumulation in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Marine environmental research*, **65(5)**, 405-415. [Doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128277](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128277).

## D

---

**Dagnelie, P., 1998.** Statistiques théoriques et appliquées. Brussels : De Boeck, 517 p.

- De la Huz, R., Lastra, M., López, J., 2002.** The influence of sediment grain size on burrowing, growth and metabolism of *Donax trunculus* L. (Bivalvia : Donacidae), *Journal of Sea Research*, Volume **47**, Issue **2**, Pages 85-95. [Doi.org/10.1016/S1385-1101\(02\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(02)00108-9).
- De Sousa, J. T., Matias, D., Joaquim, S., Ben-Hamadou, R., & Leitão, A., 2011.** Growth variation in bivalves : new insights into growth, physiology and somatic aneuploidy in the carpet shell *Ruditapes decussatus*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, **406(1-2)**, 46-53. [Doi.org/10.1016/j.jembe.2011.06.001](https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.06.001).
- Degiovanni, C. & Mouëza, M., 1972.** Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque, Lamellibranche), dans l'Algéroise : écologie en Baie de Bou-Ismaïl *Tethys.*, **4 (3)** :729-744.
- Delgado, M., Silva, L., Gómez, S., Masferrer, E., Cojan, M., Gaspar, M. B., 2017.** Population and production parameters of the wedge clam *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) in intertidal areas on the southwest Spanish coast : Considerations in relation to protected areas, *Fisheries Research*, Volume **193**, Pages 232-241. [Doi.org/10.1016/j.fishres.2017.04.012](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.04.012).
- Delmond, K.A., Vicari, T., Guiloski, I.C., Dagostim, A.C., Voigt, C.L., Silva de Assis, Depledge, M. H., & Billinghamurst, Z. (1999).** Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*, **39(1-12)**, 32-38.
- Descamps, 1996 in Fabre MC, Descamps, M., Baert, JL., 1990.** Identification and partial Characterization of vetellin and vitelogenin from *Scolopendra cingulate* Latreille (*Myriapoda Chilopoda*) In: *Abstract 8th Int Conger Myriap Innsbruck*, 15-21.
- Diop, C., Dewaelé, D., Diop, M., Touré, A., Cabral, M., Cazier, F., Fall, M., Diouf, A., Ouddane, B., 2014.** Assessment of contamination, distribution and chemical speciation of trace metals in water column in the Dakar coast and the Saint Louis estuary from Senegal, West Africa, *Marine Pollution Bulletin*, Volume **86**, Issues **1–2**, Pages 539-546. [Doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.051](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.051).
- Driessnack, M. K., Jamwal, A., & Niyogi, S., 2017.** Effects of chronic waterborne cadmium and zinc interactions on tissue-specific metal accumulation and reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **140**, 65-75. [Doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.023](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.023).

**Drif, F., Abdennour, C., Ciğerci, İ. H., Muddassir Ali, M., Mansouri, O., & Messarah, M., 2019.** Preliminary assessment of stress and genotoxicity biomarkers in bivalve molluscs from the Gulf of Annaba, Algeria. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **102**(4), 555-559.

**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. [Doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.112](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.112).

**H.C., Ramsdorf, W.A., & Cestari, M.M., 2019.** Antioxidant imbalance and genotoxicity detected in fish induced by titanium dioxide nanoparticles (NpTiO<sub>2</sub>) and inorganic lead (PbII). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **67** : 42-52. [Doi.org/10.1016/j.etap.2019.01.009](https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.01.009).

## E

---

**Edouard, H., et Christian, C., 1992.** Direction de l'environnement et de l'aménagement littoral.

**Enriquez-Diaz M., 2004.** Variabilité et bioénergétique de la reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. IFREMER. Université de Bretagne Occidentale, Plouzané, 223 p.

**Environnement canada, 2012.** Guide technique pour l'étude de suivi des effets sur l'environnement des mines de métaux. Environnement Canada.

## F

---

**Fabre MC, Descamps M, Baert JL., 1990 .**Identification and partial Characterization of vitellin and vitelogenin from Scolopendra cingulate LATREILLE (Myriapoda Chilopoda ) In: Abstract 8th Int Conger Myriap Innsbruck 15-21.

**Fabrello, J., Grapputo, A., Munari, M. et al., 2020.** Molecular and biochemical responses of vitellogenin in the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to the glyphosate-based herbicide Roundup® Power 2.0. *Environ Sci Pollut Res* **27**, 26543–26553. [Doi.org/10.1007/s11356-020-08985-w](https://doi.org/10.1007/s11356-020-08985-w).

- Fan, L., & Tao, Z., 2020.** Effets de la pollution environnementale objective et subjective sur le bien-être en chine urbaine : une approche par modèle d'équation structurelle. *Science sociale et médecine*, 2491(12859).
- FAO, 2010.** Statistiques FAO. <http://faostat.fao.org/>.
- Fassett, D. W., 1975.** Cadmium biological effects and occurrence in the environment. *Envir. and ind. Toxicol., Maine*. 425-435 pp.
- Fernández-González, L.E., Sánchez-Marín, P., Gestal, C., Beiras, R., Diz, A.P., 2021.** vitellogenin gene expression in marine mussels exposed to ethinylestradiol : No induction at the transcriptional level, *Marine Environmental Research*, Volume 168. [Doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105315](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105315).
- Fernández-Pérez, J., Froufe, E., Nantón, A., Gaspar, M.B., Méndez, J., 2017.** Genetic diversity and population genetic analysis of *Donax vittatus* (Mollusca : Bivalvia) and phylogeny of the genus with mitochondrial and nuclear markers, *Estuarine, Coastal and Shelf science*, Volume 197, Pages 126-135. [Doi.org/10.1016/j.ecss.2017.08.032](https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.08.032).
- Figueira, R., Tavares, P.C., Palma, L., Beja, P., Sérgio, C., 2009.** Application of indicator kriging to the complementary use of bioindicators at three trophic levels, *Environmental pollution*, Volume 157, Issue 10, Pages. 2689-2696. [Doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.001](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.001).
- Fingerman, M., Jackson, N. C. & Nagabhusanam, R., 1998.** "Hormonally-regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution." *Comparative biochemistry and Physiology C-Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 120(3) : 343-350.
- Ferrat, L., 2010.** Bioindicateurs des variations environnementales chez les végétaux. *Ecologie, Environnement*. Université Pascal Paoli, fftel-00593175.pp.69.
- Fischer, W., Bauchot, M. L. & Schneider M., 1987.** Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche, Méditerranéen et en mer noire. Zone de pêche 37. Volume 1 : Végétaux et invertébrés. FAO/CEE.76 p.
- Fränzle, M., Herde, C., Teige, T., Ratschan, S., & Schubert, T. 2006.** Efficient solving of large non-linear arithmetic constraint systems with complex boolean structure. *Journal on satisfiability, Boolean Modeling and Computation*, 1(3-4), 209-236.

G

---

- Gagnaire, 2005.** Étude des effets de polluants sur les paramètres hématologiques de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses.
- Gagné, F., & Blaise, C., 2003.** Effects of municipal effluents on serotonin and dopamine levels in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, **136(2)**, 117-125.
- Gagné, F., Blaise, C., Lachance, B., Sunahara, G.I. & Sabik, H., 2001c.** Evidence of coprostanolestrogenicity to the fresh water mussel *Elliptio complanata*. *Environmental Pollution*, **115(1)**: 97-106.
- Gagné, F., Blaise, C., Salazar, M., Salazar, S. & Hansen, P.D., 2001a.** Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to fresh water mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **128C (2)**: 213-225.
- Gagné, F., Marcogliese, D.J., Blaise, C. & Gendron, A.D., 2001b.** Occurrence of Compounds estrogenic to fresh water mussels in surface waters in an urban area. *Environmental Toxicology*, **16(3)** : 260-268.
- Gallo, A., & Tosti, E., 2020.** Reproductive Processes of Marine Animals as Biomarker for Environmental Stress Impact. *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, 3283-3298. [Doi.org/10.1002/9781119143802.ch146](https://doi.org/10.1002/9781119143802.ch146).
- Gaspar, M. B., Ferreira, R., & Monteiro, C. C., 1999.** Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Mollusca : Bivalvia) off Faro, southern Portugal. *Fisheries Research*, **41(3)**, 309-316.
- Gaspar, M. B., Santos, M. N., Vasconcelos, P. and Monteiro, C. C., Shell., 2002.** Morphometric relationships of the most common bivalve species (Mollusca: Bivalvia) of the Algarve coast (southern Portugal), *Hydrobiologia*, **477** , 73–80.
- Gaspar, M.B., Santos, M.N., Vasconcelos, P. & Monteiro, C.C., 2002.** Shell morphometric relationships of the most common bivalve species (Mollusca : Bivalvia) of the Algarve coast (southern Portugal), *Hydrobiologia*, **477**, 73-80.

- Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Blaise, C. & Gagné, F., 2002.** Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada) : a consequence of endocrine disruptors ? *Comparative Biochemistry and Physiology*, **131C(4)** : 457-467.
- Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., & Catalano, A. (2020).** The effects of cadmium toxicity. *International journal of environmental research and public health*, **17(11)**, 3782. [Doi: 10.3390/ijerph17113782](https://doi.org/10.3390/ijerph17113782).
- Gnatyshyna, L., Khoma, V., Horyn, O., Ozoliņš, D., Skuja, A., Kokorite, I., Rodinov, V., Martyniuk, V., Sprin ģe, G., Stoliar ,O., 2020.** Multimarker study of *Dreissena polymorpha* populations from hydropower plant reservoir and natural lake in Latvia. *Turk J Fish Aquat Sci* **20**:409–420.
- Gnatyshyna, L., Khoma, V., Mishchuk, O., Martinyuk, V., Sprin ģe, G., Stoliar, O., 2020.** Multi-marker study of the responses of the *Unio tumidus* from the areas of small and micro hydropower plants at the Dniester River Basin, Ukraine. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **27**, 11038–11049.[Doi.org/10.1007/s11356-020-07698-4](https://doi.org/10.1007/s11356-020-07698-4).
- Gofas, S., 2021.***Donax trunculus* Linnaeus, 1758. Accessed through : World Register of marine species at <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=139602>.
- González, L. E. F, 2021.** Usefulness of vitellogenin as a potential biomarker for endocrine disruption in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* revisited from direct analysis at transcriptomic and proteomic level (*Doctoral dissertation, Universidade de Vigo*).
- Gotelli, N. J., Ellison, A. M., & Ballif, B. A., 2012.** Environmental proteomics, biodiversity statistics and food-web structure. *Trends in ecology & evolution*, **27(8)**, 436-442. [Doi.org/10.1016/j.tree.2012.03.001](https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.03.001).
- Gouillou J. & Bayed A., 1991.** Contraintes du milieu sur les populations de *Donax trunculus* L. et *Donax venustus* Poli du littoral atlantique marocain. *Océanologie Acta.*, **14(3)** : 291-298.
- Gouillou J. & le Moal Y., 1980.** Aspects de la dynamique des populations de *Donax vittalus* et *Donax trunculus* en baie de douarnenez. *Ann. Inst. Océanogr.*, Paris, **56(1)** : 55-64.
- Grasse, P.P., Poisson, R.A., et Tuzet, O., 1970.** Zoologie I, invertébrés. Masson. Paris. 935p.
- Gu, X., Xu, L., Wang, Z., Ming, X., Dang, P., Ouyang, W., ... & Wang, B., 2021.** Assessment of cadmium pollution and subsequent ecological and health risks in Jiaozhou Bay of the

Yellow Sea. *Science of The Total Environment*, **774**,145016. Doi : [10.1016/j.scitotenv.2021.145016](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145016).

**Guendouzi, Y., Soualili, D. L., Fowler, S. W., & Boulahdid, M. 2020.** Environmental and human health risk assessment of trace metals in the mussel ecosystem from the Southwestern Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*, **151**,110820. [Doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110820](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110820).

**Guo, H., Chen, Li., Li, Gl. et al., 2019.** Accumulation and Depuration of Nonylphenol and Its Effect on the Expressions of Vitellogenin and Vitellogenin Receptor in Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Bull Environ Contam Toxicol* 103, 729–733 (2019). [Doi.org/10.1007/s00128-019-02714-x](https://doi.org/10.1007/s00128-019-02714-x).

**Gupta, N., Gedam, V.V., Moghe, C., Labhasetwar, P., 2019.** Comparative assessment of batch and column leaching studies for heavy metals release from Coal Fly Ash Bricks and Clay Bricks, *Environmental Technology & Innovation*, Volume **16**,100461. [Doi.org/10.1016/j.eti.2019.100461](https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100461).

## H

---

**Hafsaoui, I., 2017.** Structure et dynamique de la population de *Donax trunculus* (mollusque, bivalve), espèce exploitée dans le golfe d'Annaba. (*Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat, Université Badji-Mokhtar, Algérie*).

**Hamdani, A., 2013.** La reproduction chez un mollusque bivalve *Donax trunculus* dans le golfe d'Annaba. Rapport entre les aspects cytologique et biochimique et la pollution (*Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat en Biologie Animale, option : Reproduction et Développement, Université d'Annaba, pp : 333*).

**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. *Advances in Environmental Biology*, **8(13)**, 740-749.

**Hamdani, A., Soltani, N. & Zaidi, N., 2020.** Growth and reproduction of *Donax trunculus* from the Gulf of Annaba (Northeast Algeria) in relation to environmental conditions. *Environ Sci Pollut Res* 27, 41656–41667. [Doi.org/10.1007/s11356-020-10103-9](https://doi.org/10.1007/s11356-020-10103-9).

**Hamza-Chaffai A., 1993.** Bioaccumulation métallique et métallothionéines chez des poissons de la côte de Sfax (Golfe de Gabès). (*Doctorat de spécialité, Université de Sfax, pp 168*).

**Heiba, F., Nassef, M., Mona, M., & El-rashedy, E., 2021.** The Depuration Effect on Heavy Metals and Total Hydrocarbons Contamination Levels in *Donax trunculus* and Its Influence on The Expression of Oxidative Stress-Related Genes. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, B. Zoology, 13(1), 77-89.*  
[Doi.10.21608/EAJBSZ.2021.153758.](https://doi.org/10.21608/EAJBSZ.2021.153758)

## I

---

**Ibrahim, R.M., Mohammad, S.H., Mohamed, S.Z., Morsy, Z. S., 2015.** Aspects on the reproductive cycle of *Donax semistriatus* and *Donax trunculus* (Mollusca : Bivalvia) in Idku, Egypt, *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* **44(3)** : pp. 287-296.

**IPCS, 2004.** International Programme on Chemical Safety & Organisation for Economic Co-operation and Development. IPCS risk assessment terminology. World Health Organization. [https://apps.who.int/iris/handle/10665/42908.](https://apps.who.int/iris/handle/10665/42908)

## J

---

**Jakimska, A., Konieczka, P., Skóra, K., & Namieśnik, J., 2011.** Bioaccumulation of Metals in Tissues of Marine Animals, Part I: the Role and Impact of Heavy Metals on Organisms. *Polish Journal of Environmental Studies, 20(5)* :1117–1125.

**Järup, L., 2003.** Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin, 68*: 167–182.  
[Doi.org/10.1093/bmb/ldg032.](https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032)

**Jurgen, F., Valerio, M., Roberto, R., Paolo, S. G., & Marta, M. (2011).** 2-DE proteomic analysis of HSP70 in mollusc *Chamelea gallina*. *Fish & shellfish immunology, 30(2)*, 739-743.

**JUSTE, C., 1995.** Les micropolluants métalliques dans les boues résiduares des stations d'épuration urbaines, Convention ADEME-INRA, ADEME éd., 209p.

## K

---

- Kaufmann, M.E., 1998.** Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In : Woodford N., Johnson A.P. (eds) Molecular Bacteriology. *Methods in Molecular Medicine™*, vol 15. Humana Press. [Doi.org/10.1385/0-89603-498-4:33](https://doi.org/10.1385/0-89603-498-4:33).
- Khammar, H., 2007.** Caractères chimiques des effluents urbains introduits au littoral D'Annaba (*Doctoral dissertation, Université de Annaba-Badji Mokhtar*).
- Khélifi-Touhami, M., Ounissi, M., Saker, I., Haridi, A., Djorfi, S. & Abdenour, C., 2006.** The hydrology of the Mafragu estuary (Algeria) : Transport of inorganic nitrogen and phosphorus to the adjacent coast. *Journal of food, agriculture and environment*, **4**: 340-346p.
- Khemis, I.B., Besbes Aridh, N., Hamza, N. et al., 2017.** Heavy metals and minerals contents in pikeperch (*Sander lucioperca*), carp (*Cyprinus carpio*) and flathead grey mullet (*Mugil cephalus*) from Sidi Salem Reservoir (Tunisia) : health risk assessment related to fish consumption. *Environ Sci Pollut Res* **24**, 19494–19507. [Doi.org/10.1007/s11356-017-9586-0](https://doi.org/10.1007/s11356-017-9586-0).
- Klingelfus, T., Lirola, J.R., Oya Silva, L.F., Disner, G.R., Vicentini, M., Nadaline, M.J.B., Robles, J.C.Z., Trein, L.M., Voigt, C.L., Silva de Assis, H.C., Leme, D.M., & Cestari, M.M., 2017.** Acute and long-term effects of trophic exposure to silver nanospheres in the central nervous system of a Neotropical fish *Hoplias intermedius*. *NeuroToxicology*, **63** : 146-154. [Doi.10.1016/j.neuro.2017.10.003](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.10.003).
- Kristan, U., Kanduč, T., Osterc, A., Šlejkovec, Z., Ramšak, A., & Stibilj, V., 2014.** Assessment of pollution level using *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator species : The case of the Gulf of Trieste. *Marine pollution bulletin*, **89(1-2)**, 455-463. [Doi.10.1016/j.marpolbul.2014.09.046](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.09.046).
- Kumar, S., Prasad, S., Kumar Yadav, K., Shrivastava, M., Gupta, N. et al., 2019.** Hazardous heavy metals contamination of vegetables and food chain : Role of sustainable remediation approaches - A review, *Environmental Research*, Volume **179**, Part A. [Doi : 10.1016/j.envres.2019.108792](https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108792).

## L

---

- La Valle, P., 2005.** *Donax trunculus*. Quale indicatore biologico degli equilibri costieri e del bilancio sedimentario (*Rapport de thèse de Doctorat : Université de Rome « La Sapienza », option : écologie, 233p*).
- La Valle, P., Nicoletti, L., Finoia, M., Ardizzone, D.G., 2011.** *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) as a potential biological indicator of grain-size variations in beach sediment, *Ecological Indicators*, Volume **11**, Issue **5**, Pages 1426-1436. [Doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.03.005](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.03.005).
- Laemmli, V. K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lambreas, C.I., Galante, F., & Mena, I., 1991.** Ovarian condition as an indicator of the phenology of *Bubas bubas* (Coleoptera : Scarabeidae). *Ann. Entomol.Sco.Am.*, **84** (2), 190-194.
- Lamine, I., Ait Alla, A., Elazzaoui, A., Meryam, N., Moukrim, A.,** Assessment of reproductive cycle, parasitism and biological indices of the wedge clam *Donax trunculus* along the Taghazout coastline (on the Moroccan Atlantic Coast), *Regional Studies in Marine Science*, Volume **47**, 101971. [Doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101971](https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101971).
- Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, J. C., & Le Pennec, M., 2000.** Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, **190**(1-2), 183-199.
- Larrose, A., Coynel, A., Schäfer, J., Blanc, G., Massé, L., Maneux, E., 2010.** Assessing the current state of the Gironde Estuary by mapping priority contaminant distribution and risk potential in surface sediment, *Applied Geochemistry*, Volume **25**, Issue **12**, 1912-1923. [DOI.org/10.1016/j.apgeochem.2010.10.007](https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2010.10.007).
- Lee, K.-W., D.-S. Hwang, J.-S. Rhee, et al., 2008.** Molecular cloning, phylogenetic analysis and developmental expression of a vitellogenin (Vg) gene from the intertidal copepod, *Tigriopus japonicus*. *Comp.Biochem.Physiol.***150B** :395–402.  
[Doi.10.1016/j.cbpb.2008.04.009](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.04.009).
- Lemoine, S., Bigot, Y., Sellos, D., Cosson, R. P., & Laulier, 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. *Marine Biotechnology*, **2**(2), 195-203.

**Li, Q., Osada, M., Suzuki, T. & Mori, M., 1998.** Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 $\beta$  on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Invertebrate Reproduction & Development*, **33:1**, 87-93. [Doi : 10.1080/07924259.1998.9652345](https://doi.org/10.1080/07924259.1998.9652345).

**Li, Q., Osada, M., Suzuki, T., & Mori, K., 1998.** Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17b on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebr. Reprod. Dev.* **33**: 87–93.

**Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E., 2019.** Pollution Biomarkers in Environmental and *Human Biomonitoring*. Volume **9**,1-9.[Doi.10.2174/1875318301909010001](https://doi.org/10.2174/1875318301909010001).

**Lloyd-Smith, P., Schram, C., Adamowicz, W. et al., 2018.** Endogeneity of Risk Perceptions in Averting Behavior Models. *Environ Resource Econ* **69**, 217–246.[Doi.org/10.1007/s10640-016-0075-6](https://doi.org/10.1007/s10640-016-0075-6).

**Lucas, A., 1965.** Recherche sur la sexualité des Mollusques Bivalves. Thèse, Rennes, 135 p. *In* : 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).

## M

---

**Madelyn, N., Moawad, A., El-Sayed, A.M., & El-Naggar, N.E., 2020.** Biosorption of cadmium and nickel ions using marine macrophyte, *Cymodocea nodosa*, *Chemistry and Ecology*. [Doi.10.1080/02757540.2020.1752199](https://doi.org/10.1080/02757540.2020.1752199).

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

**Manca Zeichen M., Agnesi, S., Mariani, A., Maccaroni, A., & Ardizzone, G.D., 2001.** Biologie and population dynamics of *Donax trunculus* L Bivalvia : Donacidae in the south Adriatic coast (Italy) *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **56**: 345-358.

- Marie, A., Lejeusne, C., Karapatsiou, E. et al., 2016.** Implications for management and conservation of the population genetic structure of the wedge clam *Donax trunculus* across two biogeographic boundaries. *Sci Rep* **6**, 39152. [Doi.org/10.1038/srep39152](https://doi.org/10.1038/srep39152).
- Marobin, D., Prat, M., & Jouvenel, J. Y., 2007.** Étude globale sur la Telline *Donax trunculus* (Linnée, 1767) en Camargue. Parc Naturel Régional de Camargue.
- Martel-Pelletier J., 2005.** New insights into the major pathophysiological processes responsible for the development of osteoarthritis. *Pubmed - Indexed For Medline*, **34**: 6-8.
- Martin, A.G., Littaye-Mariette, A., Langlade, A. et Allenou, J.P., 1997.** Cycle de reproduction naturelle de l'huître plate *Ostrea edulis*. In : La reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France, Nantes (France), 14-15 novembre 1995, IFREMER, rapport interne : 21 – 34.
- Martínez-Morcillo, S., Rodríguez-Gil, J.L., Fernández-Rubio, J., Rodríguez-Mozaz, S., Míguez-Santiyán, M.P., Valdes, M.E., Barceló, D., Valcárcel, Y., 2020.** Presence of pharmaceutical compounds, levels of biochemical biomarkers in seafood tissues and risk assessment for human health : Results from a case study in North-Western Spain, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Volume **223**, Issue **1**, Pages 10-21. [Doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.10.011](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.10.011).
- Martin-Garin, A., & Simon, O., 2004.** Fiche radionucléide, Cadmium 109 et son environnement. Direction de l'environnement et de l'intervention – Service d'étude du comportement des radionucléides dans les écosystèmes, IRSN, 14p.
- Martoja, R., & Martoja-Pierson, M., 1967.** Initiation aux techniques de l'histologie animale, Paris, Masson, P345.
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M. G., Ricciardi, F., & Blaise, C., 2008.** Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates : a review. *Environment international*, **34**(4), 531-545.
- Mejdoub, Z., Fahde, A., Loutfi, M., & Kabine, M., 2017.** Oxydative stress responses of the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to emissary's pollution in coastal areas of

Casablanca *Ocean & Coastal Management*, 136, 95-103. [Doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2016.11.018](https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2016.11.018).

**Meng, J., Wang, W. X., Li, L., & Zhang, G. 2017.** Respiration disruption and detoxification at the protein expression levels in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) under zinc exposure. *Aquatic Toxicology*, **191**, 34-41. [Doi : 10.1016/j.aquatox.2017.07.011](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.07.011).

**Mensi, G.S., Moukha, S., Maaroufi, K., Creppy, E.E., 2008.** Combined cytotoxicity and genotoxicity of a marine toxin and seafood contaminant metal ions (chromium and cadmium), *Environ. Toxicol.* volume **23**, issue **1**, P1. [Doi.10.1002/tox.20304](https://doi.org/10.1002/tox.20304).

**Merad, I. and N. Soltani., 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*, 04 - 06 November 2014, Izmir– TURKEY (pp. 260-267), Turkey : ECPA.

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

**Merad, I., Bellenger, S., Hichami, A., Khan, N. A., & Soltani, N., 2018.** Effect of cadmium exposure on essential omega-3 fatty acids in the edible bivalve *Donax trunculus*. *Environmental Science and Pollution Research*, **25(19)**, 18242-18250.

**Merad., I., 2017.** Toxicité aigüe du cadmium chez *Donax trunculus* L. variation de la composition biochimique des gonades en fonction du sexe et de l'activité sexuelle au cours de l'exposition aigüe et de la dépuration (*Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat en Biologie Animale, Université d'Annaba, pp : 77*).

**Michael J Hemmer, Christopher J Bowman, Becky L Hemmer, Stephanie D Friedman, Dragoslav Marcovich, Kevin J Kroll, Nancy D Denslow., 2002.** Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows, (*Cyprinodon variegatus*) after cessation of exposure to 17 $\beta$ -estradiol and p-nonylphenol, *Aquatic Toxicology*, Volume **58**, Issues **1–2**, Pages 99-112. [Doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00238-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00238-7).

**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**: 2009–2016. [Doi.org/10.1007/s10646-015-1536-3](https://doi.org/10.1007/s10646-015-1536-3).

- Moffatt, L.T., May, C.L., Studer, K.E., Reckhow, D.E., Arcaro, K.F., 2010.** Effects of exposure water volume, depuration time, and feeding status on vitellogenin mRNA induction in male medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17  $\beta$ -estradiol, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume **73**, Issue **8**, Pages 1835-1841. [Doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.024](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.024).
- Moncaleano-Niño, A. M., Barrios-Latorre, S. A., Poloche-Hernández, J. F., Becquet, V., Huet, V., Villamil, L., ... & Luna-Acosta, A., 2017.** Alterations of tissue metallothionein and vitellogenin concentrations in tropical cup oysters (*Saccostrea sp.*) following short-term (96 h) exposure to cadmium. *Aquatic Toxicology*, **185**, 160-170.
- Morcillo, Y., & Porte, C., 1999.** Evidence of endocrine disruption in the imposex-affected gastropod *Bolinus brandaris*. *Environmental Research*, **81**(4), 349-354.
- Mori, K., Tamate, H. & Ima, T., 1965a.** Presence of 3 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase activity in the tissues of maturing oysters. *Tahoku Journal of Agricultural Research*, **15** (3) :269-277.
- Mori, K., Tamate, H. & Ima, T., 1965b.** Presence of 17 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase activity in the tissues of maturing oysters. *Tahoku Journal of Agricultural Research*, **16** (3) :147-153.
- Mouabad, A., 1991.** Toxicité comportementale et physiologique (filtration, respiration) des métaux lourds (Cu, Zn, Hg, Cd et Pb) chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha pallas* : proposition d'un protocole d'essai pour l'évaluation de la toxicité par la réponse comportementale de *Dreissena* (*Doctoral dissertation, Université Paul Verlaine-Metz*).
- 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.
- 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, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Volume **21**, Issue **3**, Pages. 211-221. [Doi.org/10.1016/0022-0981\(76\)90116-7](https://doi.org/10.1016/0022-0981(76)90116-7).

- 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.
- Mouëza, M., 1971.** Contribution à l'étude de l'écologie et de biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque Lamellibranche) (*Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques mention Océanographie.130 p*).
- Moullac, G., Queau, I., Le souchu, P., Pouvreau, S., Moal, J., Le coz, J.R & Samain, J.F. 2009.** Metabolic adjustments in the oyster according to oxygen level and temperature. *Marine Biology Research* **3**, pp. 357-366.
- 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, *General and Comparative Endocrinology*, Volume **157**, Issue **2**, Pages 133-141. [Doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.04.010](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.04.010).
- Myrand, B., Proulx, D., 2007.** Indicateurs de stress Tremblay R Atelier de travail chez les de travail chez les Mollusques MAPA-DIT, Gaspé (En ligne). 20- 65p.

## N

---

- 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*, **169**, 493-502.
- Neuberger-Cywik L., Achituve Y. & Mizrahi L., 1990.** The ecology of *Donax trunculus* Linnaeus and *Donax semistriatus* Poli form the Mediterranean coast of Israel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **134**:203-220.

## O

---

- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., 2003.** Chapter 17 Molluscs as bioindicators, Editor(s) : B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, Trace Metals and other Contaminants

in the Environment, *Elsevier*, Volume 6, Pages 577-635. [Doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80147-9](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80147-9).

**Ohira, T., Okumura, T., Suzuki, M., Yajima, Y., Tsutsui, N., Wilder, M. N. & Nagasawa, H., 2006.** "Production and characterization of recombinant vitellogenesis-inhibiting hormone from the American lobster *Homarus americanus*". *Peptides*, **27(6)** : 1251-1258.

**Ortiz-Zarragoitia, M. & Cajaraville, M.P., 2006.** Biomarkers of Exposure and Reproduction-Related Effects in Mussels Exposed to Endocrine Disruptors. *Arch Environ Contam Toxicol*, **50**, 361–369. [Doi.org/10.1007/s00244-005-1082-8](https://doi.org/10.1007/s00244-005-1082-8).

**Otero, J.F., 1982.** Aportación al estudio de la biología del bivalvo *Donax trunculus* L. en la ría de El Barquero. Tesina Licenciado de CIENCIAS Biológicas, Universidad de Santiago de Compostela.

## P

---

**Parra, S., Varandas, S., Santos, D., Félix, L., Fernandes, L., Cabecinha, E., ... & Monteiro, S. M., 2021.** Multi-biomarker responses of Asian clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia, corbiculidea) to cadmium and microplastics pollutants. *Water*, **13(4)**, 394. [Doi.org/10.3390/w13040394](https://doi.org/10.3390/w13040394).

**Paschoalini, A. L., Savassi, L. A., Arantes, F. P., Rizzo, E., & Bazzoli, N., 2019.** Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river. *Ecotoxicology and environmental safety*, **169**, 539-550. [Doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.047](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.047).

**Patiño, D.M., Otero, J., Louzán, A. et al., 2021.** Wedge clam (*Donax trunculus* Linnaeus, 1758) reproduction : reproductive traits and environmental influence in the NW Iberian coast and contrast across Atlantic and Mediterranean waters. *Hydrobiologia*, **848**, 1347–1366. [Doi.org/10.1007/s10750-021-04532-x](https://doi.org/10.1007/s10750-021-04532-x).

**Pattanayak, S., Das, S. & Navyasri, K., 2020.** Bioindicator Emerged as a Potential Environmental Marker. *IJAEB*, **13(3)** : 339-344. [Doi.10.30954/0974-1712.03.2020.9](https://doi.org/10.30954/0974-1712.03.2020.9).

**Paul-Pont, I., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Nili, H., De Montaudouin, X., 2010.** Short-

term metallothionein inductions in the edible cockle *Cerastoderma edule* after cadmium or mercury exposure : Discrepancy between mRNA and protein responses, *Aquatic Toxicology*, **97**, 260–267. [Doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.007](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.007).

**Pedrosa, J., Gravato, C., Campos, D., Cardoso, P., Figueira, E., Nowak, C., ... & Pestana, J. L., 2017.** Investigating heritability of cadmium tolerance in *Chironomus riparius* natural populations : a physiological approach. *Chemosphere*, **170**, 83-94. [Doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.008](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.008).

**Pedrosa, J., Cocchiararo, B., Verdelhos, T., Soares, A., Pestana, J.L.T., Nowak, C., 2017.** Population genetic structure and hybridization patterns in the cryptic sister species *Chironomus riparius* and *Chironomus piger* across differentially polluted freshwater systems, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 141, Pages 280-289. [Doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.004](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.004).

**Pinello, D., Dimech, M., Megahed, A. & El Gazzar, H., 2020.** Assessment of the commercial chain of bivalves in egypt. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular No.1196*. Rome, FAO.

**Piscopo, M., 2019.** Seasonal dependence of cadmium molecular effects on *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) protamine-like protein properties. *Molecular Reproduction and Development*, 86(10), 1418-1429. [Doi.org/10.1002/mrd.23240](https://doi.org/10.1002/mrd.23240).

**Porte, C., Janer, G., Lorusso, L. C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M. P., Fossi, M. C., & Canesi, L., 2006.** Endocrine disruptors in marine organisms : approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **143(3)**, 303-315.

**Poutiers, J.M., 1978.** Contribution n°15-Introduction à l'étude faunistique des bivalves du littoral français : les espèces marines du golfe d'Aigues-Mortes Deuxième partie. CERBAP.

**Prieur, D., 1971.** Recherches bibliographiques sur le développement embryonnaire des mollusques bivalves (*DEA d'Océanographie Biologique. Paris*).

**Puljas, S., & Lukić, J. 2021.** Oocyte analysis of species *Arca noae* Linnaeus, 1758 (Mollusca : Bivalvia) from Adriatic Sea. *The European Zoological Journal*, **88(1)**, 925-932. [Doi.org/10.1080/24750263.2021.1961028](https://doi.org/10.1080/24750263.2021.1961028).

Q

---

- Quinitio, E.T. & Millamena O.M., 1992.** Ovarian changes and female-specific protein levels during sexual maturation of the white shrimp *Penaeus indicus*. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, **44**: 7–12.
- Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., & Mothersill, C., 2004.** The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology*, **66(3)**, 279-292.

R

---

- Rabei, A., Hichami, A., Beldi, H., Bellenger, S., Khan, N. A., & Soltani, N., 2018.** Fatty acid composition, enzyme activities and metallothioneins in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from polluted and reference sites in the Gulf of Annaba (Algeria) : Pattern of recovery during transplantation. *Environmental Pollution*, **237**, 900-907.
- Rabei, A., 2020.** Approche multi-marqueurs de la biosurveillance de la Baie d'Annaba avec utilisation de *Donax trunculus* (Mollusque, Bivalve) comme espèce sentinelle (*Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar, Algérie*).
- Ramon M., Abello P. & Richardson C. A., 1995.** Population structure and growth of *Donax trunculus* (Bivalvia : Donacidae) in the western Mediterranean. *Marine Biology.*, **121**: 665-671.
- Ramzan, M., Iqbal, H. A., Usman, M., & Ozturk, I., 2022.** Environmental pollution and agricultural productivity in Pakistan : new insights from ARDL and wavelet coherence approaches. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-20.  
[DOI : 10.1007/s11356-021-17850-3](https://doi.org/10.1007/s11356-021-17850-3).
- Rao, J. V., Kavitha, P., Srikanth, K., Usman, P. K., & Rao, T. G., 2007.** Environmental contamination using accumulation of metals in marine sponge, *Sigmadocia fibulata* inhabiting the coastal waters of Gulf of Mannar, India. *Toxicological & Environmental Chemistry*, **89(3)**, 487-498. [Doi : 10.1080/02772240601150588](https://doi.org/10.1080/02772240601150588).
- Riva, C., Binelli, A., Rusconi, F., Colombo, G., Pedriali, A., Zippel, R., & Provini, A.**

(2011). A proteomic study using zebra mussels (*D. polymorpha*) exposed to benzo ( $\alpha$ ) pyrene : the role of gender and exposure concentrations. *Aquatic toxicology*, **104**(1-2), 14-22. [Doi : 10.1016/j.aquatox.2011.03.008](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.03.008).

**Rocha, T. L., Sabóia-Morais, S. M. T., & Bebianno, M. J., 2016.** Histopathological assessment and inflammatory response in the digestive gland of marine mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium-based quantum dots. *Aquatic toxicology*, **177**, 306-315. [Doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.003](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.003).

**Rodríguez-Ortega, M. J., Grøsvik, B. E., Rodríguez-Ariza, A., Goksøyr, A., & López-Barea, J. 2003.** Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. *PROTEOMICS : International Edition*, **3**(8), 1535-1543.

**Roméo, M., Giambérini, L., Amiard-Triquet, C., & Amiard, J. C., 2013.** History of biomarkers. Ecological Biomarkers, Indicators of Ecotoxicological Effects. *CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton London, New York*.

**Royer, J., Seguineau, C., Park, KI., Pouvreau, S., Choi, K.S., Costil, K., 2008.** Gametogenetic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy. *Aquaculture.*, **277**: 313-320.

**Ruiz-Azcona, P., 2020.** Guía de Cultivo en Criadero de Longueirón y Coquina - Huelva. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, *Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera*. 1-18 p. Formato digital (e-book) - (Cultivos Marinos y Recursos Pesqueros).

## S

---

**Saher, N.U., & Siddiqui, A.S., 2016.** Comparison of heavy metal contamination during the last decade along the coastal sediment of Pakistan : Multiple pollution indices approach, *Marine Pollution Bulletin*, Volume, **105**, Issue **1**, Page, 403-410. [Doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.012](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.012).

**Saker, I.E., 2007.** Pollutions chimiques par les effluents industriels directs introduits au littoral d'Annaba. (*Mémoire de magister Université. Annaba. 34p*).

- Salgado, L.D., Meister, L., Marques, A.E., Kramer, R.D., Garrido de Oliveira, F., Moretto, S.L. et al., 2019.** Integrated assessment of sediment contaminant levels and biological responses in sentinel fish species *Atherinella brasiliensis* from a sub-tropical estuary in south Atlantic. *Chemosphere*, **219** : 15 -27. [Doi : 10.1016/j.chemosphere.2018.11.204](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.204).
- Sanghvi, T., Ni, N., Mayersohn, M., & Yalkowsky, S., 2003.** Predicting Passive Intestinal Absorption Using A Single Parameter. *QSAR & Combinatorial Science*, **22** (2) :247–257.[Doi:10.1002/qsar.200390019](https://doi.org/10.1002/qsar.200390019).
- Sanghvi, T., Ni, N., Mayersohn, M., & Yalkowsky, S., 2003.** Predicting Passive Intestinal Absorption Using A Single Parameter. *QSAR & Combinatorial Science*, **22** (2) :247–257.[Doi:10.1002/qsar.200390019](https://doi.org/10.1002/qsar.200390019).
- Sanita di Toppi, L., & Gabbrielli, R., 1999.** Response to Cadmium in Higher Plants. *Environmental and Experimental Botany*, **41**, 105-130.
- Santovito G., Boldrin F. & Irato P., 2015.** Metal and metallothionein distribution in different tissues of the Mediterranean clam *Venerupis philippinarum* during copper treatment and detoxification. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, **174–175**: 46–53.[Ddoi.org/10.1016/j.cbpc.2015.06.008](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.06.008).
- Schoonover, C. M., Wieker, J., Pope, R., Brown, C., Cooper, E., DeWitt, J., ... & Joyner-Matos, J., 2016.** Development of functional trait biomarkers for trace metal exposure in freshwater clams (*Musculium spp.*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, **200**, 21-34. [Doi. 10.1016/j.cbpa.2016.04.012](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.04.012).
- Sheir, K. S., Mohamad, H., A., Y Osman, G., & R Abd Elhafez, A. E., 2020.** Acute and chronic effects of Bisphenol A on hormonal disruption and histological alterations in the freshwater clam, *Caelatura nilotica* (Cailliaud, 1827). *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, **24** (7-Special issue), 397-426. [DOI : 10.21608/ejabf.2020.120508](https://doi.org/10.21608/ejabf.2020.120508).
- Shepard, J. L., Olsson, B., Tedengren, M., & Bradley, B. P. (2000).** Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Marine Environmental Research*, **50**(1-5), 337-340.
- Shepard, J. L., Olsson, B., Tedengren, M., & Bradley, B. P., 2000.** Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress.

Marine Environmental Research, 50(1-5), 337-340. [Doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00065-9).

**Shi Z., Yang S., Han D., Zhou Z., Li X., Liu Y. & Zhang B., 2018.** Silicon alleviates cadmium toxicity in wheat seedlings (*Triticum aestivum L.*) by reducing cadmium ion uptake and enhancing antioxidative capacity. *Environmental Science and Pollution Research*, **25**: 7638–7646. [Doi.org/10.1007/s11356-017-1077-9](https://doi.org/10.1007/s11356-017-1077-9).

**Sieratowicz, A., Stange, D., Schulte-Oehlmann, U., & Oehlmann, J., 2011.** Reproductive toxicity of bisphenol A and cadmium in *Potamopyrgus antipodarum* and modulation of bisphenol A effects by different test temperature. *Environmental Pollution*, **159**(10), 2766-2774. [Doi.org/10.1016/j.envpol.2011.05.012](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.05.012).

**Sifi, K., & Soltani, N., 2019.** Seasonal changes of two biomarkers of oxidative stress (LDH, MDA) in the edible mollusc *Donax trunculus* (Mollusca : Bivalvia) from the Gulf of Annaba (Algeria): correlation with carbohydrate and lipid contents. *Molluscan Research*, **39**(1), 44-52.

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

**Silva, A.J., 2017.** Assessment of cadmium phytotoxicity alleviation by silicon using chlorophyll a fluorescence. *Photosynthetica*, **55** : 648–654. [Doi.org/10.1007/s11099-016-0680-1](https://doi.org/10.1007/s11099-016-0680-1).

**Simon, R., Jubeaux, G., Chaumot, A., Lemoine, J., Geffard, O., & Salvador, A., 2010.** Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology : Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*). *Journal of Chromatography A*, **1217**(31), 5109-5115.

**Simonato, J.D., Mela, M., Doria, H.B., Guiloski, I.C., Randi, M.A., Carvalho, P.S.M., Meletti, P.C., Silva de Assis, H.C., Bianchini, A., & Martinez, C.B.R., 2016.** Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, **170** : 31-41. [Doi:10.1016/j.aquatox.2015.11.012](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.012).

**Siregar, A.S., Sulisty, I., Prayogo, N.A., 2020.** Heavy metal contamination in water, sediments and Planiliza subviridis tissue in the Donan River, Indonesia. *Journal of Water and Land Development*. No. **45 (IV–VI)** p. 157–164. [Doi : 10.24425/jwld.2020.133057](https://doi.org/10.24425/jwld.2020.133057).

**Smaoui-Damak, W., Rebai, T., Berthet, B., & Hamza-Chaffai, A. J. C. B., 2006.** Does cadmium pollution affect reproduction in the clam *Ruditapes decussatus* ? A one-year case study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **143(2)**, 252-261. [Doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.02.009](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.02.009).

**Sun, C. & Zhang, S., 2015.** Immune-Relevant and Antioxidant Activities of Vitellogenin and Yolk Proteins in Fish. *Nutrients*, **7**, 8818-8829. [Doi.org/10.3390/nu7105432](https://doi.org/10.3390/nu7105432).

**Sundin, J., Jutfelt, F., Thorlacius, M., Fick, J., & Brodin, T., 2019.** Behavioural alterations induced by the anxiolytic pollutant oxazepam are reversible after depuration in a freshwater fish. *Science of The Total Environment*, **665** : 390–399. [Doi:10.1016/j.scitotenv.2019.02.049](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.049).

**Sundin, J., Jutfelt, F., Thorlacius, M., Fick, J., & Brodin, T., 2019.** Behavioural alterations induced by the anxiolytic pollutant oxazepam are reversible after depuration in a freshwater fish. *Science of The Total Environment*, **665** : 390–399. [Doi:10.1016/j.scitotenv.2019.02.049](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.049).

**Sussarellu, R., Fabioux, C., Sanchez, M. C., Le Goïc, N., Lambert, C., Soudant, P., & Moraga, D., 2012.** Molecular and cellular response to short-term oxygen variations in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **412**, 87-95. [Doi.org/10.1016/j.jembe.2011.11.007](https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.11.007).

## T

---

**Tankoua, O. F., Buffet, P. E., Amiard, J. C., Berthet, B., Mouneyrac, C., & Amiard Triquet, C. 2013.** Integrated assessment of estuarine sediment quality based on a multi biomarker approach in the bivalve *Scrobicularia plana*. *Ecotoxicology and environmental safety*, **88**, 117-125. [Doi : 10.1016/j.ecoenv.2012.11.004](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.004).

- Théband, O., Véron, G., Fifas, S., 2005.** Incidences des épisodes d'efflorescences de micro algues toxiques sur les écosystèmes et sur les pêcheries de coquillage en baie de Douarnenez. IFREMER. 73p et annexes.
- 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. [Doi : 10.1016/j.chemosphere.2010.07.064](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.064).
- Tlili, S., & Mouneyrac, C., 2019.** The wedge clam *Donax trunculus* as sentinel organism for Mediterranean coastal monitoring in a global change context. *Reg Environ Change* **19**, 995–1007. [Doi.org/10.1007/s10113-018-1449-9](https://doi.org/10.1007/s10113-018-1449-9).
- Tlili, S., & Mouneyrac, C., 2020.** New challenges of marine ecotoxicology in a global change context, *Marine Pollution Bulletin*, Volume **166**. [Doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112242](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112242).
- Tlili, S., Jemai, D., Brinis, S., Regaya, I., 2020.** Microplastics mixture exposure at environmentally relevant conditions induce oxidative stress and neurotoxicity in the wedge clam *Donax trunculus*, *Chemosphere*, Volume **258**, 127344, ISSN 0045-6535. [Doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127344](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127344).
- Tlili, S., Métais, I., Ayache, N., Boussetta, H., Mouneyrac, C., 2011.** Is the reproduction of *Donax trunculus* affected by their sites of origin contrasted by their level of contamination? *Chemosphere*, Volume **84**, Issue **10**, Pages 1362-1370. [Doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.005.009](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.005.009).
- Tlili, S., Minguez, L., Giamberini, L., Geffard, A., Boussetta, H., Mouneyrac, C., 2013.** Assessment of the health status of *Donax trunculus* from the Gulf of Tunis using integrative biomarker indices, *Ecological Indicators*, Volume **32**, Pages 285-293. [Doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.04.003](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.04.003).
- Tran, T. K. A., Yu, R. M. K., Islam, R., Nguyen, T. H. T., Bui, T. L. H., Kong, R. Y. C., ... & MacFarlane, G. R., 2019.** The utility of vitellogenin as a biomarker of estrogenic endocrine disrupting chemicals in molluscs. *Environmental pollution*, **248**, 1067-1078. [Doi : 10.1016/j.envpol.2019.02.056](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.056).
- Tsutsui, N., Kim, Y. K., Jasmani, S., Ohira, T., Wilder, M. N. and Aida, K., 2005.** "The dynamics of vitellogenin gene expression differs between intact and eyestalk ablated kuruma prawn *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus*." *Fisheries Science* **71**(2) : 249-256.

## U

---

**Ukaogo, P.O., Ewuzie, U., Chibuzo D., Onwuka, V., 2020.** 21 - Environmental pollution : causes, effects, and the remedies, *Microorganisms for Sustainable Environment and Health, Elsevier*, Pages 419-429. [Doi.org/10.1016/B978-0-12-819001-2.00021-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819001-2.00021-8).

## V

---

**Varó, I., Navarro, J. C., Nunes, B., & Guilhermino, L. (2007).** Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings. *Aquaculture*, **266(1-4)**, 87-96. [Doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.045](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.045).

**Vazquez Boucard, C.G., Levy, P., Ceccaldi, H.J., Brogren, C.H., 2002.** Developmental changes in concentrations of vitellin, vitellogenin, and lipids in hemolymph, hepatopancreas, and ovaries from different ovarian stages of Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus*, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Volume **281**, Issues **1–2**, Pages 63-75. [Doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00409-4](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00409-4).

**Vercauteren, K. & Blust, R., 1999.** Uptake of cadmium and zinc by the mussel *Mytilus edulis* and inhibition by calcium channel and metabolic blockers. *Marine Biology* **135**, 615–626. [Doi.org/10.1007/s002270050662](https://doi.org/10.1007/s002270050662).

**Verma, AK, Prakash, S., 2020c.** Status of Animal Phyla in different Kingdom Systems of Biological Classification. *International Journal of Biological Innovations* : **2(2)** :149-154. [Doi.org/10.46505/IJBI.2020.2211](https://doi.org/10.46505/IJBI.2020.2211).

**Viarengo, D., Lowe, C., Bolognesi, E., Fabbri, A., Koehler, L., 2007.** The use of biomarkers in biomonitoring : A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, Volume **146**, Issue **3**, Pages 281-300. [Doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011).

## W

---

- Waykar, B., & Deshmukh, G., 2012.** Evaluation of Bivalves as Bioindicators of Metal Pollution in Freshwater. *Bull Environ Contam Toxicol* **88**, 48–53. [Doi.org/10.1007/s00128-011-0447-0](https://doi.org/10.1007/s00128-011-0447-0).
- Wheeler, J. R., Gimeno, S., Crane, M., Lopez-Juez, E., & Morritt, D., 2005.** Vitellogenin : a review of analytical methods to detect (anti) estrogenic activity in fish. *Toxicology Mechanisms and Methods*, **15**(4), 293-306. [Doi : 10.1080/15376520590968789](https://doi.org/10.1080/15376520590968789).
- Witzmann, F. A., Carpenter, R. L., Ritchie, G. D., Wilson, C. L., Nordholm, A. F., & Rossi III, J. (2000).** Toxicity of chemical mixtures : Proteomic analysis of persisting liver and kidney protein alterations induced by repeated exposure of rats to JP-8 jet fuel vapor. *ELECTROPHORESIS : An International Journal*, **21** (11), 2138-2147.
- World Health Organization, 2019.** Preventing disease through healthy environments exposure to cadmium : A major public health concern.
- Wu, H.C., Chen, P.C., Tsay, T.T., 2010.** Assessment of nematode community structure as a bioindicator in river monitoring. *Environmental Pollution*, Volume **158**, Issue **5**, Pages 1741-1747. [Doi.org/10.1016/j.envpol.2009.11.015](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.11.015).
- Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G. et al., 2016.** A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ Sci Pollut Res* **23**, 8244–8259. [Doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x](https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x).

## X

---

- Xie, Y., Hu, L., Du, Z., Sun, X., Amombo, E., Fan, J. & Fu, J., 2014.** Effects of Cadmium Exposure on Growth and Metabolic Profile of Bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.]. [Doi.org/10.1371/journal.pone.0115279](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115279).
- Xu, R., Pan, L., Yang, Y., Zhou, Y., & Li, D., 2020.** Temporal transcriptome analysis in female scallop *Chlamys farreri* : First molecular insights into the disturbing mechanism on lipid metabolism of reproductive-stage dependence under benzo [a] pyrene exposure. *Science of The Total Environment*, 746, 142032. [Doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142032](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142032).
- Xu, R., Pan, L., Zhou, Y., Gao, Z., Miao, J., Yang, Y., & Li, D. 2022.** Reproductive toxicity

induced by benzo [a] pyrene exposure : first exploration highlighting the multi-stage molecular mechanism in female scallop *Chlamys farreri*. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-19. Doi : [10.1007/s11356-022-19235-6](https://doi.org/10.1007/s11356-022-19235-6).

## Y

---

**Yadav, P., Singh, J., Srivastava, D.K., Mishra, V., 2021.** Chapter 6 - Environmental pollution and sustainability, Editor(s) : Pardeep Singh, Pramit Verma, Daniela Perrotti, K.K. Srivastava, Environmental Sustainability and Economy, *Elsevier*, Pages 111-120. [Doi.org/10.1016/B978-0-12-822188-4.00015-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822188-4.00015-4).

**Yang, J., Harino, H., Liu, H., Miyazaki, N., 2008.** Monitoring the organotin contamination in the Taihu Lake of China by bivalve mussel *Anodonta woodiana*. *Bull Environ Contam Toxicol* **81**:164–168. DOI : [10.1007/s00128-008-9464-z](https://doi.org/10.1007/s00128-008-9464-z).

**Yap, C. K., Lo, W. S., Cheng, W. H., Nulit, R., Ibrahim, M. H., Hao, S., ... & Al-Shami, S. A., 2020.** Heavy Metals in Rock Oyster *Saccostrea cucullata* Collected from Sungai Tapai and Pantai Lido, Peninsular Malaysia : *An Insight from Health Risk Assessment*. Doi : [10.37179/rijees.000002](https://doi.org/10.37179/rijees.000002).

**Yasmeen, S. (2019).** Cadmium induced histopathological alterations in female gonad of freshwater bivalve mollusks, *Lamellidens marginalis* during summer season. *International Journal of Biological Innovations*, 1(2), 73-77. Doi : <https://doi.org/10.46505/IJBI.2019.1207>.

## Z

---

**Zhang, M., Shi, Y., Lu, Y., Johnson, A. C., Sarvajayakesavalu, S., Liu, Z., ... & Jin, X., 2017.** The relative risk and its distribution of endocrine disrupting chemicals, pharmaceuticals and personal care products to freshwater organisms in the Bohai Rim, China. *Science of the Total Environment*, **590**, 633-642. [Doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.011](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.011).

**Zhang, W., Liu, K., Li, J., Chen, L., & Lin, K., 2015.** Uptake and depuration kinetics of lead (Pb) and biomarker responses in the earthworm *Eisenia fetida* after simultaneous

## *Références bibliographiques*

exposure to decabromodiphenyl ether (BDE209). *Ecotoxicology and environmental safety*, **113**, 45-51. [Doi : 10.1016/j.ecoenv.2014.11.014](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.014).

**Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M., & Cajaraville, M. P., 2006.** Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway) : an integrated biochemical, histochemical and histological study. *Aquatic toxicology*, **78**, S109-S116. [Doi : 10.1016/j.aquatox.2006.02.032](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.032).

**Zou, H.X., Pang, Q.Y., Lin, L.D., Zhang, A.Q., Li, N., Lin, Y.Q. et al., 2014.** Behavior of the Edible Seaweed *Sargassum fusiforme* to Copper Pollution : Short-Term Acclimation and Long-Term Adaptation. *PLoS ONE* **9(7)** : e101960. [Doi.org/10.1371/journal.pone.0101960](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101960).

# **VALORISATION SCIENTIFIQUE**

**Publications catégorie (B) (01) :**

**KHEROUFI, N., HAMDANI, A., & SOLTANI, N., 2021.** Acute exposure of cadmium on *Donax trunculus* (Mollusca Bivalvia) during the vitellogenesis process : Histological and biochemical aspects. *Biodiversity Journal*, **12(4)** : 865-873.  
<https://doi.org/10.31396/Biodiv.Jour.2021.12.4.865.873>.

Communication internationale (17)

**KHEROUFI Nawel, HAMDANI Amel, 2017.** Effet sublétaI du cadmium chez *Donax trunculus*», *17èmes journées Tunisiennes des Sciences de la Mer* Du 18 au 21 Décembre 2017, Le Grand Hôtel, îles Kerkennah, Tunisie (Communication Affichée).

**KHEROUFI Nawel, HAMDANI Amel, 2018.** Effet sublétaI du cadmium sur la vitellogénèse de *Donax trunculus* (Mollusca,Bivalvia): Etude histologique. *VI<sup>ème</sup> congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources,AT-BVBR* du 20-23 Mars 2018,Tabarka-tunisie (Communication Affichée).

**KHEROUFI Nawel, HAMDANI Amel & KROINI Hanene, 2018.** Etude histologique des ovaires de *Donax trunculus* (Mollusque, bivalve) en période d'exposition aigue au chlorure de cadmium. *6ème Congrès franco–tunisien de zoologie, le 6ème Congrès franco–maghrébin de zoologie, les 119èmes Journées annuelles de la Société zoologique de France*, 21-23 Novembre 2018, Paris (Communication Affichée).

**KHEROUFI Nawel, HAMDANI Amel & KROINI Hanene, 2018.** Réponse des biomarqueurs d'effet et d'exposition chez *Donax trunculus* (Mollusque, bivalve) durant la période d'exposition aigue au cadmium : Aspect reproductif. *6ème Congrès franco–tunisien de zoologie, le 6ème Congrès franco–maghrébin de zoologie, les 119èmes Journées annuelles de la Société zoologique de France*, 21-23 Novembre 2018, Paris (Communication Orale).

**KHEROUFI Nawel, HAMDANI Amel & KROINI Hanane, 2019.** The effect of cadmium “acute toxicity” on the reproduction aspect of *Donax trunculus* (mollusk, bivalvia): histological study. *Séminaire international environnement et toxicology*; 18 et 19 Février 2019 à Constantine (communication affiché).

**KHEROUFI Nawel, HAMDANI Amel & KROINI Hanane, 2021.** Etude protéomique des vitellogénines chez *Donax trunculus* (mollusque, bivalve): impact du cadmium. *PEER, 07-08 July 2021, Blida* (Communication orale)

**KROINI Hanene, HAMDANI Amel & KHEROUFI Nawel, 2018.** Effet sublétaI du cadmium sur les réponses en Teneurs d'eau et de matière sèche au niveau de la chair de *Donax trunculus* durant la période d'exposition et de restauration. *6ème Congrès franco–tunisien de zoologie, le 6ème Congrès franco–maghrébin de zoologie, les 119èmes Journées annuelles de la Société zoologique de France*, 21-23 Novembre 2018, Paris (Communication Affichée).

HAMDANI Amel, **KHEROUFI Nawel**, KROINI Hanane, 2018. Réponses de certains marqueurs biochimiques chez *Donax trunculus* (Mollusque, Bivalve) durant l'exposition aiguë au cadmium. *Séminaire international de biosciences 2018*, Oran 28-29 octobre 2018 (Communication affiché).

HAMDANI Amel, KROINI Hanane, **KHEROUFI Nawel**, 2018. Impact du cadmium sur la valeur nutritionnelle de *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia): Variation de la partie inorganique en période d'exposition et de restauration. *Séminaire international de sécurité alimentaire et développement durable en milieu semi-aride*, 8 au 10 Décembre 2018 à Sétif-Algérie (Communication affiché).

HAMDANI Amel, KROINI Hanane, **KHEROUFI Nawel**, ZAIDI Nedjouda, 2019. Sublétales et restauration des réponses chez une espèce comestible et bioindicatrice de la pollution *Donax trunculus* : variation de la teneur en matière grasse libre durant la période d'activité sexuelle. *IIème Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des BioRessources 20 – 23 Mars 2019*, THABRACA – Tabarka, TUNISIE (Communication affiché).

**HAMDANI Amel**, KROINI Hanane & KHEROUFI Nawel ., 2019 . Evaluation de la toxicité aiguë du cadmium sur les teneurs en eau et en matières sèches chez *Donax trunculus* pendant la période d'activité sexuelle , 30ème Congrès international de l'ATSB, sousse 26 – 29 Mars 2019 (Communication affiché).

**KHEROUFI Nawel**, HAMDANI Amel & KROINI Hanane, 2019. The effect of cadmium “acute toxicity” on the reproduction aspect of *Donax trunculus* (mollusk, bivalvia): histological study. *Séminaire international environnement et toxicologie*; 18 et 19 Février 2019 à Constantine (communication affiché)

KROINI Hanane, HAMDANI Amel & **KHEROUFI Nawel**, 2019. Impact du cadmium chez *Donax trunculus* : variation de la teneur en matière grasse libre en période de repos sexuel. *Séminaire international environnement et toxicologie*; 18 et 19 Février 2019 à Constantine (communication affiché)

HAMDANI Amel, KROINI Hanane, **KHEROUFI Nawel**, SOLTANI Nouredine, ZAIDI Nedjouda, BOUMAZA Fatima Zohra, 2019. Impact of Acute Toxicity of Cadmium on the Nutritional Value of *Donax trunculus* : Variation of Carbohydrate Contents. *BioEco2019- International Biodiversity & Ecology Sciences Symposium* ISBN: 978-605-80198-0-5 Publication of e-book date: 22.10.2019. SEPTEMBER 26-28, 2019 İstanbul / TURKEY (Communication orale).

KROINI Hanane, HAMDANI Amel & **KHEROUFI Nawel**, 2019. Évaluation de la qualité nutritionnelle de la chair de *Donax trunculus* durant la période d'exposition aiguë au Cadmium : variation des taux de glucides durant la période d'activité sexuelle. *Symposium Internationale Environnement, Risque et Santé, Souk-Ahras 05-06 Novembre, 2019* (communication affiché).

KROINI Hanane, HAMDANI Amel & **KHEROUFI Nawel**, 2020. Réponse de certains marqueurs biochimiques chez *Donax trunculus* (Mollusque, Bivalve) à une

Toxicité au cadmium : variation des réserves énergétiques durant la période de repos sexuel. *1<sup>st</sup> international conférence on biodiversity in service of biotechnologies*, Mila, .9-10 MARS 2020 (communication affiché).

HAMDANI Amel, **KHEROUFI Nawel**,\_KROÏNI Hanane,\_SOLTANI Nouredine, ZAÏDÏ Nedjouda, CHOUAHDA Salima, 2020. Impact of Acute Toxicity of Cadmium on reproduction period of *Donax trunculus*: Variation of vitellin quality, ICSuSaT-2020, 03-05July 2020, ISTANBUL-TURKEY (Communication orale).

#### Communications Nationales (7)

**KHEROUFI Nawel**, HAMDANI Amel, 2018. Effet sublétal du Cadmium sur la vitellogénèse chez *Donax trunculus* (mollusca, bivalvia): évaluation des taux de vitellines durant la période d'exposition et d'épuration". *1er Séminaire National sur : L'Eau, l'Environnement et Santé*, l'Université Chadli Bendjedid -El-Tarf- 06 et 07 Mars 2018 (Communication Orale).

**KHEROUFI Nawel**, HAMDANI Amel & KROÏNI Hanane, 2018. Effet sublétal du cadmium sur la Vitellogénèse de *Donax trunculus*: Variation des teneurs en vitellogénines pendant la période d'exposition et de dépuración. *Séminaire National Biologie, Environnement et santé SNBES*, Octobre 2018, Skikda (Communication Affichée).

**KHEROUFI Nawel**, HAMDANI Amel, 2018. Effet sublétal du cadmium sur la morphométrie des ovaires de *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia). *Séminaire National : Biotechnologie, Environnement et santé, (BiEnSa 2018)*, 28-29 Novembre, Jijel (Communication Affichée).

KROÏNI Hanane., **KHEROUFI Nawel** & HAMDANI Amel, 2018. Toxicité du cadmium sur *Donax trunculus*: Détermination de la teneur en eau de la chair. *Séminaire National Biologie, Environnement et santé SNBES* Octobre 2018 (Communication Affichée).

HAMDANI Amel, KROÏNI Hanane, ZAÏDI Nedjouda. **KHEROUFI Nawel**, 2021. Impact de la toxicité aiguë du cadmium à l'égard de *Donax trunculus*: variation de la composition biochimique durant la période de repos sexuel. *Le 1er Séminaire National sur les Ressources Naturelles face aux Contraintes d'Usage et du Changement Climatique (SENACUC)*. Mila 04 JUILLET 2021 (Communication orale).

HAMDANI Amel, KROÏNI Hanane & **KHEROUFI Nawel**, 2018. Evaluation de la valeur nutritionnelle et effet du cadmium chez *Donax trunculus* : variation de la partie inorganique en période d'exposition et de restauration. *Séminaire national*

"biensa'2018" 28 et 29 novembre 2018 université- med-sedik benyahia-Jijel  
(Communication affiché).

KROINI Hanane, HAMDANI Amel & **KHEROUFI Nawel**, 2019. Variation du taux de protéines au niveau de la chair de *Donax trunculs* exposé au cadmium durant la période d'activité sexuelle, *Séminaire Nationale de Biodiversité, Biologie médicale et Ecotoxicologie Environnementale. Skikda 30-31 Octobre, 2019* (Communication orale).

### Tâches pédagogiques

Chargée travaux Pratiques :

- Zoologie, 2ème année, Sciences Biologiques

Travaux Dirigés :

- Toxicologie Environnementale, Master II : Physio-toxicologie et environnement
- Ecotoxicologie spéciale, Master II : Physio-toxicologie et environnement

Assistante encadrement Master II :

- Reproduction.

## Acute exposure of cadmium on *Donax trunculus* Linnaeus, 1758 (Mollusca Bivalvia) during the vitellogenesis process: histological and biochemical aspects

Nawel Kheroufi, Amel Hamdani\* & Nouredine Soltani

Laboratory of Applied Animal Biology, University Badji Mokhtar of Annaba, 23000 Annaba, Algeria

\*Corresponding author: a\_hamdaniamel@yahoo.fr

---

### ABSTRACT

This work aims to evaluate the impact of cadmium on the vitellogenesis of *Donax trunculus* Linnaeus, 1758 an edible Mollusk species, by carrying out a histological study in which the morphometric parameters of the oocytes were measured, and by using vitellogenin (Vtg) and vitellin (Vn) as biomarkers of reprotoxicity. Clams were collected from a clean site (El-Battah) during the period of morphological maturity and reared under laboratory conditions. Cadmium chloride was added to the rearing water at two sublethal concentrations (LC10 and LC25-96h) previously determined. Two-way ANOVA revealed significant effects of Cd concentrations and exposure time on all studied parameters. The data obtained suggest that this metal can act as endocrine-disrupting chemicals in *Donax trunculus*.

### KEY WORDS

Cadmium; oocyte; vitellin; vitellogenin; vitellogenesis.

Received 08.09.2021; accepted 20.10.2021; published online 22.11.2021

---

### INTRODUCTION

Heavy Metals, as elements, are not biodegradable; although their chemical state may be altered and form compounds of varying toxicity to aquatic organisms, their toxicity varies according to environmental conditions (George et al., 2013). Over the last decades, contamination by metallic compounds has become a subject of concern worldwide; indeed, marine pollution related to heavy metals raises many concerns for aquatic populations and humans (Singh et al., 2021; Yap et al., 2021).

The Algerian coastline, which extends for more than 1200 km, is considered a coastal ecosystem of great ecological importance. They are home to various animal and plant species. Pollution of these coastal areas by various chemical substances can have serious consequences on the ecological balance (Houma et al., 2011). Previous works have shown that the gulf of Annaba is affected by var-

ious heavy metals (Abdennour et al., 2000; Rabei et al., 2018 ; Amira et al., 2018). Indeed, cadmium was particularly detected in sediments and tissues of an abundant edible species *Donax trunculus* Linnaeus, 1758 (Mollusca Bivalvia Donacidae), in the bay of Annaba (Beldi et al., 2006; Drif et al., 2010; Amira et al., 2018). This species has been used as a bioindicator of marine coastal waters' quality due to their sedentary and sessile lifestyles. As filter feeders, their tissues tend to bio-accumulate many contaminants at higher levels (Hamdani et al., 2020; Boukari et al., 2021).

For many years, cadmium (Cd) has been considered one of the most dangerous toxic heavy metals (Järup, 2003; Xie et al., 2014) because of its intrinsic ionic similarity to calcium. Indeed, marine bivalves can accidentally take up cadmium and pass it into their cells through calcium channels (Vercauteren & Blust, 1999; Shi et al., 2018). It can cause a series of biochemical and physiological dysfunctions both in humans and laboratory ani-

mals (Santovito et al., 2015; Senthamilselvan et al., 2016; Silva et al., 2017), such as the depletion of energy reserves (Merad & Soltani, 2017), oxygen consumption increase (Chandurvelan et al., 2017) and damage to DNA (Michel & Vincent-Hubert, 2015). Likewise, cadmium can have an endocrine-disrupting power. The correlations between the involvement of cadmium in the dysfunction of energy status and endocrine disruption may interfere with the reproduction of bivalves (Ketata et al., 2007; Baudrimont et al., 2019).

Histological study of gonad through morphometric measurements of oocytes can be considered good biomarkers for evaluating environmental endocrine disruption; while vitellogenin and vitellin are widely accepted as biomarkers to assess estrogenic disruption in aquatic environments (Blaise et al., 2003; Matozzo et al., 2008). In benthic bivalve molluscs, the vitellogenin (Vtg) is a glycolipoprophosphoprotein synthesized by the digestive gland and secreted in the hemolymph. It is transported to the ovaries or accumulates in the oocytes in growth (Vitellogenesis) by a connection with specific receptors associated with endocytose vesicles; this protein is the precursor of vitellins reserves (Vn) (Wahli et al., 1981; Denslow et al., 1999; Jubeaux, 2015). Besides, vitellin is a glycolipoprotein of egg necessary to develop the future embryo (Robinson, 2002).

The synthesis of the precursor of Vn was shown as being controlled by the oestrogens in fresh water and sea bivalves (Blaise et al., 1999; Blaise et al., 2003; Quinn et al., 2004; Marin and Matozzo, 2004). This study aims to assess the sub-lethal effects of cadmium (LC<sub>10</sub> and LC<sub>25</sub>-96h) on morphometric measurements of oocytes of *D. trunculus* using histological analysis and on the level of vitellogenin and vitellin in hemolymph's and gonad's of *D. trunculus*, respectively.

## MATERIAL AND METHODS

### *Samples collection and treatment*

Specimens of adult *D. trunculus* were collected from El Battah beach (36° 50' N - 7° 50' E) in March 2018, where the majority of individuals were then in the stage of morphological ripe (Hamdani et al., 2020). El-Battah beach was chosen as a sampling site because of its remoteness from anthropo-



Figure 1. Localisation of sampling site: El Battah beach

genic activity, its important hydrodynamic exposure, and the species' abundance (Fig. 1) (Rabei et al., 2018; Boukari et al., 2021). Animals were transported in cold boxes to the laboratory, and *D. trunculus* females were separated by macroscopic inspection according to the gonads colour: dark blue. Clams were acclimatized for 48h before exposure to cadmium chloride (Belabed & Soltani, 2013). The water was constantly aerated during all the experiments, and a 12h light/dark cycle was maintained. The physico-chemical parameters of seawater were as follows: temperature:  $16.65 \pm 0.49$  °C; salinity:  $33.50 \pm 0.87$  g/L; pH:  $8.09 \pm 0.037$ ; dissolved oxygen:  $7.91 \pm 0.37$  mg/L. *D. trunculus* were fed daily with a commercial food mixture (Marine Invertebrate Diet Carolina Ltd., NC, USA) and were exposed to cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>), according to 96h-LC<sub>10</sub> (0.94mg /L) and 96h-LC<sub>25</sub> (1.60mg /L) as previously determined by Merad & Soltani (2015). The acute toxicity was measured for 96h.

### *Histological procedures*

The histological procedure was performed according to Gabe (1968). In brief, gonads were fixed in alcoholic Bouin's solution for 24–48 h. Then, tissues were carried out in alcohol baths of increasing concentration, as follows: 70%, 80%, 90% and 95%. Tissues were embedded in paraffin wax at 60 °C. After setting in a block, in plastic cassettes, the microtome cuts the blocks to a thickness of 5 µm. Sections were stained with hematoxylin and eosin, mounted in Canada balsam. Slides were blindly examined using a Leica microscope (DM500) equipped with a Leica camera (ICC50 HD). The morphometric parameters, such as length (L) and width (l), were measured with a rule associated

with a Leica camera and were expressed in  $\mu\text{m}$ . The volume was calculated according to the following formula (Lumbreas et al., 1991) and was expressed in  $\text{mm}^3$  as follows:  $V = 4\pi/3(L/2)(l/2)$ .

### Vitellogenin and vitellin determination

The Vtg and Vn levels were made on hemolymph and gonads of *D. trunculus*, respectively. The extraction was performed using a Tris buffer (0.5 M; pH 7.4) following the procedure of Fabre et al. (1990). Samples were homogenized by ultrasound and then centrifuged (5,000 g for 10 min). Three distinct layers were separated in hemolymph and gonads samples, and the intermediate layer containing the Vtg and Vn respectively was removed and stored at 20°C until analysis. The level of vitellogenin and vitellin were made according to Bradford (1976) using Coomassie brilliant blue G-250 (CBB) as a reagent and bovine serum albumin (BSA) as standard (Sigma). The absorbance was read at a wavelength of 595 nm.

### Data analysis

Statistical analyses were performed using Prism version 7 for Windows (GraphPad software, La Jolla, CA, USA, www.Graphpad.com). Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (mean  $\pm$  SD) with a statistical significance level of  $p < 0.05$ . A two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-hoc test, was used to evaluate differences between the control and treated series. Pearson correlation-test determined the correlations between all parameters studied.

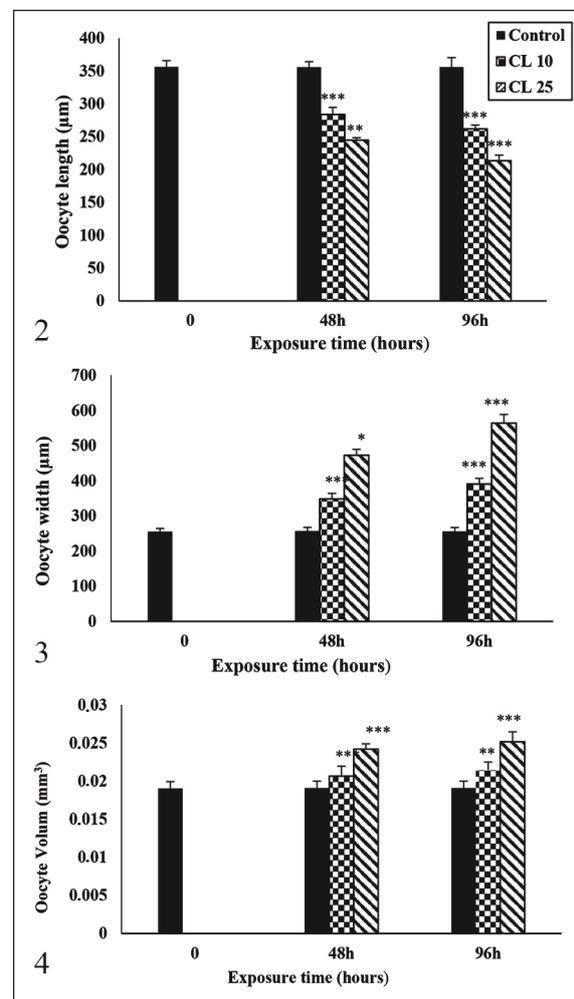
## RESULTS

### Sublethal effects of cadmium on morphometric measurements of oocytes

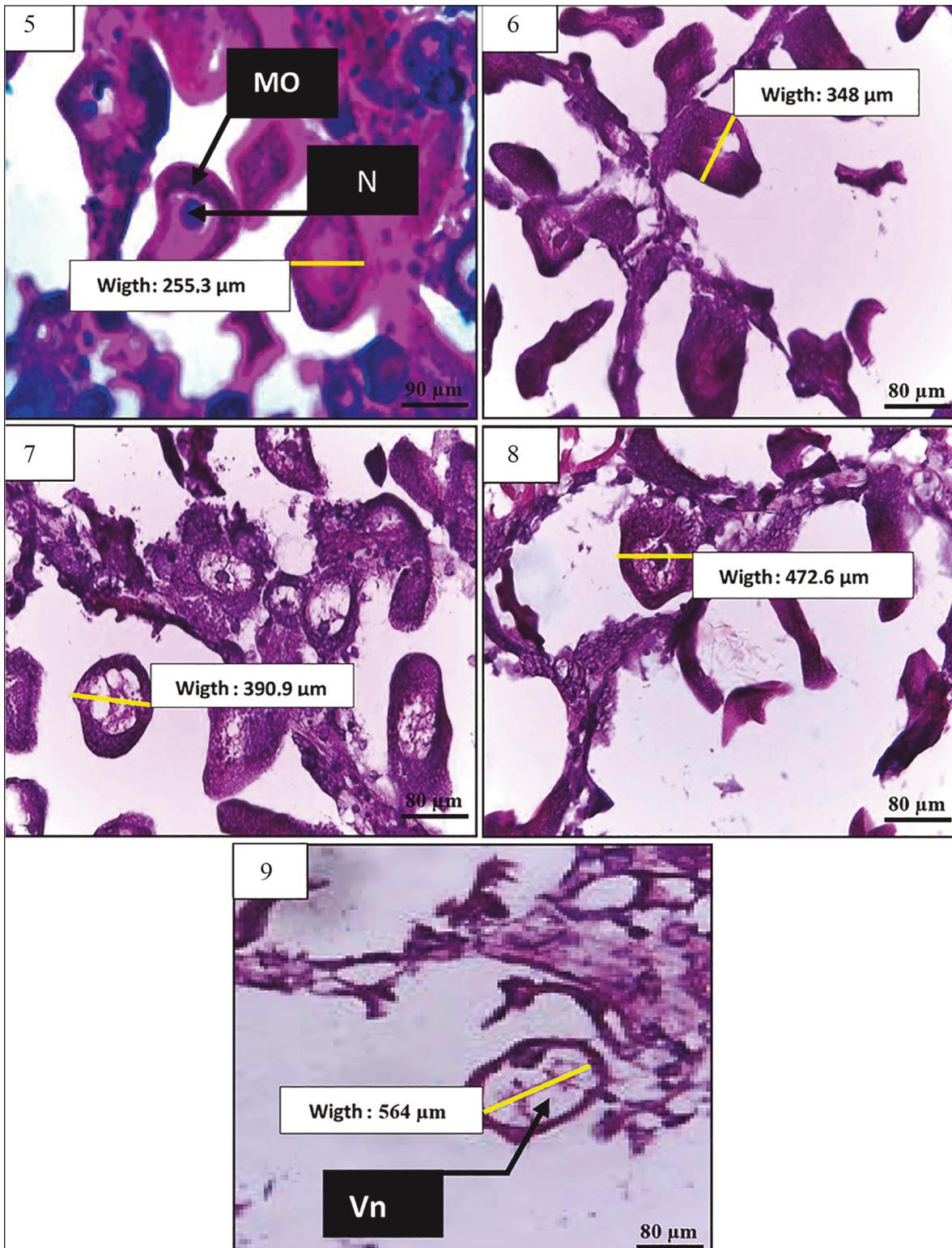
The impact of sub-lethal concentration of Cd on the morphometric measurements of oocytes was represented in Figs. 2–4 and Figs. 5–9. There was no significant difference between the morphometric measurements of oocytes recorded during the experimental period in the control series. However, the treated series presented a significant difference compared to the control series during the experimental period. As shown in Fig. 2, the treated series

indicated a significant decrease in oocyte length compared to the control series. Furthermore, oocyte length differed significantly between the control and LC<sub>10</sub>-treated series at 48h and 96h ( $p = 0.001$ ), and between the control and LC<sub>25</sub>-treated series at 48h ( $p = 0.001$ ) and 96h ( $p = 0.000$ ). A two-way ANOVA revealed significant effect of concentrations ( $F_{2,36} = 311.9$ ;  $p < 0.0001$ ) and exposure time ( $F_{2,36} = 293$ ;  $p < 0.001$ ) and a significant effect of time x treatment interaction ( $F_{4,36} = 81.71$ ;  $p = 0.0001$ ).

Figures 3 and 4 show that a significant increase of oocyte width and volume as compared to the control series. Indeed, the oocyte width differed



Figures 2–4. Effects of cadmium on morphometric measurements of oocytes in *D. trunculus*. Fig. 2: effect of Cd on the length of oocytes. Fig. 3: effect of Cd on the width of oocytes. Fig. 4: effect of Cd on the volume of oocyte (mean  $\pm$  SD;  $n = 5$ ). Asterisks above treated series indicated significant difference with controls of the same time (\*: significant difference at  $p < 0.05$ ; \*\*: significant difference at  $p < 0.01$ ; \*\*\*: significant difference at  $p < 0.001$ ).



Figures 5–9. Histological sections of the ovaries of *Donax trunculus* in sexual maturity (Gx40). Fig. 5: 0j; Control. Fig. 6: CL10(48h). Fig. 7: CL10(96h). Fig. 8: CL25(48h). Fig. 9: CL25(96h). N: Nucleus; MO: Mature oocyte; Vn: vitellin.

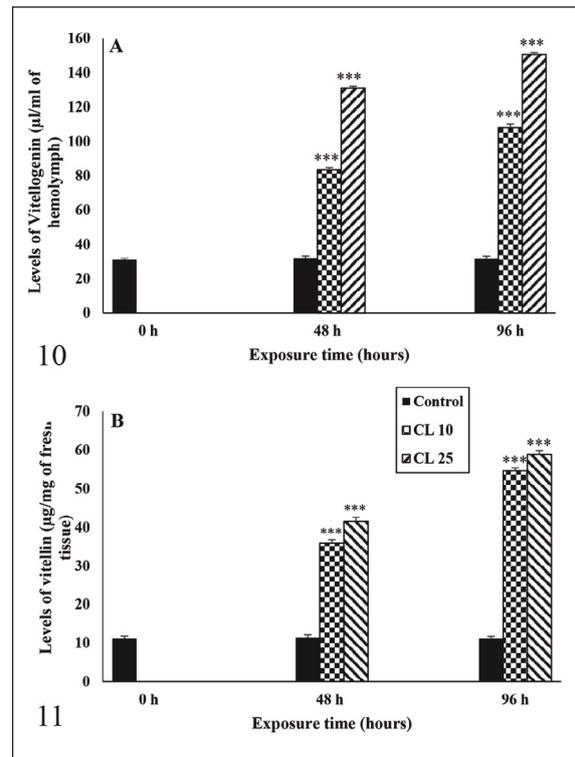
significantly between the control series and the LC<sub>10</sub>-treated series at 48h and 96h (p = 0.001), and between the control series and the LC<sub>25</sub>-treated series at 48h (p = 0.001) and 96h (p = 0.000). A two-way ANOVA recorded a significant effect of concentrations (F<sub>2,36</sub> = 216.1; p < 0.0001) and exposure time (F<sub>2,36</sub> = 161.1; p < 0.001) and a significant effect of time x treatment interaction (F<sub>4,36</sub> = 59.04; p = 0.0001). In addition, the oocyte volume diverged significantly between the control and LC<sub>10</sub>-treated series 48h (p=0.001) and 96h (p = 0.001), and between the control and LC<sub>25</sub>-treated series 48h and 96h (p = 0.000). This result was confirmed by two-way ANOVA where significant effects of concentrations (F<sub>2,36</sub> = 47.41; p < 0.0001) and exposure time (F<sub>2,36</sub> = 30.4; p < 0.001) and time x treatment interaction (F<sub>4,36</sub> = 12.14; p = 0.0001) were observed.

**Sublethal effects of cadmium on vitellogenin and vitellin levels**

The sublethal effects of Cd on the levels of Vtg and Vn varied as function time and concentration. Like morphometric parameters on the control series, no differences between the values of Vtg and Vn levels were noted during the experimental period. Nevertheless, the treated series presented a significant increase in Vtg and Vn levels compared to the control series (Figs. 10, 11). Also, Vtg levels were significantly different between control and LC<sub>10</sub>-treated series 48h and 96h (p = 0.001), and between control and LC<sub>25</sub>-treated series 48h (p = 0.001) and 96h (p = 0.000) (Fig. 10). A two way ANOVA showed a significant effects of concentrations (F<sub>2,36</sub> = 5874; p < 0.0001) and exposure time (F<sub>2,36</sub> = 5450; p < 0.001) and significant effect of time x treatment interaction (F<sub>4,36</sub> = 15.33; p = 0.001). Likewise, Vn levels were found to differ significantly between the control and LC<sub>10</sub>-treated series at 48h and 96h (p = 0.0001) and between the control and LC<sub>25</sub>-treated series at 48h (p = 0.0001) and 96h (0.0001) (Fig. 11). A two-way ANOVA revealed a significant effect of concentrations (F<sub>2,36</sub> = 3271; p < 0.001) and exposure time (F<sub>2,36</sub> = 3758; p < 0.001) and a significant time x treatment interaction (F<sub>4,36</sub> = 949.4; p < 0.001).

**Correlation tests**

The Pearson correlation tests between all parameters studies in *D. trunculus* are displayed in



Figures 10, 11. Sublethal effect of cadmium on vitellogenin and vitellin levels in *D. trunculus*. Fig. 10: effect of Cd on vitellogenin levels (µl/ml of hemolymph). Fig. 11: effect of Cd on vitellin levels (µg/mg of fresh tissue) (m ± SD; n = 5). Asterisks above treated series indicated significant difference with controls of the same time (\*: significant difference at p < 0.05; \*\*: significant difference at p < 0.01; \*\*\*: significant difference at p < 0.001).

Table 1. The results showed a highly significant (p= 0.001) negative correlation between levels of Vtg and length of the oocyte, levels of Vn and length of the oocyte, length and width of the oocyte, length and volume of the oocyte. A highly significant (p=0,001) positive correlation was revealed between levels of Vtg and Vn, Vn and width of the oocyte, Vn and volume of the oocyte, Vtg and width of the oocyte, Vtg and volume of the oocyte, width and volume of the oocyte.

**DISCUSSION**

Several reproductive processes can be targeted by contaminants that will alter both hormonal actions and reproductive physiology (Gagné et al., 2002; Baudrimont et al., 2020). Indeed, the structural and functional disruptions caused by pollutants and their metabolites lead to physiological and be-

Parameters	R	P
Length – width	-0.956	0.001
Length – volume	-0.834	0.001
Width – volume	0.940	0.001
Vitellogenin – length	-0.985	0.001
Vitellogenin – width	0.977	0.001
Vitellogenin – volume	0.896	0.001
Vitellin – vitellogenin	0.959	0.001
Vitellin – length	-0.960	0.001
Vitellin – width	0.910	0.001
Vitellin – volume	0.803	0.001

Table 1. Pearson correlation tests between all parameters studied in *D. trunculus* (R = coefficient of correlation; P = significance level).

havioural performance changes, including steroidogenesis and vitellogenesis (Benelli et al., 2001; Arab et al., 2004; Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2005; Zheng et al., 2010; Paschoalini et al., 2019).

In the present study, the results indicate a significant increase in oocyte width and volume, and a significant decrease of the length of oocytes in *D. trunculus* treated series compared to the controls series at two sublethal concentrations. This could be explained by the increase of Vn levels in oocytes, as reported in oysters (Fabiola et al., 2009), which shows that the increase in Vtg concentrations is synchronized with oocyte surface area and diameter. In addition, several studies on bivalves and invertebrate species have reported a positive correlation between Vtg, Vn concentrations and oocyte diameter (Vazquez-Boucard 1990; Quintio & Millamena 1992; Li et al., 1998).

Concerning the Vtg and Vn levels, it has been reported that the estrogens factor regulates the synthesis of Vtg in marine bivalves (Quinn et al., 2004). The results show a significant increase in Vtg and Vn levels in *D. trunculus* treated series compared to controls series at two test concentrations and during the exposure periods. These results confirm our histological studies and could explain that some endocrine disruptors such as metals can bind to estrogen receptors and induce agonistic responses to estrogen. These xenoestrogens have been called metalloestrogens (Quinn et al., 2004; Darbre, 2006; Paschoalini et al., 2019). These results are in good agreement with previous studies on bivalves such as *Mytilus edulis* following in vivo injection of

nonylphenol (Blaise et al., 1999) and after exposure to acute toxicity of copper (Cu) (Zorita et al., 2006), and *Elliptio complanata* after in vivo injection of nonylphenol (Gagné et al., 2001). *E. complanata* transplanted in highly contaminated municipal effluents (Blaise et al., 2003). *Dreissena polymorpha* after exposure to effluents, suggesting an endocrine disruption (Quinn et al., 2004), *Argopecten gibbus* after a semisubmerged municipal dump (Quinn et al., 2005). Similar results have been observed in other marine invertebrates such as *Asteria rubens* (Schoenmakers et al., 1981) and the crustacean *Balanus amphitrite* (Billigurst et al., 2000).

## CONCLUSIONS

The present study confirms the metalloestrogenic character of Cd for *Donax trunculus* by an endocrine disruption reflected by an increase of morphometric parameters of oocytes, exception the length and the levels of vitellogenin and vitellin.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Algerian Fund for Scientific Research of Algeria (Laboratory Applied Animal Biology to Pr. N. Soltani) and by the Ministry of High Education and Scientific Research of Algeria (CNEPRU Project N D01N01UN230120180011 to Dr. A. Hamdani).

## REFERENCES

- Aarab N., 2004. Les biomarqueurs chez les Poissons et les Bivalves: de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Université de Bordeaux, 19 pp.
- Abdenour C., Smith B.D., Boulakoud M.S., Samraoui B. & Rainbow P.S., 2000. Trace metals in marine, brackish and freshwater prawns (Crustacea, Decapoda) from northeast Algeria. *Hydrobiologia*, 432: 217–227.
- Amira A., Merad I., Almeida C.M.R., Guimarães L. & Soltani N., 2018. Seasonal variation in biomarker responses of *Donax trunculus* from the Gulf of Annaba (Algeria): Implication of metal accumulation in sediments. *Hydrology, Environment*, 350: 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2018.02.002>.
- Baudrimont M., Arini A. & Guégan C., 2020. Ecotoxicity of polyethylene nanoplastics from the North Atlantic

- oceanic gyre on freshwater and marine organisms (microalgae and filter-feeding bivalves). *Environmental Science and Pollution Research*, 27: 3746–3755. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04668-3>.
- Baudrimont M., Gonzalez P. & Mesmer-Dudons N., 2019. Sensitivity to cadmium of the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* from the Dronne River (France): experimental exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 27 : 3715–3725. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05025-0>.
- Belabed S. & Soltani N., 2013. Acute toxicity of cadmium on *Donax trunculus*: acetylcholinesterase, glutathione S-transferase activities and pattern of recovery. *European Journal of Experimental Biology*, 2 : 54–61.
- Beldi H., Gimbert F., Maas S., Scheiffler R. & Soltani N., 2006. Seasonal variations of Cd, Cu, Pb and Zn in the edible mollusk *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba, Algérie. *African Journal of Agricultural Research*, 4: 85–90.
- Benelli C., Fabbri A., Grassi S., Lambardi M. & Rugini E., 2001. Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*Olea europaea* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 1: 112–119. <https://doi.org/10.1080/14620316.2001.11511336>.
- Billinghurst Z., Clare A.S., Matsumura K. & Depledge M.H., 2000. Induction of cypris major protein in barnacle larvae by exposure to 4-n-nonylphenol and 17 $\beta$ -oestradiol. *Aquatic Toxicology*, 47: 203–212. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00018-1](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00018-1).
- Blaise C.F., Gagné F. & Pellerin J., 2003. Bivalve population status and biomarker responses in *Mya arenaria* clams (Saguenay Fjord, Québec, Canada). *Fresenius Environmental Bulletin*, 12: 956–960.
- Blaise C., Gagné F., Pellerin J. & Hansen P.D., 1999. Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): A potential biomarker for endocrine disruption. *Environ. Toxicology*, 14: 455–465. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1522-7278\(199912\)14:5<455::aid-tox2>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1522-7278(199912)14:5<455::aid-tox2>3.0.co;2-8).
- Boucard Vazquez C., 1990. Etude de la reproduction chez les crevettes peneides. Nature et devenir de la masse vitelline. Aspects fondamentaux et appliqués. Thèse de Doctorat de Université de Caen, France, 171 pp.
- Boukari A., Hamoudi F.S. & Soltani N., 2021. Biochemical modification in an edible mollusk (*Donax trunculus*) during transplantation to a polluted environment. *Fresenius Environmental Bulletin*, 30: 2416–2422.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chandurvelan R., Marsden I., Gaw S. & Glover C.N., 2017. Acute and sub-chronic effects of sub-lethal cadmium exposure on energy metabolism in the freshwater shrimp *Paratya curvirostris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 135: 60–67. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.09.018>
- Darbre P.D., 2006. Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. *Journal of applied toxicology*, 26: 191–197. <https://doi.org/10.1002/jat.1135>
- Denslow N.D., Chow M.C., Kroll K.J. & Green L., 1999. Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogenmimics. *Ecotoxicology*, 8: 385–398.
- Drif F., Abdennou C., Boulakoud M.S. & Ounissi M., 2010. Trace metals in the mussel *Donax trunculus* of Annaba estuaries, Algeria. *Oceanography*, 6: 15–20.
- Fabiola G.A., Ibarra A.M., Rodríguez-Jaramillo M.D.C., García-Latorre E.A. & Vazquez-Boucard C., 2009. Quantification of vitellin/vitellogenin-like proteins in the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) as a tool to predict the degree of gonad maturity. *Aquaculture Research*, 40: 644–65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02138>.
- Fabre M.C., Descamps M. & Baert J.L., 1990. Identification and partial characterization of vitellin and vitellogenin from *Scolopendra cingulata* Latreille (Myriapoda Chilopoda). In: 8th International Conference on Myriapodology, pp. 117–121.
- Gabe M., 1968. Techniques histologiques. Masson et Cie Paris, 336: 764–768.
- Gagné F., Blaise C., Salazar M., Salazar S. & Hansen P.D., 2001. Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and physiology, Toxicology & Pharmacology*, 2: 213–225. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(00\)00189-7](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(00)00189-7). pmid:11239834
- Gagné F., Blaise C., Pellerin J. & 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. *Marine Environmental Research*, 3 : 295–310. [https://doi.org/10.1016/s0141-1136\(01\)00122-2](https://doi.org/10.1016/s0141-1136(01)00122-2). pmid:11939294
- George R., Martin G.D., Nair S.M. & Chandramohanakumar N., 2013. Biomonitoring of trace metal pollution using the bivalve molluscs, *Villorita cyprinoides*, from the Cochin backwaters. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185: 10317–10331. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3334-9>
- Hamdani A., Soltani N. & Zaid N., 2020. Growth and reproduction of *Donax trunculus* from the Gulf of Annaba (Northeast Algeria) in relation to environmental conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 27: 41656–41667.

- <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10103-9>
- Houma F., Bachari N., Bachouche S., Kassar A. & Belkessa R., 2011. Contribution à l'évaluation de la pollution des eaux marines sur la côte Ouest d'Alger en utilisant l'imagerie satellitale. Conférence Méditerranéenne Côtière et maritime, pp. 399–344.  
<https://doi.org/10.5150/cmcm.071>
- Järup L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68: 167–182.  
<https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>
- Jubeaux G., 2015. Développement de la mesure de la vitellogénine chez les invertébrés & utilisation de marqueurs de la perturbation endocrinienne chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*. Université de Lyon, 35 pp.
- 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 decussatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146: 415–430.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.05.002>
- Li Q., Osada M., Suzuki T. & Mori K., 1998. Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 $\beta$  on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 33: 87–93.  
<https://doi.org/10.1080/07924259.1998.9652345>
- Lumbreras C.J., Galante E. & Mena J., 1991. Ovarian Condition as an Indicator of the Phenology of *Bubas bubalus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 84: 190–194.  
<https://doi.org/10.1093/aesa/84.2.190>
- Marin M.G. & Matozzo V., 2004. Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 835–839.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.02.037>. PMID: 15111030
- Matozzo V. & Marin M.G., 2008. Can 17- $\beta$  estradiol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 26: 38–44.
- Merad I., Bellenger S., Hichami A., Khan N.A. & Soltani N., 2017. Effect of cadmium exposure on essential omega-3 fatty acids in the edible bivalve *Donax trunculus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 1–9.  
<http://doi.org/10.1007/s11356-017-9031-4>
- 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*, Izmir, Turkey: pp. 260–267.
- Merad I. & Soltani N., 2017. Toxicité aigüe du cadmium chez *Donax trunculus*: variation de la composition biochimique des gonades en fonction du sexe et de l'activité sexuelle au cours de l'exposition aigüe et de la dépuraction, 77 pp.
- 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: 2009–2016.  
<https://doi.org/10.1007/s10646-015-1536-3>
- Ortiz-Zarragoitia M. & Cajaraville M.P., 2006. Biomarkers of Exposure and Reproduction-Related Effects in Mussels Exposed to Endocrine Disruptors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50: 361–369.  
<https://doi.org/10.1007/s00244-005-1082-8>
- Paschoalini A.L., Savassi L.A., Arantes F.P., Rizzo E. & Bazzoli N., 2019. Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169: 539–550.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.047>
- Quinitio E.T. & Millamena O.M., 1992. Ovarian changes and female-specific protein levels during sexual maturation of the white shrimp *Penaeus indicus*. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 44: 7–12.
- Quinn B., Gagné F., Weber J.P. & Blaise C., 2005. Ecotoxicological effects of a semi-submerged municipal dump (Castle harbour, Bermuda) on the Calico scallop *Argopecten gibbus*. *Marine Pollution Bulletin*, 51: 534–544.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.0.019>
- Quinn B., Gagné F., Costello M., McKenzie C., Wilson J. & Mothersill C., 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology*, 66: 279–292.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.10.007>
- Rabei A., Hichami A., Beldi H., Bellenger S., Akhtar Khan N. & Soltani N., 2018. Fatty acid composition, enzyme activities and metallothioneins in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from polluted and reference sites in the Gulf of Annaba (Algeria): Pattern of recovery during transplantation. *Environmental Pollution*, 237: 900–907.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.041>
- Robinson F.E., 2002. Management for control of ovarian development in broiler breeders. *Avian Medicine*, 59: 1–7.
- Santovito G., Boldrin F. & Irato P., 2015. Metal and metallothionein distribution in different tissues of the Mediterranean clam *Venerupis philippinarum* during copper treatment and detoxification. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 174–175: 46–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.06.008>
- Schoenmakers H.J.N., Van Bohemen C.G. & Dieleman

- S.J., 1981. Effects of Effects of Oestradiol-17 p on the Ovaries of the Starfish *Asterias rubens*. Development, Growth & Differentiation, 23: 125–135.
- Senthamilselvan D., Chezian A. & Suresh E., 2016. Synergistic Effect of Nickel and Mercury on Fatty Acid Composition in the Muscle of Fish *Lates calcarifer*. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 11: 77-84.  
<https://doi.org/10.3923/jfas.2016.77.84>
- Silva A.J., 2017. Assessment of cadmium phytotoxicity alleviation by silicon using chlorophyll a fluorescence. Photosynthetica, 55: 648–654.  
<https://doi.org/doi:10.1007/s11099-016-0680-1>.
- Singh P.P. & Gupta S.M., 2021. Molluscs as biomonitors of heavy metal pollution: a review. Journal of Advanced Scientific Research, 1: 35–42.
- Shi Z., Yang S., Han D., Zhou Z., Li X., Liu Y. & Zhang B., 2018. Silicon alleviates cadmium toxicity in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) by reducing cadmium ion uptake and enhancing antioxidative capacity. Environmental Science and Pollution Research, 25: 7638–7646.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-1077-9>
- Vercauteren K. & Blust R., 1999. Uptake of cadmium and zinc by the mussel *Mytilus edulis* and inhibition by calcium channel and metabolic blockers. Marine Biology, 135: 615–626.  
<https://doi.org/10.1007/s002270050662>
- Wahli W., Dawid I.B., Ryffel G.U. & Weber R., 1981. Vitellogenesis and the vitellogenin gene family. Science, 212: 298–304.
- Xie Y., Hu L., Du Z., Sun X., Amombo E., Fan J. & Fu J., 2014. Effects of Cadmium Exposure on Growth and Metabolic Profile of Bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.].  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115279>.
- Yap C.K., Sharifinia M., Cheng W.H., Al-Shami S.A., Wong K.W. & Al-Mutairi K.A., 2021. A Commentary on the Use of Bivalve Mollusks in Monitoring Metal Pollution Levels. International journal of environmental research and public health, 18: 3386.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph18073386>.
- Zheng S., Chen B., Wang Z., Qiu X., Yu X., Freestone D., Liu Z., Huang H., Yu W. & Xu X., 2010. Reproductive toxic effects of sublethal cadmium on the marine polychaete *Perinereis nuntia*. Ecotoxicology Environmental Safety, 73: 1196–1201.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.05.022>
- Zorita I., Ortiz-Zarragoitia M., Soto M. & Cajaraville M.P., 2006. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. Aquatic Toxicology, 78: 109–116.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.032>

