

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	1
2. MATERIEL ET METHODES	7
2.1. Présentation de <i>Donax trunculus</i>	7
2.1.1. Caractéristiques et anatomie.....	7
2.2. Ecologie, comportement et distribution de <i>D. trunculus</i>	9
2.3. Biologie	12
2.3.1. Nutrition.....	12
2.3.2. Reproduction et développement.....	12
2.4. Technique d'échantillonnage de <i>D. trunculus</i> et élevage	14
2.5. Présentation du site de prélèvement	16
2.6. Présentation du cadmium et traitement	16
2.6.1. Présentation du cadmium.....	16
2.6.2. Traitement.....	17
2.7. Tests de toxicité	18
2.8. Dissection et prélèvement du tissu	20
2.9. Dosage des biomarqueurs	20
2.9.1. Dosage de l'acétylcholinestérase.....	20
2.9.2. Dosage de la glutathion S-transférase.....	21
2.9.3. Dosage de la catalase.....	22
2.9.4. Dosage des protéines.....	23
2.10. Extraction et dosage du cadmium dans les tissus de <i>D. trunculus</i>	24
2.10.1. Principe de la spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA).....	25
2.10.2. Préparation des étalons.....	27
2.11. Analyse statistique	27
2.11.1. Analyse univariée.....	27
2.11.2. Régression linéaire.....	28
3. RESULTATS	29
3.1. Toxicité aigüe du cadmium	29
3.1.1. Effet du cadmium sur le taux de mortalité après 24 h d'exposition.....	29
3.1.2. Effet du cadmium sur le taux de mortalité après 48 h d'exposition.....	33
3.1.3. Effet du cadmium sur le taux de mortalité après 72 h d'exposition.....	37
3.1.4. Effet du cadmium sur le taux de mortalité après 96 h d'exposition.....	41

3.2. Effet du cadmium sur les biomarqueurs durant l'exposition aigue et la restauration	
3.2.1. Activité de l'acétylcholinestérase.....	46
3.2.2. Activité de la glutathion S-transférase.....	50
3.2.3. Activité de la catalase.....	54
3.3. Concentrations du cadmium dans les tissus de <i>D. trunculus</i> durant l'exposition aigue et la dépuraton	58
4. DISCUSSION	60
4.1. Toxicité aigüe du cadmium	60
4.2. Effet du cadmium sur les biomarqueurs du stress environnemental	61
4.2.1. Activité de l'acétylcholinestérase.....	61
4.2.2. Activité de la glutathion S-transférase.....	64
4.2.3. Activité de la catalase.....	66
4.3. Bioaccumulation du cadmium et dépuraton	68
5. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	73
6. RESUMES	75
6.1. Français.....	75
6.2. Anglais.....	76
6.3. Arabe.....	77
7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	78
8. ANNEXES	
ANNEXE 1 : Production scientifique	100
ANNEXE 2 : Publications	

INTRODUCTION GENERALE

1. INTRODUCTION

Depuis le début du siècle, l'environnement a été soumis à la pression croissante des activités humaines dont les effets se sont fait rapidement sentir. Le fort développement de la technologie et l'important essor industriel ont donné de nouvelles dimensions aux risques de d'intoxication et aujourd'hui le nombre de populations exposées aux contaminants environnementaux ne cesse d'augmenter. Le nombre de nouveaux produits chimiques synthétisés qui viennent s'ajouter chaque année aux plus de 2 millions de substances déjà répertoriées et plus de 100 00 substances sont commercialisées ont la plupart se retrouvent dans l'environnement à la fin de leur cycle de vie (Depldege & Fossi 1994).

La pollution de l'environnement par les substances toxiques telles que les métaux lourds, composés organochlorés (PCB, pesticides chlorés) et les hydrocarbures polyaromatiques (chrysène, phénanthrène), est un problème qui touche tous les pays du monde. Les effets de la pollution sur les écosystèmes marins et sur la santé humaine peuvent parfois se faire sentir très loin de la source de pollution (Johnson, 2008). Les métaux lourds sont présents dans le milieu marin de façon naturelle et certains sont mêmes essentiels au bon fonctionnement de nombreux processus biologiques. Cependant, de trop grandes concentrations de ces métaux, principalement des métaux dits non-essentiels, peuvent s'avérer toxiques pour les organismes aquatiques (Daby, 2006). Les activités anthropiques sont autant de sources ayant contribué à l'augmentation des concentrations de métaux lourds dans le milieu marin et surtout en zone côtière (Kaiser, 2004). En effet, les concentrations corporelles en contaminants peuvent être utilisées pour en évaluer leur absorption par les organismes vivants et l'augmentation de la concentration d'un polluant depuis l'environnement vers l'organisme (bioaccumulation) où certains tissus vont avoir un rôle prépondérant, en séquestrant de façon préférentielle le polluant. Les métaux lourds s'accumulent dans les organismes et tout au long de la chaîne alimentaire à des concentrations causant de profonds bouleversements dans la diversité et la structure des communautés biologiques (Boening, 1999). C'est pourquoi, l'évaluation des quantités de métaux lourds présents dans les écosystèmes et dans les organismes est une préoccupation majeure des chercheurs en écotoxicologie (Huang *et al.*, 2007). Toutefois, l'étude de la bioaccumulation des métaux lourds au niveau des organismes exposés constitue un moyen important pour l'évaluation de la pollution métallique (Lagadic *et al.*, 1997). L'accumulation des métaux chez les organismes est souvent un meilleur indicateur de la toxicité de ces composés par rapport à la détermination de leur concentration dans le milieu même, car les variations de leur biodisponibilité sont obligatoirement prises en compte (Connell *et al.*, 1999 ; Borgmann, 2000).

Avec l'essor industriel, agricole et urbain des pays développés, les polluants issus des activités anthropiques exercent une pression croissante sur l'environnement, et notamment sur les écosystèmes marins (Smolders *et al.*, 2003 ; Rao *et al.*, 2007 ; D'adamo *et al.*, 2008). Les contaminants rejetés dans l'environnement finissent par se retrouver plus ou moins rapidement dans les milieux aquatiques, en particulier estuariens et côtiers, où ils peuvent avoir des effets à court et à long terme (Burton, 1992). Ils altèrent les communautés et affectent les organismes qui les composent (Boening, 1999; Viaroli *et al.*, 2005; Warwick, 2005).

Les écosystèmes aquatiques représentent d'importants réservoirs de polluants qui se répartissent au niveau des différents compartiments (eau, substrat et organismes) (Aarab, 2004). Les substances toxiques peuvent exercer leurs effets négatifs même à de très faibles concentrations et présenter souvent une grande variabilité à se concentrer. Ceci complique l'évaluation des quantités rejetées et de leurs impacts sur les écosystèmes. Pour ces raisons, un grand nombre d'intervenants du milieu marin (scientifiques, gestionnaires, agences gouvernementales) s'intéressent au développement de différents moyens permettant de mesurer les effets de la pollution urbaine, industrielle et agricole sur les écosystèmes marins (Burger, 2006).

L'écotoxicologie s'est développée au début des années 60 quand se sont manifestés les effets de la contamination de l'environnement par des produits polluants d'origine industrielle ou agricole. Cette discipline évalue les effets des perturbations physiques et chimiques sur les êtres vivants, les voies de transfert des contaminants, et leur action sur l'environnement (Truhaut, 1977), ainsi que les effets néfastes que peuvent avoir les polluants sur la santé humaine (Arapis, 2005). La prise de conscience actuelle suite aux problèmes liés à la croissance industrielle et à la pollution provoquée par le développement économique a engendré une demande sociale en faveur de la préservation et de la restauration des écosystèmes. Le recours à des méthodes basées sur des observations qualitatives et/ou quantitatives des organismes vivants dans les milieux naturels est rapidement apparu comme un moyen potentiel de pallier les insuffisances des méthodes d'analyses chimiques. Ainsi, dès le début du 20^{ème} siècle, les organismes aquatiques ont été utilisés comme indicateur de la qualité de l'eau (Lagadic *et al.*, 1998). D'où le nom de bioindicateur défini comme espèces ou groupes d'espèces qui, par leur présence et/ou leur abondance, nous donne des informations de nature qualitative sur l'état d'un environnement ou d'une partie de celui-ci (Kaiser, 2001; Markert *et al.*, 2003). Ils sont des moyens de plus en plus répandus et privilégiés par de nombreuses organisations internationales et sont utilisés, entre autres, par des agences gouvernementales afin d'établir des paramètres légaux pour certaines variables environnementales et d'assurer un suivi de la qualité de l'environnement (Sammarco *et al.*, 2007). En effet, la détection de certains polluants par les organismes

bioaccumulateurs facilite leur mise en évidence et leur quantification par des méthodes chimiques et/ou physiques (Amiard *et al.*, 1989). De plus, les espèces bioaccumulatrices retenues comme bioindicateurs sont en général des espèces sessiles, abondantes, relativement résistantes aux toxiques et d'une durée de vie suffisante ce qui leur confère une capacité d'intégration des variations de la qualité du milieu (Amiard *et al.*, 1989).

En raison de leur importance écologique, de leur mode de vie sédentaire, de leur répartition, de leur longévité, de leur abondance et de leur facilité à être collectés, les Mollusques, et plus particulièrement les Bivalves, sont les indicateurs les plus fréquemment utilisés dans les programmes d'évaluation de la qualité de l'environnement marin (Huang *et al.*, 2006 ; Espinosa *et al.*, 2007) et sont d'une grande utilité dans les programmes de biosurveillance des métaux lourds (Zhao *et al.*, 2005 ; Huang *et al.*, 2007). Ces caractéristiques les rendent sensibles aux perturbations extérieures affectant le milieu dans lequel ils vivent (Fränzel, 2003). En tant que filtreurs, les bivalves accumulent les métaux lourds présents dans le milieu marin à partir de trois principales formes différentes : la forme dissoute contenue dans l'eau filtrée, la forme organique contenue dans la nourriture ingérée et la forme inorganique particulaire en suspension dans la colonne d'eau (Huang *et al.*, 2007). Ils sont bien indiqués pour surveiller la concentration des métaux traces dans de nombreuses régions du monde (Neuberger-Cywia *et al.*, 2003).

La surveillance de la qualité des écosystèmes repose en grande partie sur l'évaluation de l'impact toxicologique des polluants grâce à des méthodes simples et fiables, spécifiquement adaptées à l'étude des effets des xénobiotiques sur les organismes vivants et sur leur environnement (Bouraoui *et al.*, 2009). Dans ce contexte, au début des années 80, la notion de biomarqueur est apparue ; c'est un paramètre biologique observable à un niveau inférieur à celui de l'organisme entier et qui permet d'obtenir des informations quant au degré d'exposition présent ou passé et à l'effet d'un contaminant sur un organisme (Stagg, 1998 ; Key *et al.*, 2006). Il peut s'agir de paramètres génétiques, enzymatiques, physiologiques, morphologiques, moléculaires, cellulaires, biochimiques (Kaiser, 2001; Markert *et al.*, 2003). Les biomarqueurs ont été largement utilisés dans le cadre des programmes de surveillance de la qualité de l'environnement (McCarthy & Shugart, 1990 ; Peakall, 1992) ; leur utilisation permettrait vraisemblablement une évaluation réaliste et fiable des effets des polluants sur les écosystèmes (Lagadic *et al.*, 1997). Le choix d'un biomarqueur est surtout déterminé par sa pertinence et par son efficacité à apporter une réponse claire et mesurable. Les différents travaux scientifiques réalisés ont permis de classer les biomarqueurs en trois catégories selon les événements toxicologiques : les biomarqueurs d'exposition, d'effets et de sensibilité/susceptibilité (Lagadic *et al.*, 1997 ; Van der Oost *et al.*, 2003).

La côte algérienne s'étend sur 1280 km. La zone littorale représente 1,9 % de la superficie globale du pays, qui compte à elle seule près de 40 % de la population totale (Grimes *et al.*, 2004). La quasi-totalité des activités socio-économiques sont concentrées le long des côtes. Elle est liée à grandes agglomérations urbaines (Alger, Oran, Annaba) et aux grands pôles industriels (Oran, Arzew, Alger, Skikda, Annaba). Les franges côtières sont généralement fortement urbanisées et industrialisées, et par conséquent, soumises à des rejets en métaux lourds d'origine anthropique parfois importants (Guillemet, 1988). La pollution de ces zones côtières par des substances chimiques diverses peut avoir des conséquences graves sur la qualité des eaux marines et l'équilibre écologique (Ounissi *et al.*, 1998 ; Gouiez *et al.*, 2006 ; Ounissi, 2007). Le golfe d'Annaba est la plus importante zone touristique et économique côtière située à l'Est de l'Algérie. La situation de cette région s'est détériorée en raison de la croissance démographique et de l'installation de grandes activités industrielles liées à une importante activité socio-économique (urbanisme, agriculture, pêche, industrie, tourisme). Ces activités ont engendré une multitude de substances synthétiques et étrangères aux mécanismes biologiques susceptibles de porter préjudice à l'écosystème marin et au cadre de vie des habitants de la région. C'est ainsi que plusieurs travaux ont montré la richesse des rejets en certains métaux traces toxiques particulièrement le cadmium (Semadi & Deruelle, 1993 ; Abdennour *et al.*, 2004 ; Beldi *et al.*, 2006).

Donax trunculus L. est un Mollusque Bivalve comestible et très abondant dans le golfe d'Annaba, il a été utilisé pendant de nombreuses années comme espèce bioindicatrice de la pollution (Beldi *et al.*, 2006 ; Sifi *et al.*, 2007 ; 2013 ; Amira *et al.*, 2011 ; Soltani *et al.*, 2012 ; Belabed & Soltani, 2013). La croissance et la dynamique de la population (Beldi, 2007) ainsi que le cycle reproducteur (Hamdani & Soltani-Mazouni, 2011) ont été précisés dans cette région. Il est également largement utilisé comme espèce sentinelle pour estimer la qualité des écosystèmes côtiers dans d'autres pays (Roméo & Gnassia-Barelli, 1988; Fishelson *et al.*, 1999; Moukrim *et al.*, 2004; Neuberger-Cywiak *et al.*, 2007; Tlili *et al.*, 2010). En Algérie, la distribution de *D. trunculus* a été décrite par Vaissière & Fredj (1963) lors d'une série de dragage effectué le long des côtes, et la biologie, l'écologie et la reproduction de cette espèce ont été étudiées au niveau des côtes algéroises (Mouëza, 1971 ; Mouëza & Frenkiel-Renaut, 1973). *D. trunculus* peut survivre dans des eaux polluées quand d'autres bivalves ne s'y trouvent plus (Fishelson *et al.*, 1999).

Le cadmium, est un polluant placé sur la liste noire de la plus part des conventions internationales de pollution selon sa cytotoxicité, génotoxicité, son potentiel de bioaccumulation et sa persistance (Taylor, 1983), élément métallique non-biodégradable et cumulatif pouvant altérer divers niveaux trophiques en milieu aquatique (Sorensen, 1991). Le Cd est l'un des métaux les plus toxiques (Luna

et al., 2010). Cependant, il est hautement réactif engendrant la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) conduisant au développement d'un stress oxydatif (Siedlecka & Krupa, 2002). En effet, le Cd est connu pour affecter directement le système de défense cellulaire (Ercal *et al.*, 2001). Des études sur l'accumulation du cadmium chez les bivalves marins ont montré la relation qui existe entre l'accumulation du cadmium dans l'organisme et sa concentration dans le milieu (Erk *et al.*, 2005). Ceci est dû à la prise de métal qui, chez la plupart des Mollusques, est plus rapide que leur élimination d'où une accumulation qui s'effectue souvent proportionnellement à la concentration extérieure (Langston *et al.*, 1995).

Les Mollusques Bivalves peuvent survivre dans des milieux fortement contaminés par les métaux lourds (Jeantet *et al.*, 1985 ; Phillips, 1990). Cette adaptation génétique ou physiologique implique le développement de mécanismes de détoxification. De ce fait, différents biomarqueurs ont été développés tels que l'AChE (biomarqueurs de neurotoxicité) et les enzymes de détoxification (cytochrome P450, la glutathion S-transferase (GST), superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), Métallothioneines (Mts)...). Ces enzymes augmentent l'hydrosolubilité des molécules qu'ils prennent en charge afin de faciliter leur transformation et leur élimination. Les réactions de biotransformation sont assurées par trois types d'enzymes : 1/les enzymes de la phase I sont dites enzymes de fonctionnalisation. Cette phase fait intervenir essentiellement les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP) ; 2/ les enzymes de la phase II sont dites de conjugaison. Il s'agit d'un ajout d'un radical hydrophile sur le composé brut ou sur le métabolite résultant de la réaction I (Goksoyr & Förlin, 1992). Parmi ces enzymes la glutathion S-transférase ; et 3/ la réaction III implique des enzymes d'excrétion qui sont souvent des glycoprotéines membranaires capables d'expulser hors de la cellule un xénobiotique modifié par les enzymes de la phase I et/ou de la phase II (Parant, 1998 ; Aït-Aïssa, 2003).

La complexité du métabolisme des polluants chimiques et des mécanismes de détoxification chez les organismes marins incite à mettre en place un programme de recherche afin d'évaluer l'état de santé de la baie d'Annaba et diminuer les incertitudes dans le processus de gestion du risque. La présente étude est en continuité avec les travaux antérieurs réalisés dans ce cadre (Aoudene, 2003 ; Chouahda, 2006; Tayaa, 2007 ; Hamdani, 2007 ; 2013 ; Beldi, 2007 ; Amira, 2008 ; Sifi, 2009). Dans un premier temps, nous avons déterminé en conditions contrôlées au laboratoire la toxicité aiguë du Cd à l'égard de *D. trunculus* après 24, 48, 72 et 96 h d'exposition en estimant les concentrations létales 50 (CL₅₀) et 90 (CL₉₀) en période de reproduction (sexe non séparé). Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'impact du Cd sur l'activité de trois biomarqueurs du stress environnemental : l'acétylcholinestérase (AChE), la catalase (CAT) et la glutathion S-transférase

(GST) chez les individus de *D. trunculus* traités à la CL₅₀-96 h durant une période d'exposition de 96 h suivie d'une période de restauration pendant 96 h (transfert des individus traités dans une eau non contaminée). Enfin, dans une dernière partie, nous nous proposons, d'analyser la bioaccumulation du Cd dans le corps de *D. trunculus* en utilisant deux concentrations CL₂₅-96 h et CL₅₀-96 h. Celle-ci a été étudiée au cours d'une période d'exposition de 48 et 96 h et d'une période de restauration de 96 h.

MATERIEL & METHODES

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Présentation de *Donax trunculus*

2.1.1. Caractéristiques et anatomie

Donax trunculus (Linnaeus, 1758) appartient à la famille des Donacidae ; c'est un Mollusque Bivalve marin à symétrie bilatérale qui est connu sous l'appellation commerciale «olive de mer» et est plus généralement désigné par le terme «telline». Selon les régions, il est aussi appelé « haricot de mer ». Comestible (Veloso *et al.*, 1953; Penchaszadeh & Olivier, 1975), il constitue une ressource commerciale importante dans beaucoup de pays (McLachlan, 1996).



Figure 1. Phénotype (A) de *Donax trunculus* (<http://www.filosofia.tk>) et Morphologie de la coquille (B) (<http://www.marevita.org>).

La telline présente un corps mou protégé par une coquille, composée de deux valves, calcifiées, solides, peu renflées, allongées, triangulaires et inéquilatérales, fermées par contraction des muscles adducteurs qui s'insèrent chacun sur la face interne des deux valves où leur empreinte est généralement visible (Bougis, 1976; Grimes, 1994), avec la partie postérieure des valves plus courte que l'antérieure (Poutier, 1978).

La coloration externe des valves varie du blanc-jaunâtre au brunâtre et uniforme extérieurement, ou variablement ornée de bandes concentriques et (ou) de rayons plus ou moins violacées. Quant à la coloration interne, elle peut être entièrement blanche ou être plus ou moins maculée de violet ou de brunâtre. La taille maximale des individus peut atteindre 5 cm (Fischer *et al.*, 1987).

Donax trunculus est une espèce caractérisée par un corps acéphale mou, non segmenté, comprimé latéralement, il est enveloppé par un manteau constitué d'épithélium associé à des fibres musculaires, les deux lobes du manteau délimitent la cavité palléale où s'épanouissent les branchies et qui sécrètent et supportent chacune des deux valves. Ces lobes palléaux, fusionnés dorsalement entre eux et avec la masse viscérale délimitant ventralement une vaste cavité palléale interne en communication avec le milieu extérieur; ils sont étroitement attachés aux valves le long d'une ligne palléale. Les bords externes du manteau sont parfois plus ou moins soudés, formant vers l'arrière deux siphons permettant l'entrée de l'eau dans la cavité palléale (siphon inhalant) ou son rejet vers l'extérieur (siphon exhalant). Le pied, organe très développé, musculueux ventral mobile et turgescant, enfoncé comme coin, constitue un solide point d'ancrage pour l'animal (Mouëza, 1971), permet la locomotion et le fouissage (Fischer *et al.*, 1987). Les branchies sont de type eulamellibranche, tapissées de cils vibratiles, créent une circulation de l'eau depuis le milieu extérieur vers la cavité palléale, qui entraîne les éléments nutritifs et l'oxygène. La charnière est munie de deux petites dents cardinales et des dents latérales à chaque valve. Les gonades sont situées au dessus du pied et ne sont visibles qu'après sacrifice de l'animal (Lucas, 1965).

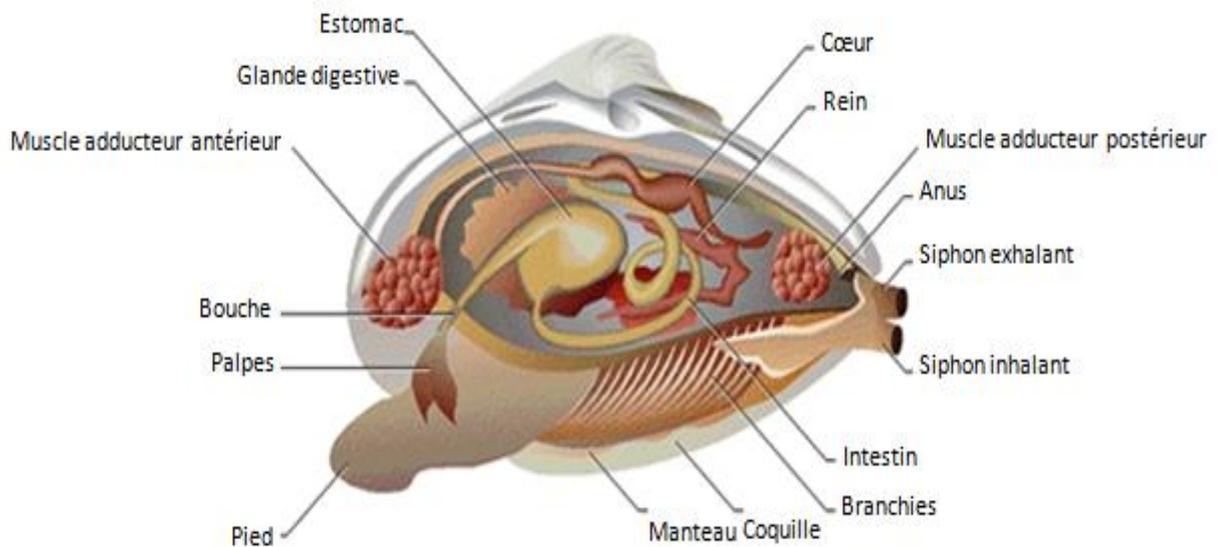


Figure 2. Anatomie générale d'un Mollusque Bivalve.

Plusieurs classifications des Mollusques Bivalves existent, selon que les auteurs tiennent compte de la forme de la coquille, de celle de la charnière ou de la structure des branchies.

La position systématique de *D. trunculus* selon la dernière classification d'après la source d'inventaire national du patrimoine naturel de France (MNHN, 2006) est la suivante :

Embranchement	Mollusca
Classe	Bivalvia
Sous-classe	Eulamellibranchia
Ordre	Veneroida
Super- ordre	Heterodonta
Super- famille	Tellinoidea
Famille	Donacidae
Genre	<i>Donax</i>
Espèce	<i>trunculus</i> (Linnaeus, 1758)

2.2. Ecologie, comportement et distribution de *D. trunculus*

La croissance de la telline n'est pas continue ni homogène ; ceci dépend de l'activité métabolique et de la saison de recrutement en plus des conditions climatiques. Elle est rapide au printemps et en été et lente voire arrêtée vers la fin de l'automne et de l'hiver (Marobin *et al.*, 2007). D'après Ramon *et al.* (1995) la croissance des jeunes individus s'effectue à vitesse différente selon la période de recrutement. Cette complication s'ajoute au fait que la vitesse de croissance des individus semble varier aussi avec l'aire géographique ; en Algérie, les populations atteignent la longueur de 23 mm à la fin de leur première année et 32 mm à la fin de deuxième année (Mouëza, 1972). Des études menées sur la côte atlantique de l'Espagne révèlent les mêmes tendances (Costa *et al.*, 1987 ; La Valle, 2005). Bodoy (1982) observe une longueur de 9 mm à 1 an, de 25,6 mm à 2 ans et de 32 mm à 3 ans. La définition de l'âge des Mollusques par la méthode de comptage des stries ne semble pas si aisée avec cette espèce (Ramon *et al.*, 1995), d'autant plus que l'apparition des stries est fonction de la saison et de l'activité métabolique de l'individu. Les stries au niveau de la coquille apparaissent principalement avec un ralentissement voire un arrêt de la croissance notamment au cours de la saison hivernale mais en méditerranée, les tellines auraient une strie en plus de celles de la côte atlantique qui correspondrait à la saison estivale avec une forte élévation de la température de l'eau (Ramon *et al.*, 1995).

Les communautés atlantiques et méditerranéennes diffèrent également par leur longévité et leur longueur maximale. La durée de vie augmenterait avec la latitude ; les individus atteindraient 40 mm en Atlantique pour une longévité maximale de 5 ans, alors qu'en Méditerranée, elle serait d'environ 34 mm pour une longévité de 3 ans (Ben Kheder Dhaoui, 2001). Amouroux (1974) et Ben Kheder Dhaoui (2001) observent le long des côtes du Roussillon, que les populations de *D. trunculus* sont rencontrées dans les hauts niveaux très instables, avec une densité de 40 individus/m² dans les fonds de 1 m avec une densité plus faible de l'ordre de 20 individus/m² à une profondeur de 2,50 m. En Algérie, les densités sont de l'ordre de 150 à 550 individus/m² (Mouëza, 1972 ; Beldi, 2007). Par contre, en Italie les densités révélées sont moindres, la densité moyenne étant de 11,9 individus/m² (La Valle, 2005). Ces valeurs coïncident avec celles obtenues en mer adriatique, des abondances comprises entre 0,97 et 15,39 individus/m² (Mariani *et al.*, 1998).

Les Bivalves du genre *Donax* sont d'importants constituants de la macrofaune superficielle des plages de sable fin (Ansell, 1983). La telline vit en zone côtière, enfouie dans les sédiments. Elle est ancrée dans le sédiment à l'aide de son pied turgescent, ses siphons affleurant à la surface du sable (figure 3), elle préfère un range granulométrique plutôt ample mais compris entre 125 et 250 µm. Cette espèce habite les environnements fortement énergiques sur les plages sablonneuses où elle est exposée aux rythmes de marée, à l'action intense de vague et à l'instabilité de sédiment (Brown & McLachlan, 1990). Dans ces environnements, les populations de *D. trunculus* sont capables d'atteindre des très fortes densités (Gaspar *et al.*, 1999 ; Wilson, 1999). En effet, cette espèce fouisseuse, présente une grande capacité de résistance aux variations des facteurs physico-chimiques du milieu dans la mesure où ces variations ne sont pas trop brutales (Marobin *et al.*, 2007). Dans le golfe d'Annaba, la présence abondante de *D. trunculus* est signalée sur un sédiment de sable fin terrigène entre 5 et 7 m, et sur un fond vaseux de 20 m (Degiovanni & Mouëza, 1972). Beldi (2007) observe que *D. trunculus* colonise les plages d'Annaba à sable fin et moyen dans les sites de Sidi Salem et El-Battah.

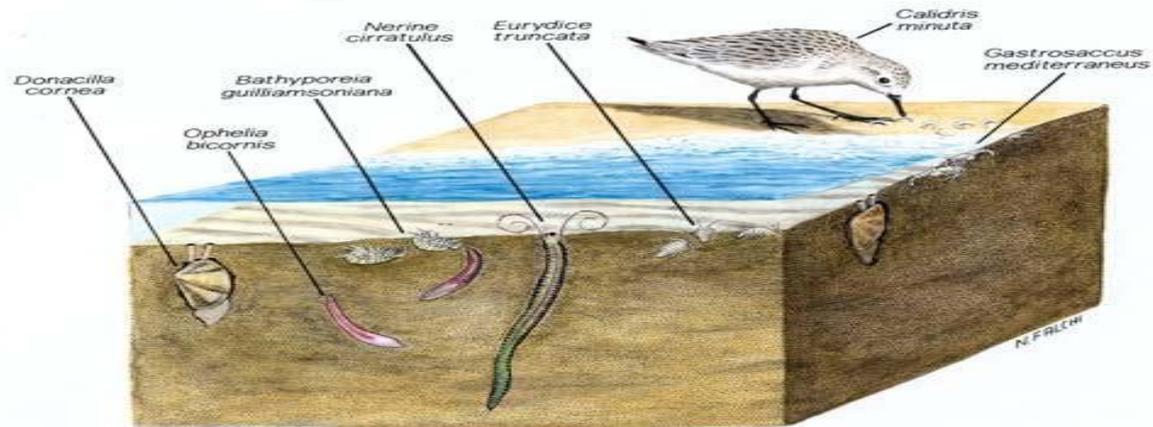


Figure 3. Localisation de *D. trunculus* dans son biotope (La Valle, 2005).

D. trunculus (Linnaeus, 1758) est une espèce atlantico-méditerranéenne (Ansell & Lagardère, 1980) qui domine la macrofaune des plages de sables fins. Sa distribution géographique s'étend des côtes atlantiques françaises (Guillou & Le Moal, 1980) aux côtes sénégalaises (Fischer *et al.*, 1987), et est largement répandue en Méditerranée (Bayed, 1991). Elle est typiquement intertidale en atlantique et limitée à l'infra-littoral superficiel en méditerranée (Amouroux, 1974 ; Salas, 1987). La distribution bathymétrique de *D. trunculus* semble changer avec l'air géographique ; en Méditerranée, en mer Adriatique, les tellines se trouvent surtout entre 0 et 2 m de profondeur (Mariani *et al.*, 1998 ; Manca Zeichen *et al.*, 2002 ; La Valle, 2005). En Espagne, l'espèce est distribuée jusqu'à 8 m de profondeur mais il est préférentiellement distribuée entre 0 –2 m (Salas, 1987 ; La Valle, 2005 ; Ramon *et al.*, 1995). En Israël, l'espèce ne se trouve pas en dessous de 1,60 m de profondeur (Neuberger-Cywiak *et al.*, 1990). La répartition des tellines se fait selon un gradient croissant de taille lorsqu'en va vers les niveaux les plus bas. Des études en Atlantique (Ansell & Lagardère, 1980 ; Thebaud *et al.*, 2005), et en Méditerranée sur la côte adriatique de l'Italie (Manca Zeichen, 2002 ; La Valle, 2005), ont montré que les larves de *D. trunculus* sont poussées par l'hydrodynamisme vers les zones moins profondes. En grandissant, elles acquièrent une capacité de déplacement qui leur permet de migrer vers les parties plus profondes en diminuant ainsi leur densité. Les individus juvéniles de 2 à 5 mm s'installent dans des profondeurs plus importantes allant jusqu'à 5 m. Ces derniers se distribuent progressivement au cours de leur croissance une profondeur de 1 m où ils vivraient à l'état adulte.

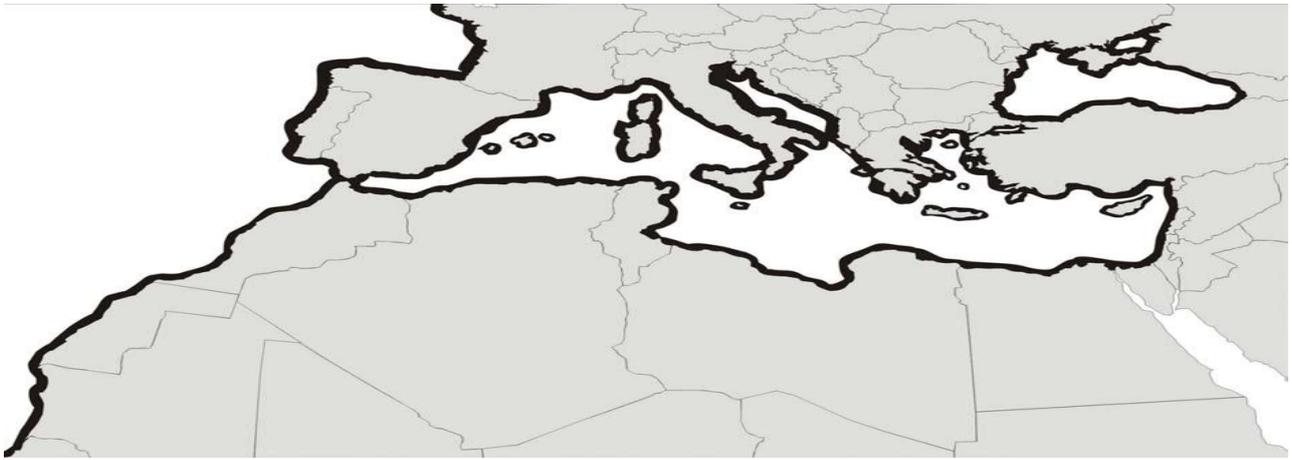


Figure 4. Distribution géographique de *Donax trunculus* (La Valle, 2005).

2.3. Biologie

2.3.1. Nutrition

Les tellines sont des organismes ayant une éthologie alimentaire de type suspensivore, se nourrissant de phytoplancton (Mouëza & Chessel, 1976), la structure des siphons (Mouëza & Frenkiel, 1973) a montré que *D. trunculus* filtre ainsi les particules de matière organique en suspension les plus fines. Ce taxon colonise les zones de déferlement des vagues (Degiovanni & Mouëza, 1972), là où l'hydrodynamisme favorise la présence des particules en suspension empêchant la sédimentation rapide de la matière organique. Les particules nutritives sont acheminées vers la bouche tandis que les particules non sélectionnées sont éliminées sous forme de pseudo-fécès par le siphon exhalant. Dans le golfe d'Annaba les charges en matières en suspension sont importantes de l'ordre de 15 mg/L à 35 mg/L (Beldi, 2007) riche en phytoplancton (Frehi *et al.*, 2004). Les individus de *D. trunculus* sont généralement les consommateurs fondamentaux dans les communautés inférieures molles, alors qu'ils sont à leur tour le sujet à la prédation par une grande variété d'invertébrés, poissons, oiseaux et mammifères (Luzzatto & Penchaszadeh, 2001 ; Peterson *et al.*, 2000 ; Salas *et al.*, 2001).

2.3.2. Reproduction et développement

D. trunculus est une espèce gonochorique (Fisher *et al.*, 1987). Les sexes peuvent se distinguer selon la couleur de la gonade durant la période d'activité sexuelle: violette chez les femelles à produit sexuel bleu granuleux, jaunâtre ou blanche chez les mâles à produit sexuel blanc et visqueux (Gaspar *et al.*, 1999). Il devient reproducteur à une taille de 15 à 16 mm (Rarnon, 1993). La fécondation est externe, les gamètes sont expulsés dans le milieu extérieur à travers le siphon exhalant. Les œufs donnent naissance à des larves véligères (organismes planctoniques de quelques dixièmes de

millimètres), munies d'une couronne de cils vibratiles (le velum) et d'une coquille embryonnaire. La larve dérive pendant quelques semaines au gré des courants. Lorsqu'elle est entraînée vers des fonds propices à son développement, elle se fixe sur le substrat et entame sa métamorphose jusqu'au stade juvénile. Seule une petite fraction des larves produites trouvera un substrat pour s'installer (Carriker, 1961 ; Kennedy, 1996). Selon l'espèce, le type de fond propice à la fixation est soit du sédiment meuble (sables vaseux à grossiers) soit un substrat dur (rochers, coquilles de bivalves). Une fois fixé, l'animal ne quitte plus son site de fixation, le velum se résorbe, la plupart des tissus et des organes se réorganisent donnant l'adulte avec un cœur, des reins, des branchies, des gonades...

Le cycle de reproduction est déclenché par des variations brutales de la température et/ou de la salinité ; il peut aussi être déclenchée par d'autre facteur tels que le bloom phytoplanctonique ou la présence dans le l'eau de gamètes d'individus de la même espèce (Goulletquer, 1997). La période d'activité sexuelle présente une période de repos durant l'automne et l'hiver et une période d'activité qui débute au printemps et qui se termine en été (Mouëza, 1971; Aouadene, 2003 ; Amira, 2008 ; Hamdani & Soltani-Mazouni, 2011 ; Hamdani, 2013). D'après Neuberger-Cywiak *et al.* (1990) *D. trunculus* se reproduisent à la fin de l'été, et pendant les mois à partir de septembre à novembre, le pourcentage des individus juvéniles dans la population augmente considérablement. La période de reproduction de *D. trunculus* présente des variations au sein de son aire de répartition ; en méditerranée, le recrutement est bimodale (Ansell & Bodo, 1979 ; Mouëza *et al.*, 1973 ; Ansell, 1983 ; La Valle, 2005 ; Ramon *et al.*, 1995 ; Beldi, 2007) alors qu'en Atlantique, il n'a lieu qu'une seul fois dans l'année.

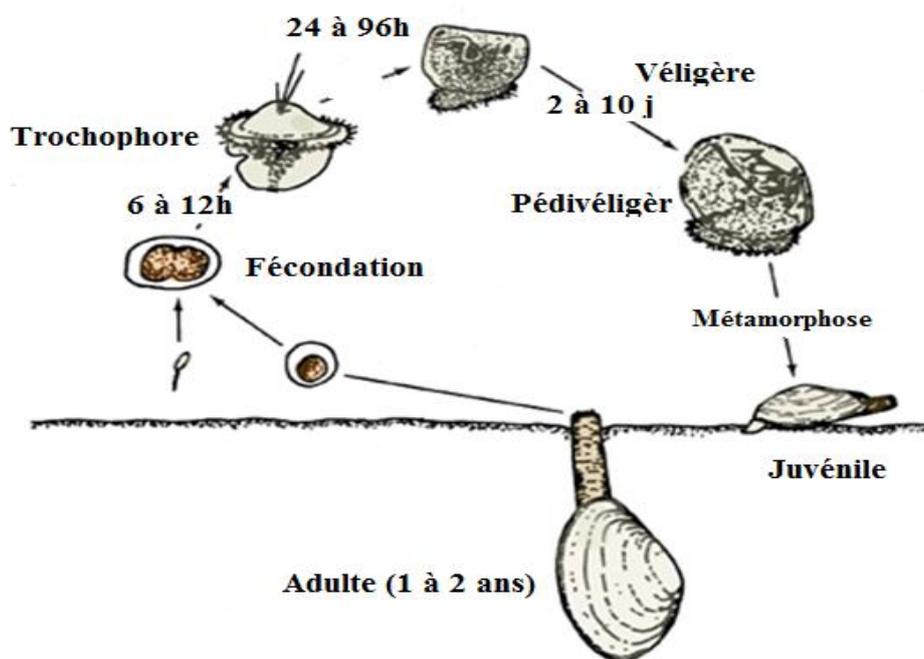


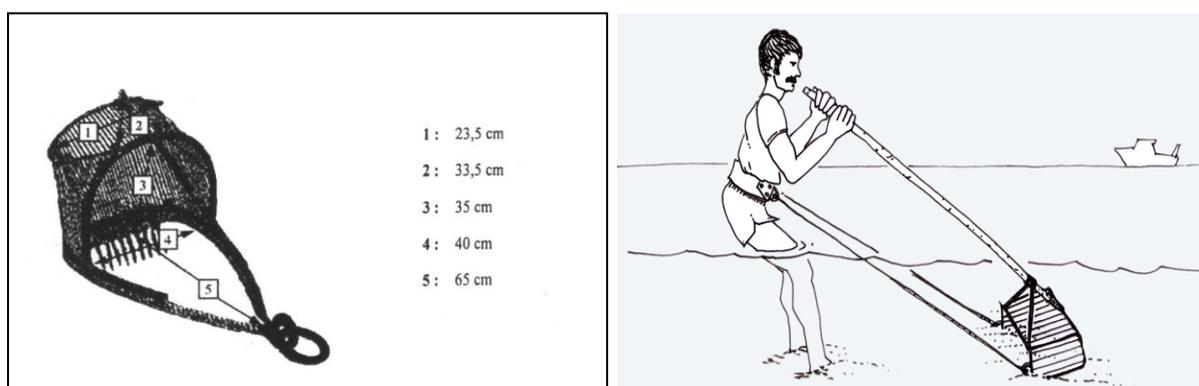
Figure 5. Cycle biologique d'un Mollusque Bivalve (<http://www.asnailsodyssey.com>).

2.4. Technique d'échantillonnage de *D. trunculus* et élevage

Les pêcheurs pratiquent une pêche artisanale à pied à l'aide d'un râteau à main "cope". Ce dernier est utilisé dans la zone infra-littorale et intertidale où la profondeur ne dépasse jamais 5 m. Ce râteau se compose de 4 parties essentielles :

1. Un large manche en bois dont la longueur varie en fonction de la taille de l'utilisateur (variable de 1 à 1,5 m).
2. Une poche réceptrice en arrière du râteau sous forme de sac en grillage de maille de 18 mm et de longueur supérieur à 2 m.
3. Une tôle dentée soudée à l'armature métallique qui racle le fond et sur laquelle est attachée la nappe de filet.
4. Un câble d'acier fixé à la tôle par une chaîne et se terminant à son extrémité antérieure par une sangle de traction.

L'opération est conduite par une seule personne qui pénètre dans l'eau à environ 1,20 m de profondeur. Le pêcheur s'avance dans l'eau jusqu'à une profondeur où il est possible de manier le râteau par le bout, en s'aidant de ses pieds, il exerce une pression sur la face supérieure de l'armature de la tôle pour l'enfoncer dans le sable. Après avoir passé la sangle autour de sa ceinture, le pêcheur incline le large manche à un point jugé adéquat à sa force de traction. Il tend la main, empoigne le manche par son extrémité, le tire en le gardant incliné, et tout en marchant à reculons, il fait des zigzags. La sangle de traction permet ainsi le renforcement de la puissance de traction manuelle. Les coquillages sont ensuite récupérés dans la poche réceptrice.



L'échantillonnage a été effectué aléatoirement. Une fois récolté, l'haricot de mer est ramené vivant au laboratoire dans des bacs en plastique contenant de l'eau de mer le jour même, ils ont été acclimatés environ 24 h aux conditions de laboratoire. Les expériences ont été réalisées pendant la

période de reproduction de *D. trunculus* au mois de Mars. Le sable, l'eau de mer et les organismes utilisés proviennent du site El-Battah. Au laboratoire, les individus de *D. trunculus* (longueur moyenne : $27,48 \pm 2,28$ mm, poids moyens : $2,6536 \pm 0,6743$ mg) sont élevés dans des aquariums de capacité de 50 à 80 L. La température, la salinité, le pH et l'oxygène dissout de l'eau d'élevage ont été mesurés à chaque prélèvement à l'aide d'un Oxymètre-multiparamètre (Multi 340 i). Le fond des aquariums a été rempli de 15 cm de sable, 25 L d'eau de mer (température : $17,68 \pm 0,14$ °C, salinité : $34,0 \pm 2,25$ g/L, pH : $8,04 \pm 0,34$, oxygène dissout : $3,05 \pm 0,06$ mg/L) et 100 individus par aquarium, et ils sont munis de pompe à air (Nirox X5).

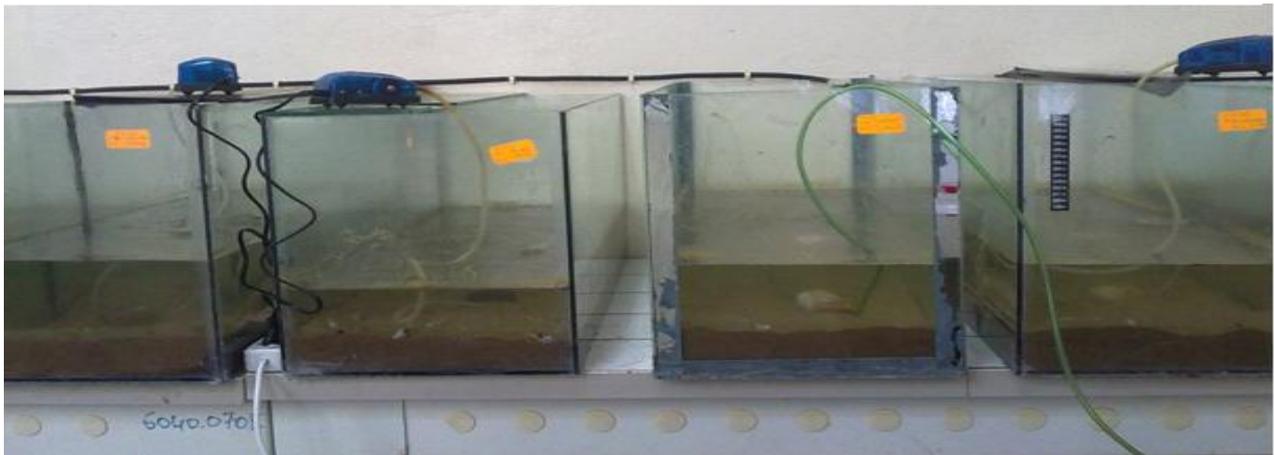


Figure 7. Élevage de *D. trunculus* au laboratoire.

2.5. Présentation du site de prélèvement

Le golfe d'Annaba est situé à l'extrême Est de l'Algérie, il est limité par les deux caps ; Rosa à l'Est ($8^{\circ}15'$ E, $36^{\circ}58'$ N) et Garde à l'Ouest ($7^{\circ}16'$ E, $36^{\circ}68'$ N), distant d'environ 40 Km l'un de l'autre avec une profondeur maximale qui ne dépasse pas 65 m. Le golfe reçoit les eaux douces par le biais de deux oueds : le Mafrag à l'Est et la Seybouse au Sud-Est, dont le débit est très irrégulier suivant les saisons. Ces oueds apportent des matières minérales et organiques de différentes origines terrigène, agricole, domestique et industrielle (Khelifi-Touhami *et al.*, 2006 ; Ounissi, 2007). De plus, la zone reçoit d'autres rejets des effluents urbains (Khammar, 2007) et industriels de plusieurs usines installées sur la côte, en particulier les produits phytosanitaires de FERTIAL près de la rive au Sud du golfe (Saker, 2007). Le site d'El-Battah ($36^{\circ} 50'$ N et $8^{\circ} 50'$ E) a été choisi au niveau de la baie d'Annaba pour le prélèvement des échantillons en raison d'une forte abondance du matériel biologique utilisé et de son éloignement des sources de pollution. Ce site est soumis à un régime hydrodynamique important qui contribuerait à la dilution des polluants.

2.6. Présentation du cadmium et traitement

2.6.1. Présentation du cadmium

Le cadmium fut découvert en 1817, est un élément 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). Il a été classifié dans la catégorie des éléments très toxique et relativement accessible au même titre que l'argent, le zinc, le mercure et le plomb (Wood, 1976). Le cadmium est de symbole Cd (Masse molaire atomique = 112,4 g/mol) (Adriano, 1986) et de numéro atomique 48 ; 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 ; Rosenthal & Sperling, 1974), est un polluant ubiquitaire classé 7^{ème} parmi les 20 principaux toxiques, en raison de son influence négative sur les systèmes enzymatiques cellulaires (Sanita di Toppi & 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 milieu marin, la chimie du cadmium est dominée par la complexation par les chlorures. Ainsi, Byrne *et al.* (1988) ont déterminé que 97 % du cadmium total était sous forme de complexe cadmium-chlorure (CdCl^+ et CdCl_2 en prédominance). Pour leur part, Millero & Hawke (1992) ont mesuré une plus grande proportion (8,7 %) du cadmium total qui était sous forme libre en milieu marin.

2.6.2. Traitement

Le Cd a été utilisé sous forme de CdCl_2 (chlorure de cadmium : BIOCHEM Chemopharma, Hemi pentahydrate, USA) à différentes concentrations appliquées sur *D. trunculus* : 5 - 7,6 et 10 mg/L.

-La première série d'expérience, vise à examiner la toxicité aigüe du cadmium vis-à-vis de *D. trunculus*.

-La deuxième série a pour objectif d'évaluer l'effet du Cd sur les activités enzymatiques de trois biomarqueurs l'AChE, GST et CAT à 0, 24, 48, 72 et 96 h d'exposition et à 0, 48, 96 h de restauration. La dose utilisée est de 2,59 mg/L correspondant à la CL_{50} (96 h) obtenue dans la première partie à l'égard de *D. trunculus*.

-La troisième série d'expérience quant à elle, a pour but d'étudier la bioconcentration du cadmium chez *D. trunculus* au cours d'une exposition aigüe (96 h). Le cadmium a été additionné dans l'eau d'élevage à deux concentrations 2,59 mg/L et 1,32 mg/L correspondant respectivement aux CL_{50-96}

h et CL₂₅-96 h déterminées précédemment. L'étude menée comporte deux périodes successives, une période d'exposition (48 et 96 h) suivie d'une période de restauration (transfert dans l'eau non contaminée) pendant 96 heures. La fin de l'exposition (96 h) au cadmium est considérée comme 0 jour pour la période de restauration. Pour chaque expérience les individus non traités ont été utilisés comme témoins.

2.7. Tests de toxicité

Le but de ces essais est de préciser les concentrations létales 50 et 90 (CL₅₀ et CL₉₀) du Cd à l'égard de *D. trunculus*. Les essais sont conduits avec 3 répétitions comportant chacune 100 individus.

Mortalité observée

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

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

Mortalité corrigée

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

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

Transformation angulaire

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

Analyse des probits

Les pourcentages de mortalité corrigée subissent une transformation en probits (Fisher & Yates, 1957). Le logarithme décimal des concentrations en fonction du probit nous permet de déterminer la droite de régression à partir de laquelle les CL_{50} et CL_{90} sont estimées (Finney, 1975).

Intervalle de confiance

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

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

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

Aussi deux paramètres sont nécessaires:

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

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

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

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

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

S: Slope

N : Nombre total des bivalves testés

2.8. Dissection et prélèvement du tissu

Les dosages biochimiques ont été effectués sur des individus ayant une taille de classe de 27 ± 1 mm représentant la taille la plus abondante (Aouadene, 2003). Après dissection, le manteau est prélevé et séparé en deux parties, chaque partie étant destinée à un dosage. Le dosage de l'acétylcholinestérase, de la glutathion S-transférase et de la catalase a été déterminé au niveau du manteau des bivalves témoins et traités au Cd (CL_{50} -96 h = 2,59 mg/L) à différents temps d'exposition (0, 24, 48, 72 et 96 h) et de restauration (0, 48 et 96 heures). Les activités enzymatiques de ces trois biomarqueurs (l'AChE, GST et CAT) sont exprimées par rapport aux quantités de protéines.

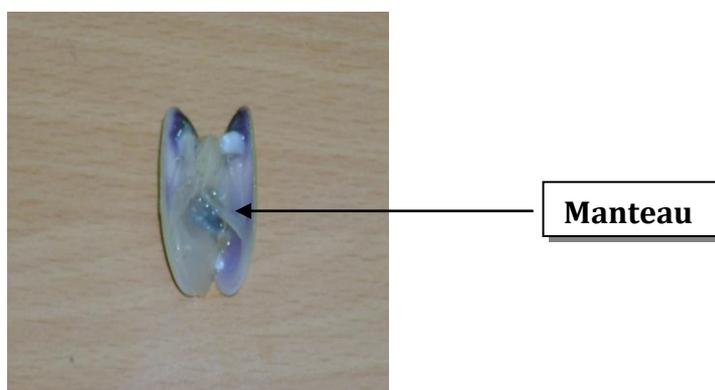


Figure 8. Prélèvement du manteau. (Gr× 1,92)

2.9. Dosage des biomarqueurs

2.9.1. Dosage de l'acétylcholinestérase

La méthode de dosage de l'acétylcholinestérase (AChE) la plus courante (Ellman *et al.*, 1961) décrite précédemment (Sifi *et al.*, 2007 ; Amira *et al.*, 2011 ; Zaidi & Soltani, 2010). Elle consiste à fournir à l'enzyme un substrat, l'acétylthiocholine (ASCh), dont l'hydrolyse catalysée, libère de la thiocholine (SCh) et de l'acide acétique. La thiocholine en présence de DTNB (acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) forme un complexe de couleur jaune dont l'intensité est lue à une longueur d'onde de 412 nm. Les échantillons d'individus témoins et traités (manteau) sont homogénéisés pendant quelques secondes dans 1 ml de solution détergente (38,03 mg éthylène glycol tris-beta aminoéthyl éther NNN'N' ou EGTA, 1 ml triton X 100%, 5,845 g NaCl (1 N), 80 ml tampon tris 10 mM à pH 7) à l'aide d'un homogénéiseur à ultrasons (Sonifer B-30) dans une cuve remplie de glace puis centrifugés à 9000 tours/mn pendant 15 mn. Le surnageant est utilisé immédiatement comme source d'enzyme pour la mesure de l'activité AChE.

Le dosage de l'AChE est réalisé sur une fraction aliquotée de ; 100 µl du surnageant sont additionnés à 100 µl de DTNB (39,6 g de DTNB, 15 mg CO₃HNa, dans 10 ml de tampon tris 0,1 M, pH 7) et 1 ml du tampon tris (0,1 M, pH 7). Après 3 à 5 mn de repos nécessaire pour épuiser la réaction spontanée, 100 µl du substrat acétylthiocholine iodide (Sigma R) (118 mg ASCh dans 5 ml d'eau distillée) sont ajoutés. La lecture des densités optiques, s'effectue à 412 nm toutes les 4 minutes pendant 20 minutes contre un blanc où le surnageant a été remplacé par un volume équivalent de solution détergente (100 µl). L'activité spécifique de l'AChE est déterminée par la formule suivante:

$$\text{AChE } (\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta D_{\text{O}}/\text{mn} \times V_{\text{t}}}{1,36 \times 10^4 \times V_{\text{s}}} \Bigg/ \text{mg de protéines}$$

DO: Densité optique.

ΔD_{O} : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

$1,36 \times 10^4$: coefficient d'extinction molaire du DTNB.

V_{t} : Volume total dans la cuve : 1,3 ml (0,1 ml du surnageant + 0,1 ml du DTNB + 1 ml de tampon tris (0,1 M, pH 7) + 0,1 ml du substrat ASCh).

V_{s} : Volume du surnageant (0,1 ml).

mg de protéines: Quantité de protéines exprimée en mg.

2.9.2. Dosage de la glutathion S-transférase

La mesure de l'activité de la glutathion S-transférase (GST) est déterminée selon la méthode de Habig *et al.* (1974). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2,4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH) est mesurée à une longueur d'onde de 340 nm dans un spectrophotomètre visible/UV (GENESYS TM8). Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml du tampon phosphate (0,1 M, pH 6) à l'aide d'un broyeur à ultrasons dans une cuve remplie de glace. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé à 14000 tours/mn pendant 30 mn et le surnageant servira au dosage de l'activité de la GST.

Le dosage de l'activité spécifique de la GST consiste à faire réagir: une fraction aliquote de 0,2 ml est ajoutée à 1,2 ml du mélange CDNB (1 mM) - GSH (5 mM); (20,26 mg CDNB, 153,65 mg GSH, 1 ml tampon phosphate 0,1 M, pH 6). La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec 0,2 ml d'eau distillée remplaçant le surnageant. La variation de la densité optique due à l'apparition du complexe CDNB-GSH est mesurée toutes les 1 min pendant 5 min à 340 nm dans un spectrophotomètre UV. L'activité spécifique de la GST est déterminée par la formule suivante:

$$\text{GST } (\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta D_{\text{O}}/\text{mn} \times V_{\text{t}}}{9,6 \times V_{\text{s}}} \Bigg/ \text{mg de protéines}$$

ΔD_0 : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

V_t : Volume total dans la cuve : 1,4 ml (1,2 ml du mélange CDNB/GSH + 0,2 ml de surnageant).

ϵ : Coefficient d'extinction molaire du CDNB.

V_s : Volume du surnageant utilisé dans le dosage (0,2 ml).

mg de protéines: Quantité de protéines exprimée en mg.

2.9.3. Dosage de la catalase

L'activité de la catalase (CAT) est déterminée selon la méthode de Claiborne (1985). Elle est mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (50 mM, pH 7). L'homogénat est centrifugé à 15000 trs pendant 10 mn et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme. Le dosage est réalisé selon le tableau suivant :

Tableau 1 : Dosage de la catalase.

	Volume de surnageant (μ l)	Volume du tampon phosphate (μ l)	Solution H_2O_2 (μ l)
Blanc	0	800	200
Echantillon	50	750	200

La lecture des absorbances est effectuée toutes les 5 secondes pendant 30 secondes à une longueur d'onde de 240 nm. L'activité spécifique est déterminée d'après la formule suivante :

$$\text{CAT } (\mu\text{M/mn/mg de protéines}) = \frac{\Delta D_0/\text{mn}}{0,040} \text{ / mg de protéines}$$

ΔD_0 : $\Delta D_0/\text{mn}$ (blanc) - $\Delta D_0/\text{mn}$ (Echantillon)

0,040 : coefficient d'extinction molaire du peroxyde d'hydrogène.

2.9.4. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (1976), qui consiste à additionner à une fraction aliquote de 100 µl du surnageant ou de la gamme étalon, 4 ml de réactif du bleu brillant de coomassie (BBC) (G 250, Merck). 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. La présence des protéines dans l'échantillon se révèle par une coloration bleue. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (BSA) (Sigma, France) titrant 1 mg/ml (Tableau 2).

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

Tubes	1	2	3	4	5	6
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
Quantité de BSA (µg)	0	20	40	60	80	100

2.10. Extraction et dosage du cadmium dans les tissus de *D. trunculus*

Le dosage des éléments traces métalliques se fait selon Scheifler *et al.* (2005). Après traitement, les individus de *D. trunculus* prélevés ont été nettoyés à l'eau distillée, repartis en trois pools de 4 spécimens. La totalité de la masse molle de chaque individu a été soigneusement enlevée à l'aide d'un couteau en plastique (Chiu *et al.*, 2000) et séchée à l'étuve à 60°C jusqu'à un poids constant. Ensuite, tous les échantillons ont été finement homogénéisés et lyophilisés (Bouthir *et al.*, 2004).

Sur chaque pool, la prise de 200 mg de poids sec du matériel biologique a été utilisée pour le dosage du cadmium. La minéralisation comporte une attaque acide en présence de 4 ml d'acide nitrique pur (HNO₃) (50%) à une température ambiante pendant une nuit, suivie d'une digestion à 90°C pendant 3 h (Idardare *et al.*, 2011). Afin d'éviter toute perte métallique, des récipients en porcelaine fermés ont été utilisés. Les échantillons digérés ont été filtrés en utilisant du papier filtre (Whatman n° 1), le filtrat obtenu est complété avec de l'eau distillée jusqu'à un volume de 25 ml le jour de dosage.

L'analyse des échantillons a été effectuée par la méthode de spectroscopie d'absorption atomique (SAA) (Shimadzu model AA-6200) à flamme air-acétylène équipé d'un correcteur de fond de deutérium (Laib & Leghouchi, 2011). La procédure d'analyse a été vérifiée en utilisant un matériel de référence standard de cadmium (1000 mg/ Cd) et Cadmium Chloride in water (Merck). Les résultats sont exprimés en µg/mg de tissu sec. La concentration a été calculée à partir de la formule suivante :
La concentration du Cd (µg/mg de tissu sec) = (quantité du métal détectée dans l'échantillon (µg/L) / masse du tissu en mg de poids sec) × facteur de dilution

2.10 .1. Principe de la spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA)

Le principe de la SAA est basé sur la propriété d'absorption d'un rayonnement lumineux par un élément en fonction de sa concentration dans la solution à analyser. Les atomes d'un élément donné sont capables d'absorber l'énergie apportée par des photons dont la fréquence est caractéristique de l'élément à doser.

L'élément à doser dans l'échantillon est préalablement dissocié de ses composés chimiques et porté à l'état non excité et non ionisé dit « état fondamental », cette dissociation thermique est obtenue par la combustion de l'échantillon dans une flamme ou dans un four en graphite. Une fois dissocié, l'élément est alors capable d'absorber des radiations de longueurs d'onde bien définies, qu'il est capable d'émettre.

La SAA SHIMADZU A A6200 Atomic Absorption Flamme Emission Spectrophotomètre avec lequel nous avons effectué le dosage comporte les dispositifs suivants (Figure 9) :

a)La source de radiation

Elle est constituée d'une lampe à cathode creuse recouverte du métal à doser et remplie à l'intérieur d'un gaz inerte comme l'argon ou le néon.

b) Le système d'atomisation

Il a pour rôle de transformer les ions en solution à l'état d'atomes libres. Dans la technique utilisant la flamme, le liquide est vaporisé en un jet de gouttelettes fines qui seront par la suite, atomisées puis passer à travers la flamme.

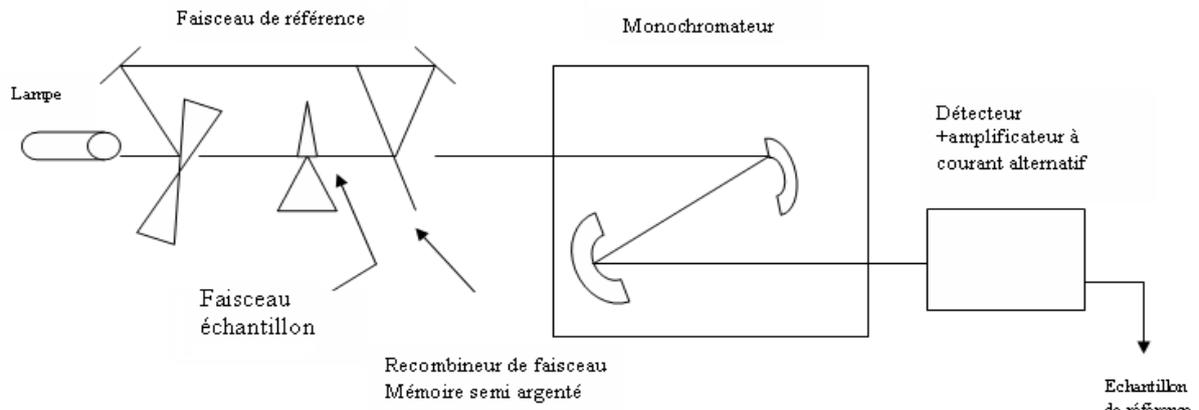


Figure 9 : principe de fonctionnement de la S.A.A.

c) Le dispositif de la flamme air acétylène

Il est constitué d'un brûleur et d'un nébuliseur. Les échantillons en solution sont aspirés par le nébuliseur et vaporisés sous forme d'aérosols. Les fines gouttelettes passent à travers la flamme oxydante située sur le chemin du rayon lumineux. Les atomes libres adsorbent spécifiquement une partie de la radiation émise par la lampe à cathode creuse qui émet les radiations caractéristiques de l'élément à doser.

d) Un monochromateur (filtre)

Permet d'isoler la raie de résonance de l'élément à doser. C'est un ensemble optique qui comporte un système de projection optique d'entrée destiné à concentrer le flux énergétique ainsi qu'un sélecteur de radiation permettant d'isoler une radiation ou un ensemble de radiations dans le spectre émis.

e) Un dispositif de réception photo électrique et de mesure

C'est en général photomultiplicateur d'électrons.

f) Un détecteur

Permet la détection de l'intensité lumineuse en la transformant en pulsations.

2.10.2. Préparation des étalons

Le dosage est effectué par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) à flamme air acétylène de type SHIMADZU AA-6200 Atomic Absorption Flamme Emission Spectrophotomètre. La gamme

d'étalonnage est préparée à partir de solutions mère (100 ppm) de Type MERCK (tableau 3) spécifique à l'élément étudié.

Tableau 3. Conditions particulières d'analyse pour la détermination de la concentration du cadmium dans les tissus de *Donax trunculus*.

Elément	Longueur d'onde (nm)	Atomisation	Limite de détection ($\mu\text{g/L}$)	Gamme d'étalonnage (mg/L)
Cd	228.8	Flamme:air/acétylène	2.0	0.2 - 0.4 - 1 - 2.5 - 5.

2.11. Analyse statistique

Les données sont représentées par la moyenne arithmétique plus au moins l'écart type ($m \pm SD$) établie sur un effectif ou un nombre de répétitions précisées dans les tableaux et les figures. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un logiciel MINITAB (Version 16, Penn State College, PA, USA) disponible au Laboratoire de Biologie Animale Appliquée. Dans le cas de non égalité des variances, une normalisation des données est alors effectuée. Les variances sont considérées comme significatives lorsque la significativité présente une probabilité inférieure ou égale à 95% ($p < 0,05$).

2.11.1. Analyse univariée

Cette analyse permet de comparer deux à deux par le test de « t » de Student les moyennes des séries témoins et traitées et les moyennes obtenues pour chaque dosage des biomarqueurs (AChE, GST et CAT) ainsi que entre les concentrations du cadmium. Et d'autre part d'évaluer les effets des facteurs suivants : temps, traitement sur les différents résultats par application du modèle linéaire généralisé (GLM) et de l'analyse de la variance (ANOVA) à un et deux critères de classification. De plus, le test HSD (honest significative différence) de Tukey qui nous permet de classer les différents traitements en fonction de leur effet et d'obtenir des intervalles de confiance pour toutes les différences deux à deux entre les moyennes des niveaux.

2.11.2. Régression linéaire

L'analyse consiste à déterminer les différentes équations de régression linéaire au sens des moindres carrés et les coefficients de détermination ajustés (R^2) du type $y = ax + b$. Ces équations sont utilisées d'une part dans le calcul des taux des protéines après détermination des différentes courbes d'étalonnage dont l'équation exprime les absorbances en fonction de la quantité d'albumine standard, et d'autre part dans le calcul des activités enzymatiques de l'AChE, GST et CAT.

RESULTATS

3. RESULTATS

3.1. Toxicité aigüe du cadmium

3.1.1. Effet du cadmium sur le taux de mortalité après 24 h d'exposition

Après traitement avec le cadmium à différentes concentrations (5 – 7,6 – 10 mg/L), nous avons mentionné dans le tableau 4 le taux observé de mortalité après 24 h d'exposition. Il est de l'ordre de $0,66 \pm 0,57$ % chez les séries témoins et augmente chez les séries traitées jusqu'à $34,00 \pm 6,24$ % pour la concentration la plus élevée (10 mg/L). Les mortalités observées sont par la suite corrigées par la formule d'Abbott (1925) qui montre l'effet réel des différentes concentrations (Tableau 5).

Tableau 4: Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 24 h d'exposition : mortalité observée (%) ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L) Répétitions	Témoins	5	7,6	10
R ₁	0	6	20	39
R ₂	1	8	17	36
R ₃	1	5	11	27
m ± SD	0,66 ± 0,57	6,33 ± 1,52	16,00 ± 4,58	34,00 ± 6,24

Tableau 5: Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 24 h d'exposition: mortalité corrigée (%) ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L) Répétitions	5	7,6	10
R ₁	6,00	20,00	39,00
R ₂	7,07	16,16	35,35
R ₃	4,04	10,10	26,26
m ± SD	5,70 ± 1,53	15,42 ± 4,99	33,53 ± 6,56

Les taux corrigés font l'objet d'une transformation angulaire (Tableau 6) et d'une analyse de la variance à un seul critère de classification (Tableau 7). Les résultats indiquent qu'il existe un effet concentration hautement significatif ($p < 0,001$). Le classement des concentrations par le test de Tukey révèle trois groupes: le premier (A) renferme la concentration 5 mg/L, le second groupe (B) la concentration 7,6 mg/L et le troisième (C) la concentration 10 mg/L (Tableau 8, Fig. 10).

Tableau 6: Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 24 h d'exposition: transformation angulaire ($m \pm SD$; $n = 3$ répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	5	7,6	10
Répétitions			
R ₁	14,18	26,57	38,65
R ₂	15,34	23,58	36,27
R ₃	11,54	18,43	30,60
$m \pm SD$	$13,68 \pm 1,94$	$22,86 \pm 4,11$	$35,17 \pm 4,13$

Tableau 7: Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 24 h d'exposition: analyse de la variance à un critère de classification ($m \pm SD$; $n = 3$ répétitions comportant chacune 100 individus).

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F obs	P
Factorielle	2	697,4	348,7	27,64	0,001***
Résiduelle	6	75,7	12,6		
Totale	8	773,1			

* significatif ($P < 0,05$) ** très significatif ($p < 0,01$) *** hautement significatif ($P < 0,001$)

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

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	$5,70 \pm 1,53$	$13,68 \pm 1,94$	A
7,6	$15,42 \pm 4,99$	$22,86 \pm 4,11$	B
10	$33,53 \pm 6,56$	$35,17 \pm 4,13$	C

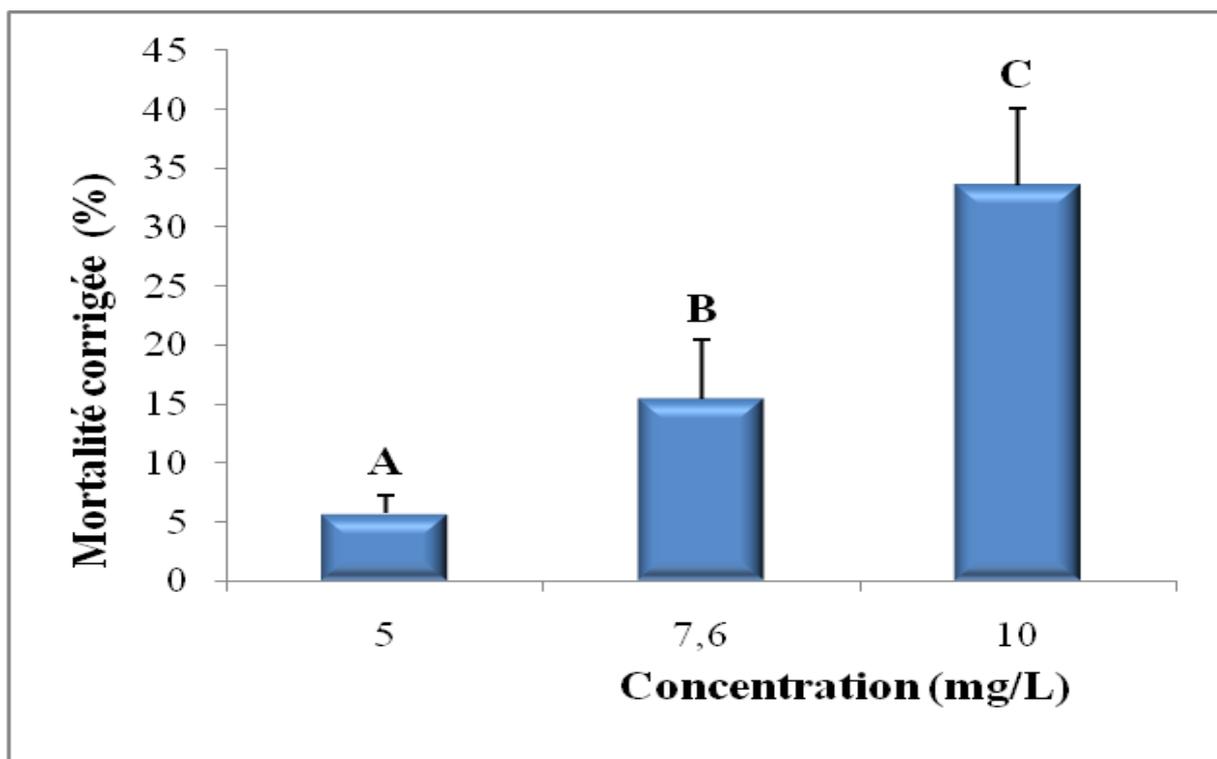


Figure 10. Toxicité du cadmium après 24 h d'exposition de *D. trunculus* et classement des concentrations. ($m \pm SD$; les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes, $p > 0,05$).

L'équation de la droite de régression exprimant le probit des pourcentages de mortalité corrigée (Tableau 9) en fonction du logarithme décimal des concentrations avec un coefficient de détermination $R^2 = 97,9 \%$, révèle une liaison positive très forte entre les probits et le logarithme décimal des concentrations. Les concentrations létales 50 (CL_{50}) et 90 (CL_{90}) déterminées à partir de la droite de régression avec leur intervalle de confiance sont respectivement : 13,61 mg/L (11,73 – 15,78) et 30,55 mg/L (26,33 – 35,43) (Tableau 10, Fig. 11).

Tableau 9: Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 24 h d'exposition: transformation en probits des mortalités corrigées ($m \pm SD$; $n= 3$ répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentraions (mg/L)	5	7,6	10
Mortalité corrigée (%)	5,70	15,42	33,53
Probits	3,4195	3,9806	4,5739

Tableau 10: Toxicité du cadmium (mg/L) après une exposition de 24h de *D. trunculus* : détermination des CL_{50} et CL_{90} (mg/L) et leurs intervalles de confiance.

Traitements	Droite de régression	Slope	CL_{50} (IC)	CL_{90} (IC)
Cadmium	$Y = 3,65 X + 0,861$	1,87	13,61 (11,73–15,78)	30,55 (26,33 – 35,43)

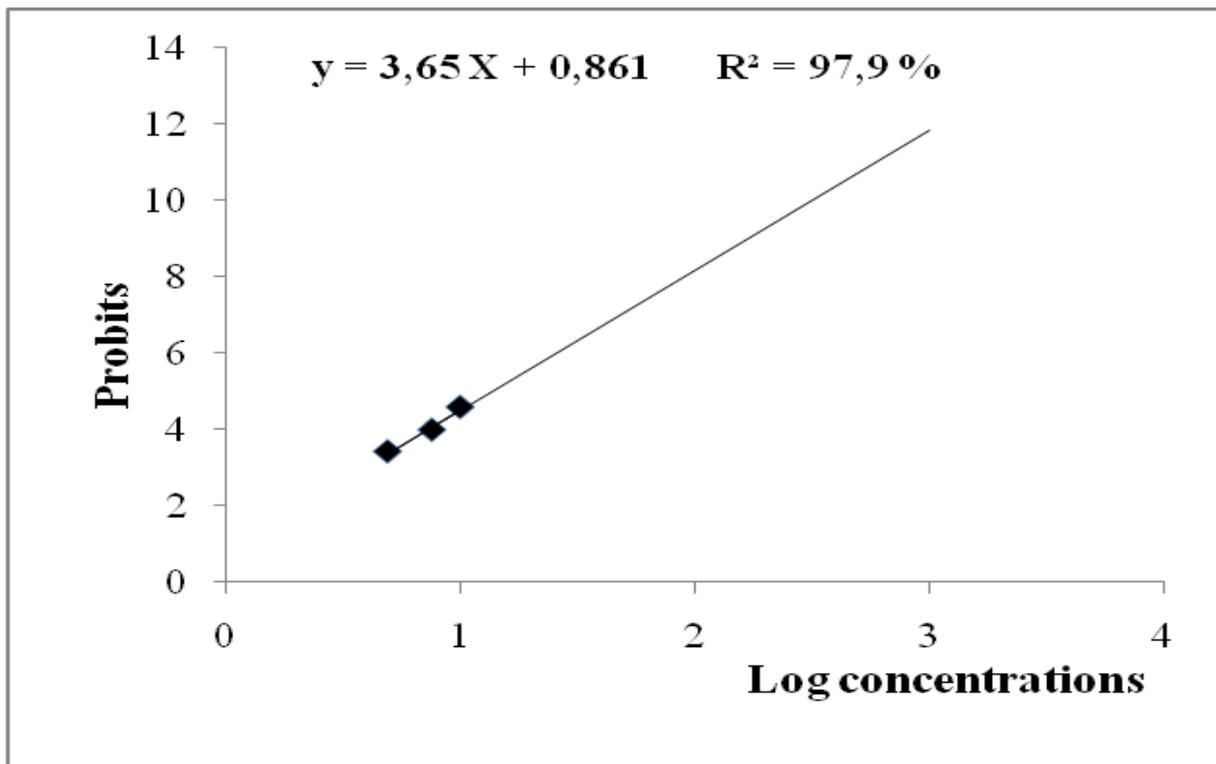


Figure 11. Toxicité du cadmium (mg/L) après 24 h d'exposition de *D. trunculus*. Analyse des probits.

3.1.2. Effet du cadmium sur le taux de mortalité après 48 h d'exposition

Le cadmium a été appliqué à différentes concentrations (5 – 7,6 – 10 mg/L). Le taux de mortalité observée est mentionnée dans le tableau 11 avec des taux variant de: $22,66 \pm 2,51$ % (5 mg/L) à plus de 50 % (10 mg/L). Les mortalités corrigées varient de $21,60 \pm 3,02$ % pour 5 mg/L (faible dose) à $54,35 \pm 8,29$ % pour la concentration 10 mg/L (la plus forte dose). Les résultats obtenus sont mentionnées dans le tableau 12. Après transformation angulaire (Tableau 13) des mortalités corrigées; l'analyse statistique des données (Tableau 14) révèle un effet concentration très significatif ($p < 0,01$). Le classement par le test de Tukey des concentrations testées donne deux groupes: le groupe (A) renferme les concentrations 5 et 7,6 mg/L, le groupe (B) renferme la concentration 10 mg/L (Tableau 15, Fig. 12).

Tableau 11: Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. tunculus* après 48 h d'exposition : mortalité observée (%) ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L) Répétitions	Témoins	5	7,6	10
R ₁	0	25	39	63
R ₂	3	23	33	55
R ₃	1	20	28	47
m ± SD	1,33 ± 1,52	22,66 ± 2,51	33,33 ± 5,50	55,00 ± 8,00

Tableau 12: Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 48 h d'exposition: mortalité corrigée (%) ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L) Répétitions	5	7,6	10
R ₁	25	39	63
R ₂	20,61	30,92	53,60
R ₃	19,19	27,27	46,46
m ± SD	21,60 ± 3,02	32,39 ± 6,00	54,35 ± 8,29

Tableau 13: Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 48 h d'exposition: transformation angulaire ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	5	7,6	10
Répétitions			
R₁	30,00	38,65	52,54
R₂	26,57	33,21	46,72
R₃	25,84	31,31	42,71
m ± SD	27,47 ± 2,22	34,39 ± 3,81	47,32 ± 4,94

Tableau 14 : Toxicité du cadmium (mg /L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 48 h d'exposition: analyse de la variance à un critère de classification ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F obs	P
Factorielle	2	609,3	304,7	20,83	0,002**
Résiduelle	6	87,8	14,6		
Totale	8	697,1			

* significatif (P< 0,05) ** très significatif (p< 0,01) *** hautement significatif (P< 0,001)

Tableau 15 : Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 48 h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	21,60 ± 3,02	27,47 ± 2,22	A
7,6	32,3 ± 6,00	34,39 ± 3,81	A
10	54,35 ± 8,29	47,32 ± 4,94	B

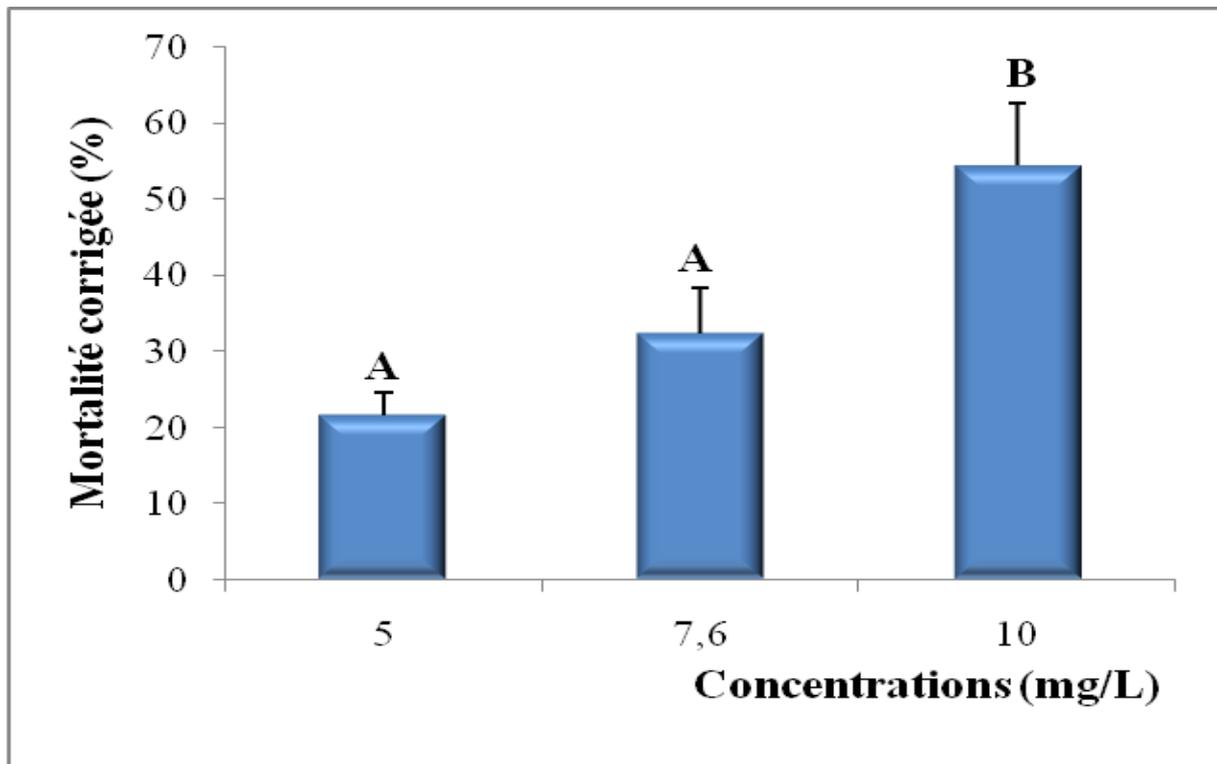


Figure 12. Toxicité du cadmium après 48 h d'exposition de *D. trunculus* et classement des concentrations. ($m \pm SD$; les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes, $p > 0,05$).

L'équation de la droite de régression exprimant le probit des pourcentages de mortalité corrigée (Tableau 16) en fonction du logarithme décimal des concentrations avec un coefficient de détermination $R^2 = 92,2 \%$ révèle une liaison positive très forte entre les probits et le logarithme décimal des concentrations. Les concentrations létales 50 (CL_{50}) et 90 (CL_{90}), déterminées à partir de la droite de régression avec leur intervalle de confiance sont respectivement: 9,83 mg/L (8,69 – 11,10) et 28,43 mg/L (25,15 – 32,12) (Tableau 17, Fig. 13).

Tableau 16 : Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 48 h d'exposition: transformation en probits des mortalités corrigées ($m \pm SD$; $n = 3$ répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	5	7,6	10
Mortalités corrigées (%)	21,60	32,39	54,35
Probits	4,2142	4,5407	5,1080

Tableau 17 : Toxicité du cadmium (mg/L) après une exposition de 48 h de *D. trunculus* : détermination de la CL₅₀ et la CL₉₀ (mg/L).

Traitements	Droite de régression	Slope	CL ₅₀ (IC)	CL ₉₀ (IC)
Cadmium	$Y = 2,78 X + 2,24$	2,28	9,83 (8,69 – 11,10)	28,43 (25,15– 32,12)

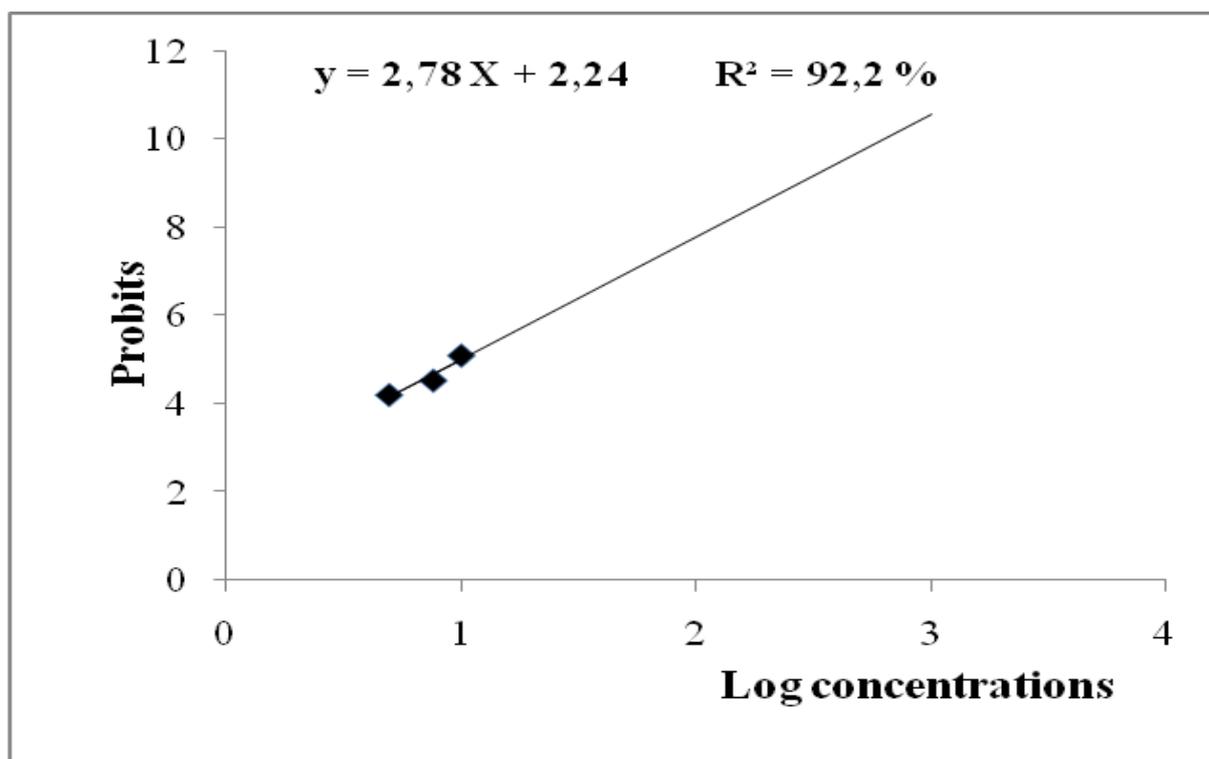


Figure 13. Toxicité du cadmium (mg/L) après 48 h d'exposition de *D. trunculus*. Analyse des probits.

3.1.3. Effet du cadmium sur le taux de mortalité après 72 h d'exposition

Le cadmium a été appliqué à différentes concentrations (5 – 7,6 – 10 mg/L). Le taux de mortalité observée est mentionnée dans le tableau 18 avec des taux variant de : $57,00 \pm 2,00 \%$ (5 mg/L) à $77,66 \pm 2,51 \%$ (10 mg/L). Les mortalités corrigées varient de $55,93 \pm 2,91 \%$ pour la faible concentration (5 mg/L) à $77,10 \pm 2,77 \%$ pour la concentration la plus élevée (10 mg/L) (Tableau 19). L'analyse statistique des données (Tableau 21) après transformation angulaire des mortalités corrigées (Tableau 20) révèle un effet concentration hautement significatif ($p < 0,001$). Le classement par le test de Tukey des concentrations testées donne trois groupes: le groupe (A) renferme la

concentration 5 mg/L, le groupe (B) renferme la concentration 7,6 mg/L et le troisième (C) renferme la concentration 10 mg/L (Tableau 22, Fig. 14).

Tableau 18 : Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. tunculus* après 72 h d'exposition : mortalité observée (%) ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L) Répétitions	Témoins	5	7,6	10
R₁	0	57	64	80
R₂	5	55	63	78
R₃	2	59	67	75
m \pm SD	2,33 \pm 2,51	57,00 \pm 2,00	64,66 \pm 2,08	77,66 \pm 2,51

Tableau 19 : Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 72 h d'exposition: mortalité corrigée (%) ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L) Répétitions	5	7,6	10
R₁	57	64	80
R₂	52,63	61,05	76,84
R₃	58,16	66,32	74,48
m \pm SD	55,93 \pm 2,91	63,79 \pm 2,64	77,10 \pm 2,77

Tableau 20 : Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 72 h d'exposition: transformation angulaire ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	5	7,6	10
Répétitions			
R ₁	49,02	53,13	63,43
R ₂	46,15	51,35	60,67
R ₃	49,60	54,33	59,34
m ± SD	48,25 ± 1,84	52,93 ± 1,49	61,14 ± 2,08

Tableau 21 : Toxicité du cadmium (mg /L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 72 h d'exposition: analyse de la variance à un critère de classification ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F obs	P
Factorielle	2	255,46	127,73	38,27	0,000***
Résiduelle	6	20,03	3,34		
Totale	8	275,49			

* significatif (P<0,05) ** très significatif (p<0,01) *** hautement significatif (P<0,001)

Tableau 22 : Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 72 h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	55,93 ± 2,91	48,25 ± 1,84	A
7,6	63,79 ± 2,64	52,93 ± 1,49	B
10	77,10 ± 2,77	61,14 ± 2,08	C

L'équation de la droite de régression exprimant le probit des pourcentages de mortalité corrigée (Tableau 23) en fonction du logarithme décimal des concentrations, avec un coefficient de détermination $R^2 = 90,6 \%$ révèle une liaison positive très forte entre les probits et le logarithme décimal des concentrations. Les concentrations létales 50 (CL_{50}) et 90 (CL_{90}), déterminées à partir de la droite de régression avec leur intervalle de confiance sont respectivement: 4,27 mg/L (3,71– 4,91) et 21,23 mg/L (18,46–24,41) (Tableau 24, Fig. 15).

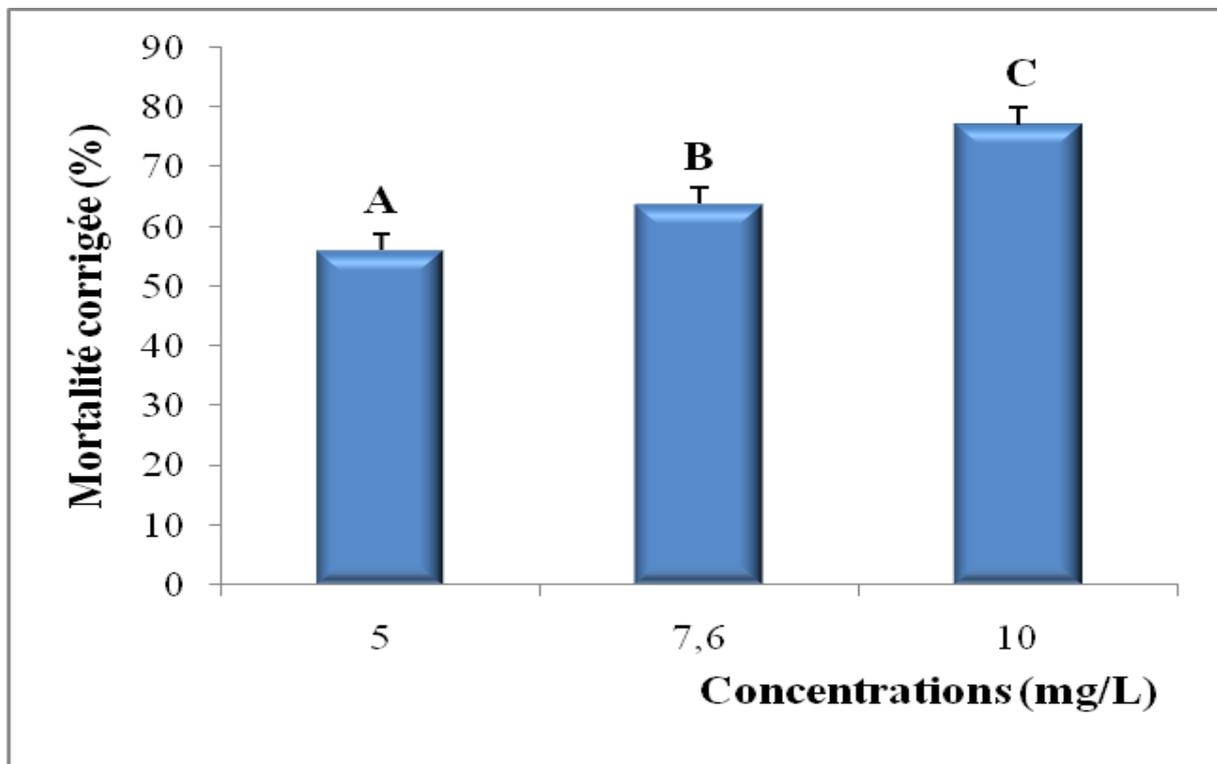


Figure 14. Toxicité du cadmium après 72 h d'exposition de *D. trunculus* et classement des concentrations. ($m \pm SD$; les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes, $p > 0,05$).

Tableau 23 : Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 72 h d'exposition: transformation en probits des mortalités corrigées ($m \pm SD$; $n = 3$ répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	5	7,6	10
Mortalités corrigées (%)	55,93	63,79	77,10
Probits	5,1484	5,3505	5,7421

Tableau 24 : Toxicité du cadmium (mg/L) après une exposition de 72 h de *D. trunculus* : détermination de la CL₅₀ et la CL₉₀ (mg/L).

Traitements	Droite de régression	Slope	CL ₅₀ (IC)	CL ₉₀ (IC)
Cadmium	$Y = 1,84 X + 3,84$	3,47	4,27 (3,71 – 4,91)	21,23 (18,46 – 24,41)

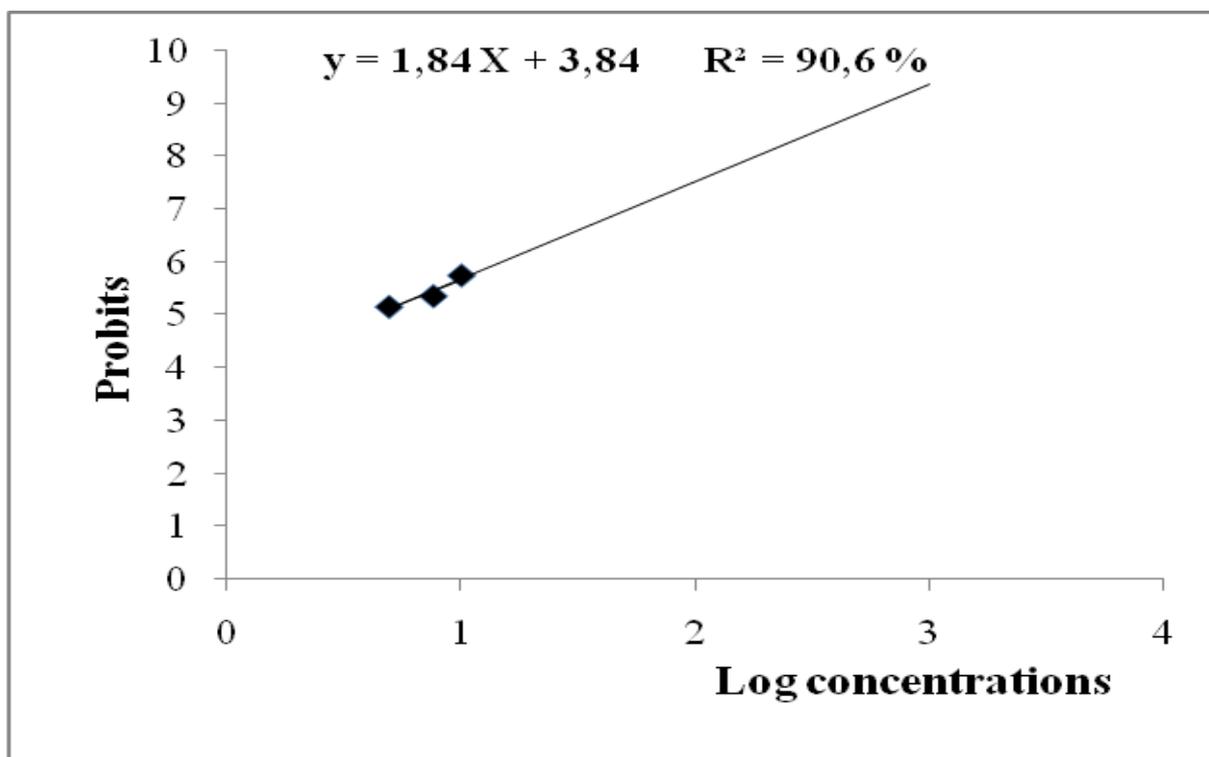


Figure 15. Toxicité du cadmium (mg/L) après 72 h d'exposition de *D. trunculus*. Analyse des probits.

3.1.4. Effet du cadmium sur le taux de mortalité après 96 h d'exposition

Le cadmium a été appliqué à différentes concentrations (5 – 7,6 – 10 mg/L). Le taux de mortalité observée varie de $76,00 \pm 3,36 \%$ (5 mg/L) à plus de 90 % (10 mg/L) (Tableau 25). Les mortalités observées sont corrigées par la formule d'Abbott (1925) ; les mortalités corrigées varient de $75,24 \pm 3,62 \%$ (5 mg/L) à $92,39 \pm 3,25 \%$ (10 mg/L). Les résultats sont mentionnés dans le tableau 26. Les mortalités corrigées ont subi une transformation angulaire ; l'analyse statistique des données (Tableau 28) révèle un effet concentration très significatif ($p < 0,01$). Le classement par le test de Tukey des concentrations testées donne deux groupes: le groupe (A) renferme les concentrations 5 et 7,6 mg/L, le groupe (B) renferme la concentration 10 mg/L (Tableau 29, Fig. 16).

Tableau 25 : Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. tunculus* après 96 h d'exposition : mortalité observée (%) ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L) Répétitions	Témoins	5	7,6	10
R₁	0	78	86	96
R₂	6	78	82	92
R₃	3	72	84	90
m \pm SD	3,00 \pm 3,00	76,00 \pm 3,46	84,00 \pm 2,00	92,66 \pm 3,05

Tableau 26 : Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 96 h d'exposition: mortalité corrigée (%) ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L) Répétitions	5	7,6	10
R₁	78	86	96
R₂	76,59	80,85	91,48
R₃	71,13	83,50	86,69
m \pm SD	75,24 \pm 3,62	83,45 \pm 2,57	92,39 \pm 3,25

Tableau 27 : Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 96 h d'exposition: transformation angulaire ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L) Répétitions	5	7,6	10
R₁	62,03	68,03	78,46
R₂	60,67	63,43	72,54
R₃	57,42	65,65	70,63
m \pm SD	60,04 \pm 2,36	65,70 \pm 2,30	73,87 \pm 4,08

Tableau 28 : Toxicité du cadmium (mg /L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 96 h d'exposition: analyse de la variance à un critère de classification ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F obs	P
Factorielle	2	290,33	145,17	15,80	0,004**
Résiduelle	6	55,14	9,19		
Totale	8	345,47			

* significatif ($P < 0,05$) ** très significatif ($p < 0,01$) *** hautement significatif ($P < 0,001$)

Tableau 29: Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 96 h d'exposition: classement des concentrations ($m \pm SD$; n= 3 répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	Mortalités corrigées	Mortalités transformées	Classement
5	75,24 \pm 3,62	60,04 \pm 2,36	A
7,6	83,45 \pm 2,57	65,70 \pm 2,30	A
10	92,39 \pm 3,25	73,87 \pm 4,08	B

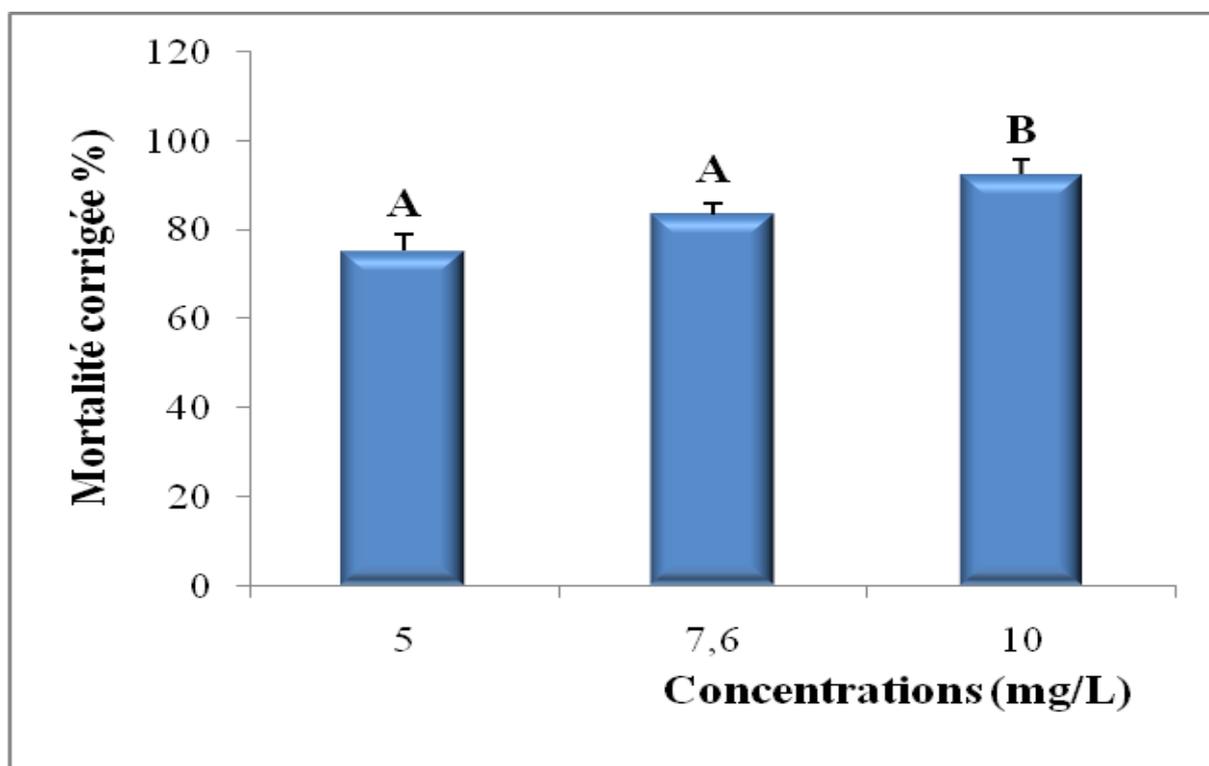


Figure 16. Toxicité du cadmium après 96 h d'exposition de *D. trunculus* et classement des concentrations. ($m \pm SD$; les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes, $p > 0,05$).

L'équation de la droite de régression exprimant le probit des pourcentages de mortalité corrigée (Tableau 30) en fonction du logarithme décimal des concentrations avec un coefficient de détermination $R^2 = 93,5 \%$ révèle une liaison positive très forte entre les probits et le logarithme décimal des concentrations. Les concentrations létales 50 (CL_{50}) et 90 (CL_{90}), déterminées à partir de la droite de régression avec leur intervalle de confiance sont respectivement: 2,59 mg/L (2,25 – 2,97) et 9,25 mg/L (8,04 – 10,63) (Tableau 31, Fig. 17).

Tableau 30 : Toxicité du cadmium (mg/L) administré à différentes concentrations à l'égard de *D. trunculus* après 96 h d'exposition: transformation en probits des mortalités corrigées ($m \pm SD$; $n=3$ répétitions comportant chacune 100 individus).

Concentrations (mg/L)	5	7,6	10
Mortalités corrigées (%)	75,24	83,45	92,39
Probits	5,6808	5,9701	6,4255

Tableau 31 : Toxicité du cadmium (mg/L) après une exposition de 96 h de *D. trunculus* : détermination de la CL₅₀ et la CL₉₀ (mg/L).

Traitements	Droite de régression	Slope	CL ₅₀ (IC)	CL ₉₀ (IC)
Cadmium	$Y = 2,32 X + 4,04$	2,69	2,59 (2,25 – 2,97)	9,25 (8,04 – 10,63)

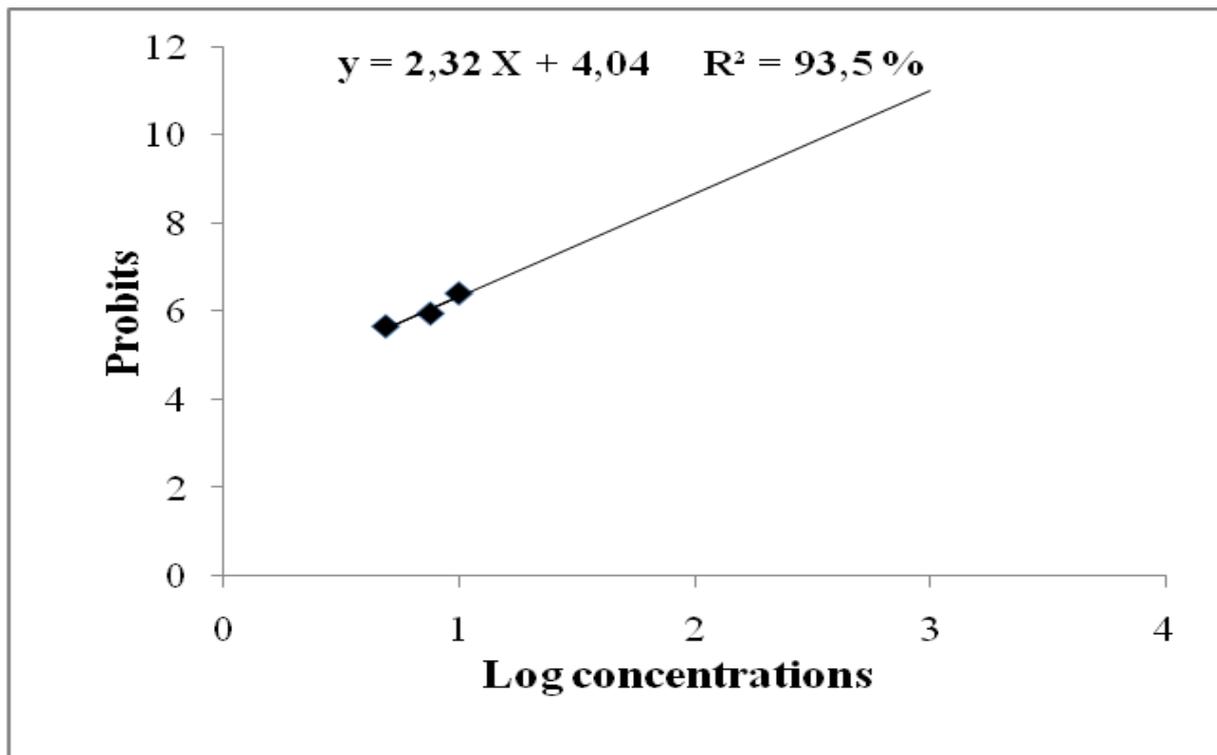


Figure 17. Toxicité du cadmium (mg/L) après 96 h d'exposition de *D. trunculus*. Analyse des probits.

3.2. Effet du cadmium sur les biomarqueurs durant l'exposition aigue et la restauration

3.2.1. Activité de l'acétylcholinestérase

L'activité enzymatique de l'AChE est déterminée selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961) au niveau du manteau de *D. trunculus*. Cette activité est exprimée en $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines.

L'activité de l'AChE a été mesurée durant la période d'exposition au cadmium (0, 24, 48, 72 et 96 h) et de restauration (0, 48 et 96 h). Au cours de la période d'exposition, les individus de *D. trunculus* traités avec le cadmium (CL₅₀-96 h) présentent une inhibition hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité spécifique de l'AChE après 48 h de traitement. L'inhibition maximale de l'AChE a été notée après 96 h d'exposition où on enregistre une valeur de $10,19 \pm 1,17 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines chez les traités contre $18,55 \pm 2,86 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines chez les témoins (Tableau 32, Fig. 18). Chez les témoins, les valeurs observées ne varient pas significativement ($p > 0,05$) en fonction du temps. L'analyse de la variance à deux critères de classification indique des effets traitement, une interaction temps/traitement hautement significatif ($p < 0,001$) et un effet temps très significatif ($p < 0,01$) (Tableau 33).

Pendant la période de restauration, une réduction significative ($p < 0,05$) de l'activité de l'AChE a été remarquée chez les séries traitées après 48 h comparativement aux témoins (Tableau 34, Fig. 19). De plus, l'ANOVA à deux critères de classification révèle qu'il y a un effet temps hautement significatif ($p < 0,001$) et un effet traitement très significatif ($p < 0,01$) (Tableau 35).

Tableau 32. Activité spécifique de l'AChE ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période d'exposition au cadmium (CL₅₀-96 h) ($m \pm \text{SD}$; $n = 5$). Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que celles d'un même temps suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes, $p > 0,05$.

Traitement	Durée d'exposition (heures)				
	0	24	48	72	96
Témoins	$16,82 \pm 1,35$ a A	$17,81 \pm 1,37$ a A	$16,08 \pm 1,14$ a A	$16,34 \pm 2,27$ a A	$18,55 \pm 2,86$ a A
Traités	$16,60 \pm 2,19$ a A	$14,65 \pm 1,62$ ab B	$12,84 \pm 0,97$ bc B	$11,93 \pm 1,65$ bc B	$10,19 \pm 1,17$ c B

Tableau 33. Activité spécifique de l'AChE ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période d'exposition au cadmium (CL_{50-96} h). Analyse de la variance à deux critères de classification (traitement/temps).

Sources de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Traitement	1	188,29	188,29	60,87	0,000***
Temps	4	57,04	14,26	4,61	0,004**
Interaction Traitements/Temps	4	86,92	21,73	7,02	0,000***
Erreur résiduelle	40	123,73	3,09	-	-
Totale	49	456,00	-	-	-

* significatif ($P < 0,05$) ** très significatif ($p < 0,01$) *** hautement significatif ($P < 0,001$)

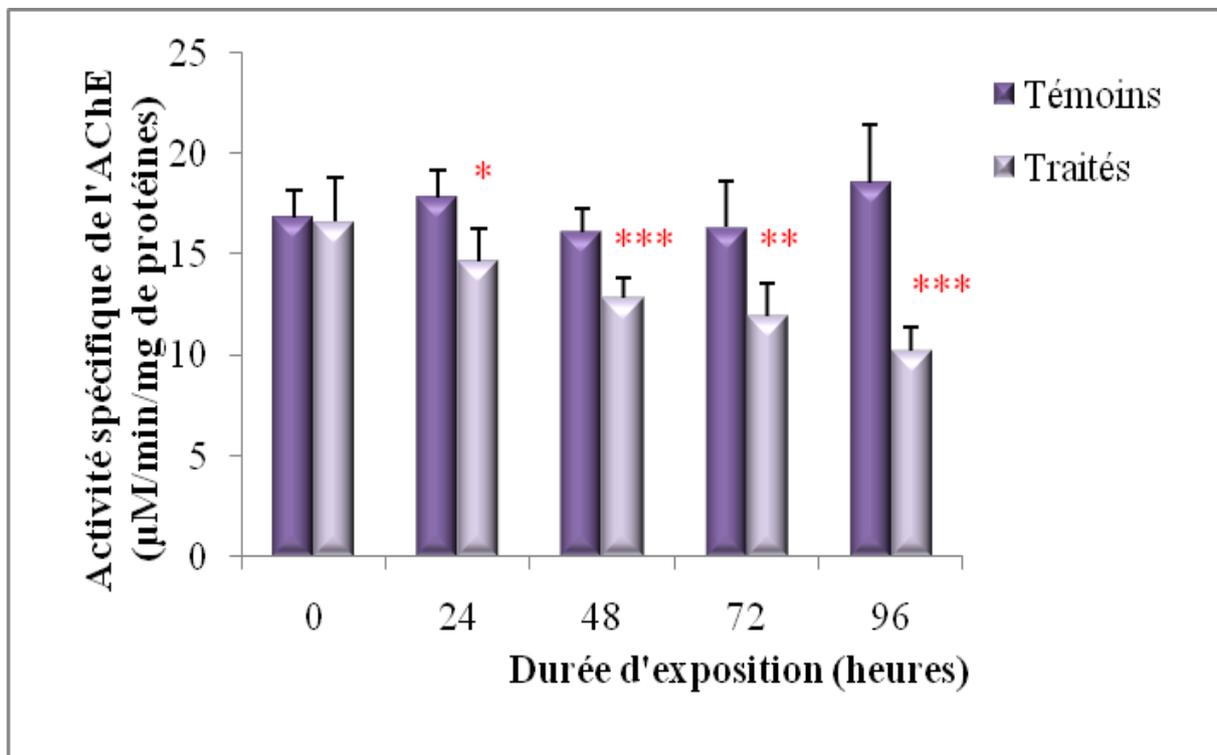


Figure 18. Activité spécifique de l'AChE ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant période d'exposition au cadmium (CL_{50-96} h) ($m \pm \text{SD}$; $n = 5$). Les astérisques au dessus des séries traités indiquent une différence significative (* : significatif à $P < 0,05$; ** : très significatif à $p < 0,01$; *** : hautement significatif à $P < 0,001$).

Tableau 34. Activité spécifique de l'AChE ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période de restauration (CL_{50-96} h) ($m \pm \text{SD}$; $n= 5$). Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que celles d'un même temps suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes, $p > 0,05$.

Traitement	Temps de restauration (heures)		
	0	48	96
Témoins	19,27 \pm 0,83 a A	18,13 \pm 0,58 a A	16,01 \pm 0,71 b A
Traités	17,99 \pm 1,68 a A	16,21 \pm 1,12 ab B	15,01 \pm 0,74 b A

Tableau 35. Activité spécifique de l'AChE ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période de restauration (CL_{50-96} h). Analyse de la variance à deux critères de classification (traitement/temps).

Sources de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Traitement	1	17,12	12,65	12,76	0,002**
Temps	2	42,75	21,66	21,85	0,000***
Interaction Traitements/Temps	2	0,91	0,45	0,46	0,638
Erreur résiduelle	20	19,83	0,99	-	-
Totale	25	80,61	-	-	-

* significatif ($P < 0,05$) ** très significatif ($p < 0,01$) *** hautement significatif ($P < 0,001$)

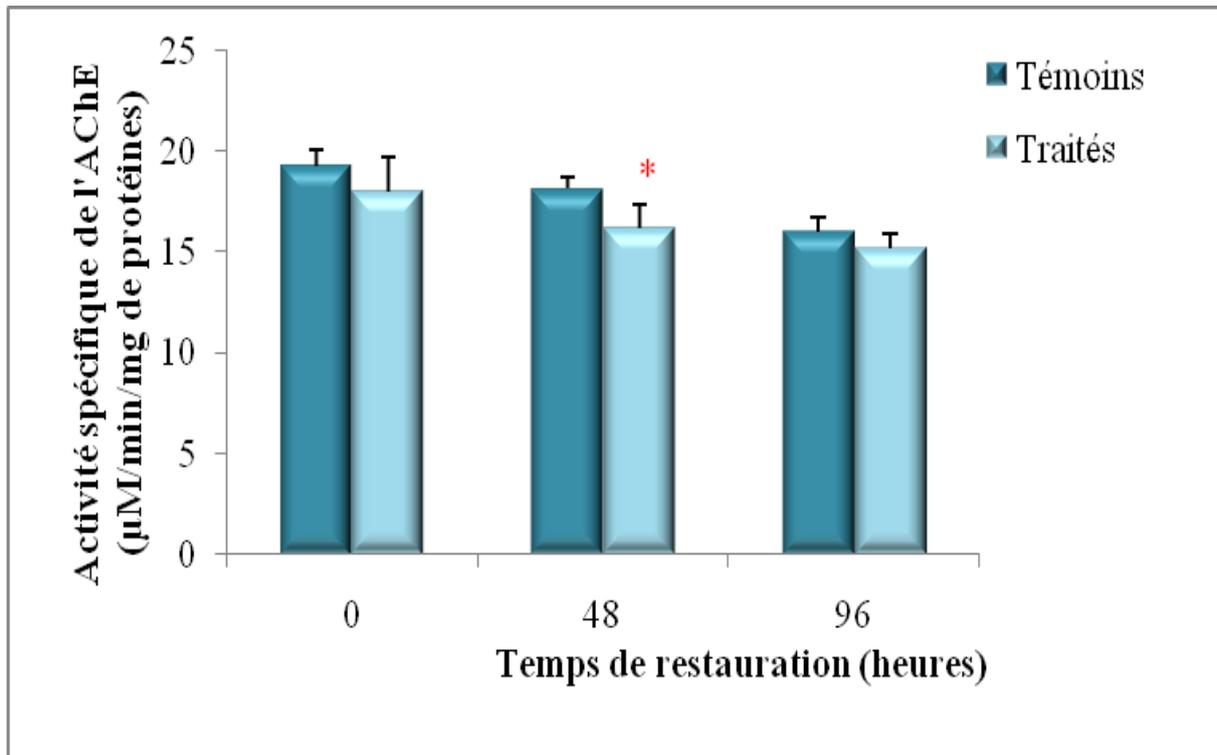


Figure 19. Activité spécifique de l'AChE ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période de restauration après exposition au cadmium (CL_{50} -96 h) ($m \pm \text{DS}$; $n= 5$). Les astérisques au dessus des séries traités indiquent une différence significative (* : significatif à $P < 0,05$).

3.2.2. Activité de la glutathion S-transférase

La détermination de l'activité spécifique de la GST ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) est estimée par application de la formule de Habig *et al.* (1974) au niveau du manteau de *D. trunculus*. Le traitement des individus de *D. trunculus* avec le cadmium (CL_{50} -96 h) provoque une augmentation marquée de l'activité spécifique de la GST après 24 h d'exposition. Les résultats relatifs à l'impact du cadmium sur l'activité de la GST sont représentés dans le tableau 36 et la figure 20. La comparaison des séries traitées avec les séries témoins par le test t de student révèle une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité GST après 24 et 48 h d'exposition ; cependant après 72 et 96 h de traitement on observe respectivement des différences hautement significative ($p < 0,001$) et très significative chez les individus traités à la CL_{50} . L'augmentation maximale de la GST a été enregistrée à la fin de l'expérience pour passer de $2,26 \pm 0,50 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines chez les témoins à $4,67 \pm 1,00 \mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines chez les traités. D'autre part, l'analyse de la variance à deux critères de classification indique qu'il y a un effet traitement et temps hautement significatif ($p < 0,001$), et interaction traitement/temps très significatif ($p < 0,01$) (tableau 37).

Durant la période de restauration, des différences très significatives ($p < 0,01$) de l'activité spécifique de la GST à 0 h et 48 h ont été remarquées chez les traités au cadmium après leur transfert dans le milieu non traités comparativement aux témoins (Tableau 38, Fig. 21). De plus, l'ANOVA à deux critères de classification indique des effets hautement significatifs ($p < 0,001$) du traitement, l'interaction traitement/temps et un effet significatif du temps ($p < 0,05$) (Tableau 39).

Tableau 36. Activité spécifique de la GST ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période d'exposition au cadmium (CL_{50} -96 h) ($m \pm \text{SD}$; $n = 5$). Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que celles d'un même temps suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes, $p > 0,05$.

Traitement	Durée d'exposition (heures)				
	0	24	48	72	96
Témoins	1,92 \pm 0,80 a A	1,65 \pm 0,10 a A	1,75 \pm 0,73 a A	1,83 \pm 0,32 a A	2,26 \pm 0,50 a A
Traités	1,90 \pm 0,47 a A	2,79 \pm 0,66 a B	3,09 \pm 0,63 a B	3,35 \pm 0,55 ab B	4,67 \pm 1,00 b B

Tableau 37. Activité spécifique de la GST ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période d'exposition au cadmium (CL_{50} -96 h). Analyse de la variance à deux critères de classification (traitement/temps).

Sources de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Traitement	1	17,94	17,64	45,76	0,000***
Temps	4	10,66	11,35	7,36	0,000***
Interaction Traitements/Temps	4	6,49	6,49	4,21	0,007**
Erreur résiduelle	33	12,72	12,72	-	-
Totale	42	47,83	-	-	-

* significatif ($P < 0,05$) ** très significatif ($p < 0,01$) *** hautement significatif ($P < 0,001$)

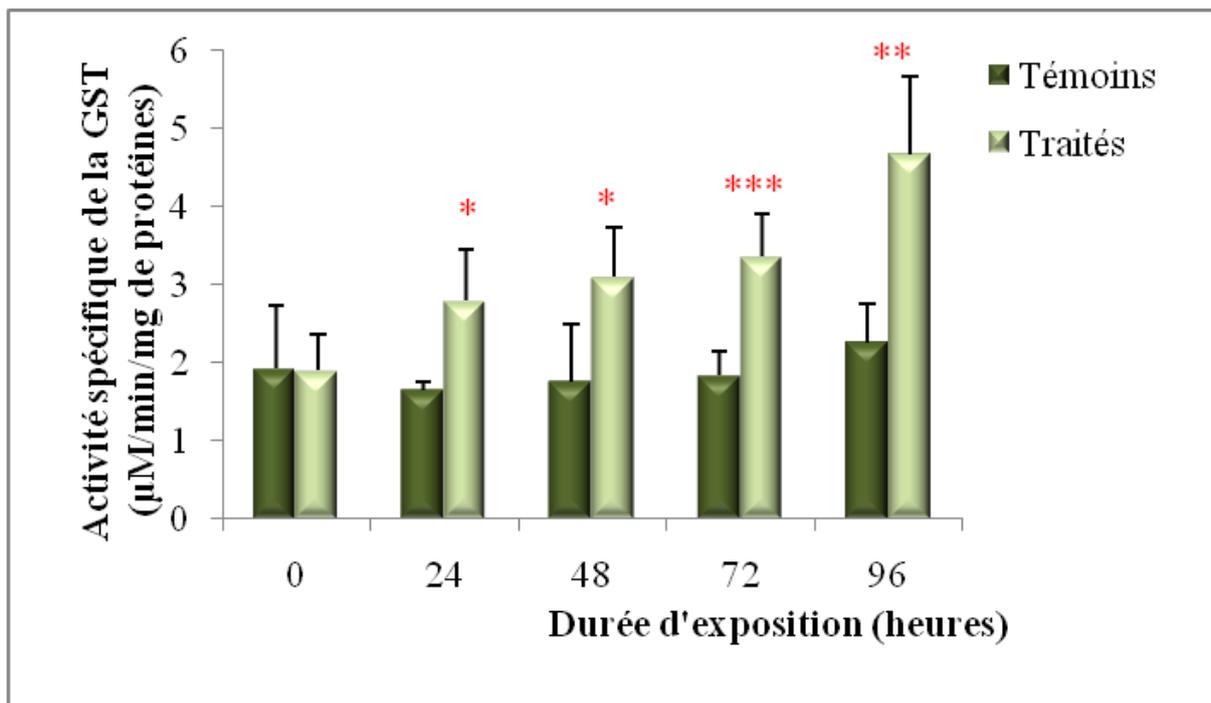


Figure 20. Activité spécifique de la GST ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant l'exposition au cadmium (CL_{50-96} h) ($m \pm \text{SD}$; $n=5$). Les astérisques au dessus des séries traités indiquent une différence significative (* : significatif à $P < 0,05$; ** : très significatif à $p < 0,01$; *** : hautement significatif à $P < 0,001$).

Tableau 38. Activité spécifique de la GST ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période de restauration (CL_{50-96} h) ($m \pm \text{SD}$; $n=5$). Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que celles d'un même temps suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes, $p > 0,05$.

Traitement	Temps de restauration (heures)		
	0	48	96
Témoins	$2,06 \pm 0,29$ a A	$2,33 \pm 0,25$ a A	$2,35 \pm 0,16$ a A
Traités	$4,03 \pm 0,74$ a B	$3,38 \pm 0,33$ ab B	$2,40 \pm 0,37$ b A

Tableau 39. Activité spécifique de GST ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période de restauration (CL_{50-96} h). Analyse de la variance à deux critères de classification (traitement/temps).

Sources de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Traitement	1	6,30	6,30	38,28	0,000***
Temps	2	1,88	0,94	5,72	0,012*
Interaction Traitements/Temps	2	3,68	1,84	11,20	0,001***
Erreur résiduelle	18	2,96	0,16	-	-
Totale	23	14,83	-	-	-

* significatif ($P < 0,05$) ** très significatif ($p < 0,01$) *** hautement significatif ($P < 0,001$)

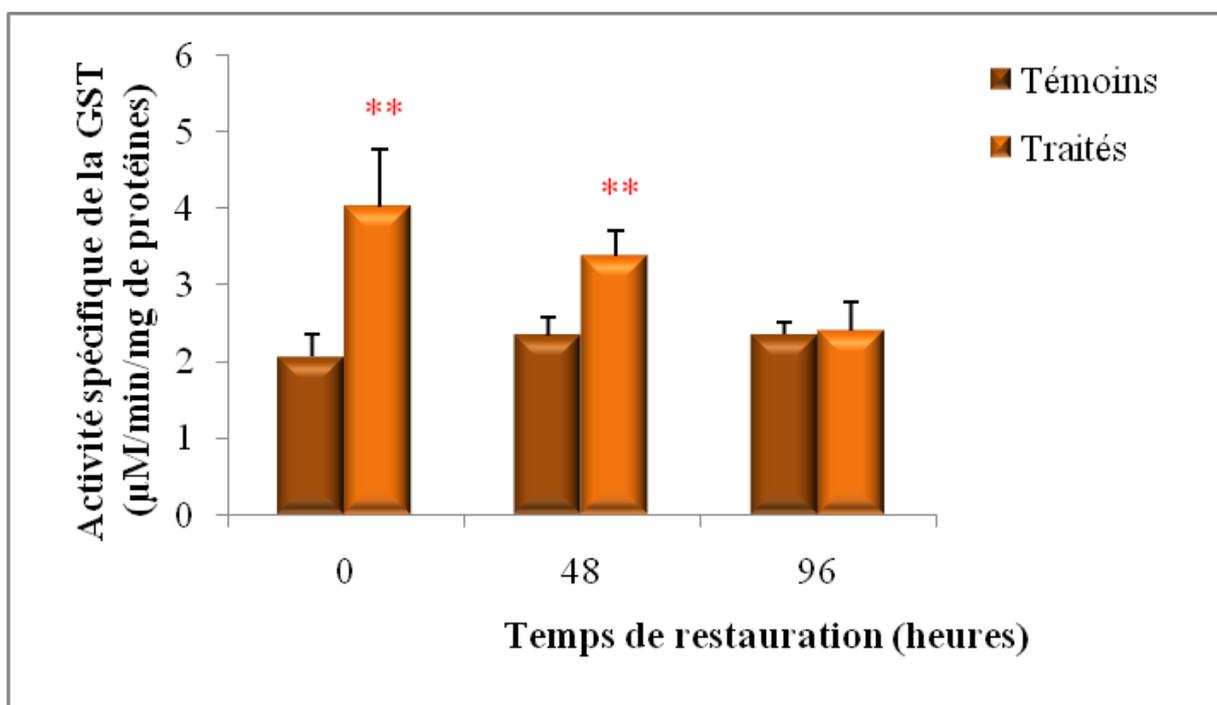


Figure 21. Activité spécifique de la GST ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période de restauration après exposition au cadmium (CL_{50-96} h) ($m \pm \text{DS}$; $n = 5$). Les astérisques au dessus des séries traités indiquent une différence significative (** : très significatif à $P < 0,01$).

3.2.3. Activité de la catalase

La détermination de l'activité enzymatique de la CAT ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) est réalisée selon Claiborne (1985) au niveau du manteau de *D. trunculus*. Comme réponse au traitement avec le cadmium (CL_{50} -96 h), les individus de *D. trunculus* présentent des variations de l'activité spécifique de la CAT au cours du temps d'exposition et de restauration. Chez les témoins, l'activité de la CAT varie de $0,53 \pm 0,22$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines au début de l'expérience à $0,75 \pm 0,10$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines après 96 h du traitement. Les résultats obtenus présentent après comparaison des moyennes par le test t de student chez les traités comparativement aux témoins une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité de la CAT à 24, 72 et 96 h d'exposition (Tableau 40, Fig. 22). Un effet traitement très significatif ($p < 0,01$), un effet temps significatif ($p < 0,05$) sont enregistrés après application d'une analyse de la variance à deux critères de classification (traitement/temps), une interaction Traitement/temps non significative ($p > 0,05$) a été notée (Tableau 41).

Au cours de la période de restauration, une induction significative ($p < 0,05$) a été remarquée chez les traités après 48 h pour passer de $0,51 \pm 0,10$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines à $0,71 \pm 0,14$ $\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines chez les témoins (Tableau 42, Fig. 23). L'ANOVA à deux critères de classification (traitement/temps) révèle un effet temps hautement significatif ($p < 0,001$), et des effets traitement et interaction traitement/temps non significatifs ($p > 0,05$) (Tableau 43).

Tableau 40. Activité spécifique de la CAT ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période d'exposition au cadmium (CL_{50} -96 h) ($m \pm \text{SD}$; $n = 5$). Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que celles d'un même temps suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes, $p > 0,05$.

Traitement	Durée d'exposition (heures)				
	0	24	48	72	96
Témoins	$0,53 \pm 0,22$ a A	$0,59 \pm 0,063$ a A	$0,61 \pm 0,10$ a A	$0,70 \pm 0,13$ a A	$0,75 \pm 0,10$ a A
Traités	$0,56 \pm 0,21$ a A	$0,79 \pm 0,10$ ab B	$0,84 \pm 0,29$ ab A	$0,97 \pm 0,21$ b B	$0,89 \pm 0,045$ ab B

Tableau 41. Activité spécifique de la CAT ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période d'exposition au cadmium (CL_{50-96} h). Analyse de la variance à deux critères de classification (traitement/temps).

Sources de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Traitement	1	0,355	0,334	11,14	0,002**
Temps	4	0,463	0,116	3,86	0,011*
Interaction Traitements/Temps	4	0,073	0,018	0,61	0,655
Erreur résiduelle	34	1,02	0,030	-	-
Totale	43	1,91	-	-	-

* significatif ($P < 0,05$) ** très significatif ($p < 0,01$) *** hautement significatif ($P < 0,001$)

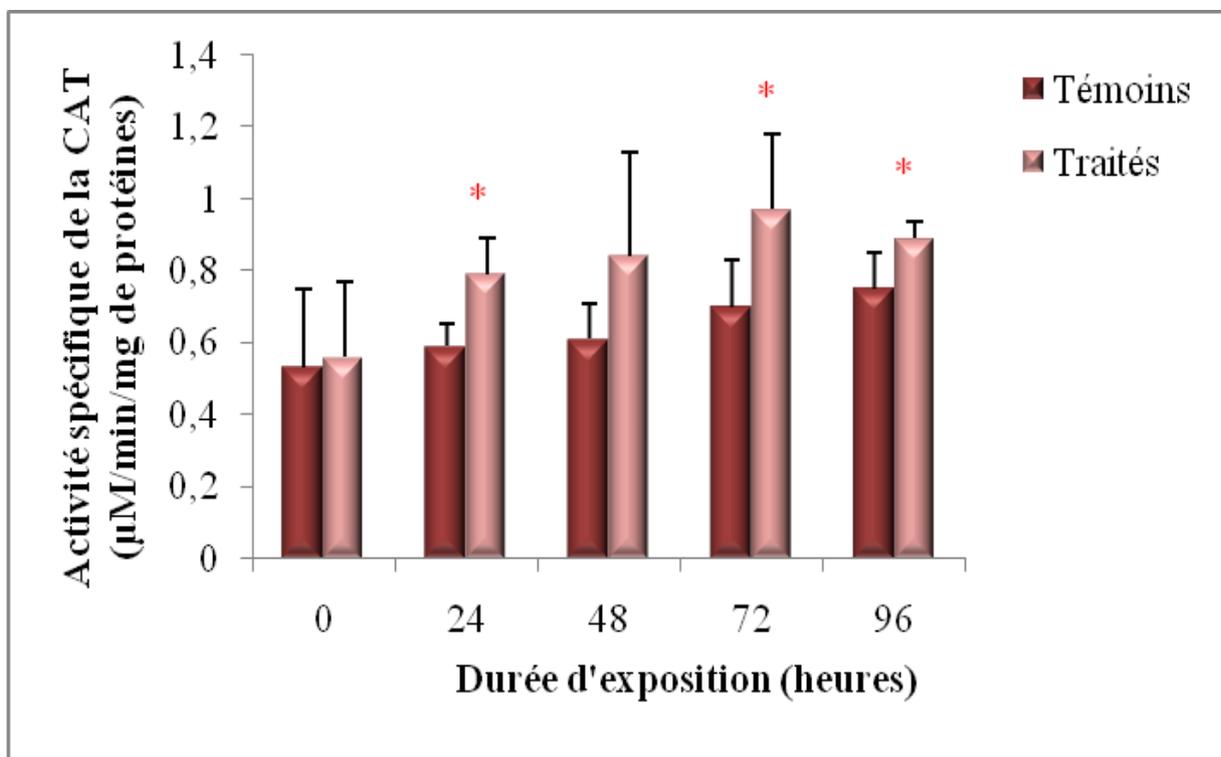


Figure 22. Activité spécifique de la CAT ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant l'exposition au cadmium (CL_{50-96} h) ($m \pm \text{SD}$; $n = 5$). Les astérisques au dessus des séries traités indiquent une différence significative (* : significatif à $P < 0,05$).

Tableau 42. Activité spécifique de la CAT ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période de restauration (CL_{50-96} h) ($m \pm \text{SD}$; $n= 5$). Les moyennes d'un même traitement suivies d'une même lettre en minuscule ne sont pas significativement différentes, tandis que celles d'un même temps suivies d'une même lettre en majuscule ne sont pas significativement différentes, $p > 0,05$.

Traitement	Temps de restauration (heures)		
	0	48	96
Témoins	$0,76 \pm 0,14$ a A	$0,71 \pm 0,14$ a A	$0,34 \pm 0,18$ b A
Traités	$0,77 \pm 0,21$ a A	$0,51 \pm 0,10$ ab B	$0,33 \pm 0,15$ b A

Tableau 43. Activité spécifique de CAT ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période de restauration (CL_{50-96} h). Analyse de la variance à deux critères de classification (traitement/temps).

Sources de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Traitement	1	0,050	0,029	1,17	0,292
Temps	2	0,764	0,388	15,61	0,000***
Interaction Traitements/Temps	2	0,062	0,031	1,25	0,306
Erreur résiduelle	21	0,522	0,024	-	-
Totale	26	1,40	-	-	-

* significatif ($P < 0,05$) ** très significatif ($p < 0,01$) *** hautement significatif ($P < 0,001$)

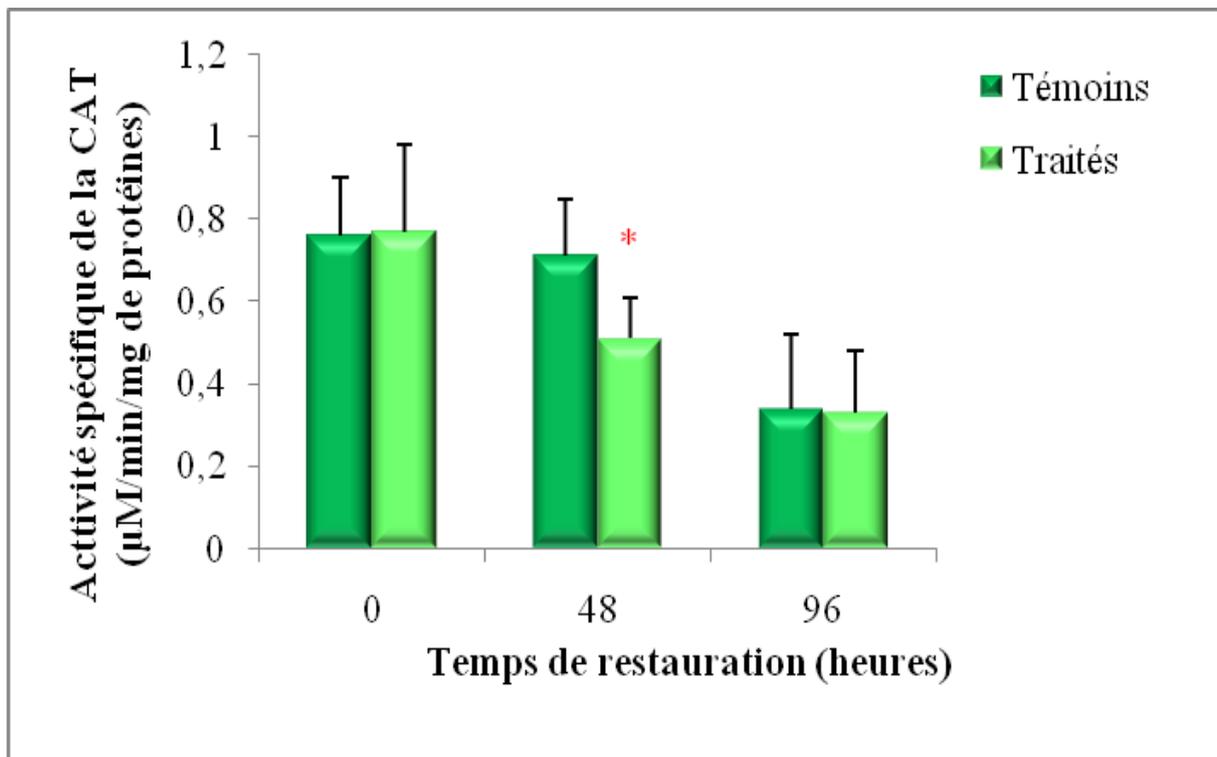


Figure 23. Activité spécifique de la CAT ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines) au niveau du manteau de *D. trunculus* durant la période de restauration après exposition au cadmium (CL_{50} -96 h) ($m \pm \text{DS}$; $n= 5$). Les astérisques au dessus des séries traités indiquent une différence significative (* : Significatif à $P < 0,05$).

3.3. Concentrations du cadmium dans les tissus de *D. trunculus*

Le dosage du Cd a été effectué dans le corps entier de *D. trunculus* par spectroscopie d'absorption atomique à flamme (SAA) selon la méthode de Scheifler *et al.* (2005). Les résultats obtenus après traitement par la CL_{50} (96 h) et CL_{25} (96 h) sont représentés dans le tableau 44 et la figure 24. La comparaison des moyennes par le test t de student indique qu'il y a de différences hautement significatives ($p < 0,001$) entre les témoins et les traités après 48 et 96 h d'exposition. Une augmentation de la concentration du cadmium a été observée pour passer de $0,00912 \pm 0,00281 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu sec chez les témoins à $0,1012 \pm 0,0116 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu sec chez les individus traités avec la CL_{25} et elle atteint une valeur de $0,1328 \pm 0,0329 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu sec chez les traités à la CL_{50} . Par contre, une différence non significative ($p > 0,05$) a été enregistrée entre les deux doses au cours d'une exposition aigüe (96 h). L'analyse de la variance à deux critères de classification (traitement/temps) de la concentration du cadmium indique un effet traitement hautement significative ($p < 0,001$), un effet temps non significatif ($p > 0,05$) et une interaction traitement/temps non significatif ($p > 0,05$) (tableau 45).

Après 96 h de restauration, les individus de *D. trunculus* présentent des variations non significatives ($p > 0,05$) chez les traités comparativement aux témoins (tableau 46, fig. 25). On note un

taux de réduction de la concentration du cadmium de 53,81 % et 68,28 % pour les CL₂₅ et CL₅₀ respectivement. L'ANOVA à deux critères de classification révèle un effet traitement hautement significatif (p<0,001), une interaction traitement/temps très significatifs (p<0,01) et un effet temps significatif (p<0,05) (Tableau 47).

Tableau 44. Concentrations du cadmium ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu sec) dans les tissus de *Donax trunculus* durant la période d'exposition. ($m \pm \text{SD}$, n= 3 pools comportant chacun 4 individus).

Traitement	Temps d'exposition (heures)	
	48	96
Témoins	0,00730 \pm 0,00661a A	0,00912 \pm 0,00281a A
CL ₂₅	0,0905 \pm 0,0311a B	0,1012 \pm 0,0116a B
CL ₅₀	0,0971 \pm 0,0223a B	0,1328 \pm 0,0329a B

Tableau 45. Analyse de la variance à deux critères de classification (traitement, temps) de la concentration du cadmium ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu sec) chez *Donax trunculus* durant la période d'exposition.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F _{obs}	P
Traitement	1	0,06479	0,03239	71,08	0,000***
Temps	2	0,00193	0,00193	4,25	0,051
Interaction traitement/temps	2	0,00154	0,00077	1,70	0,205
Erreur résiduelle	24	0,01093	0,00045	-	-
Totale	29	0,07921	-	-	-

* significatif (P< 0,05) ** très significatif (p< 0,01) *** hautement significatif (P< 0,001)

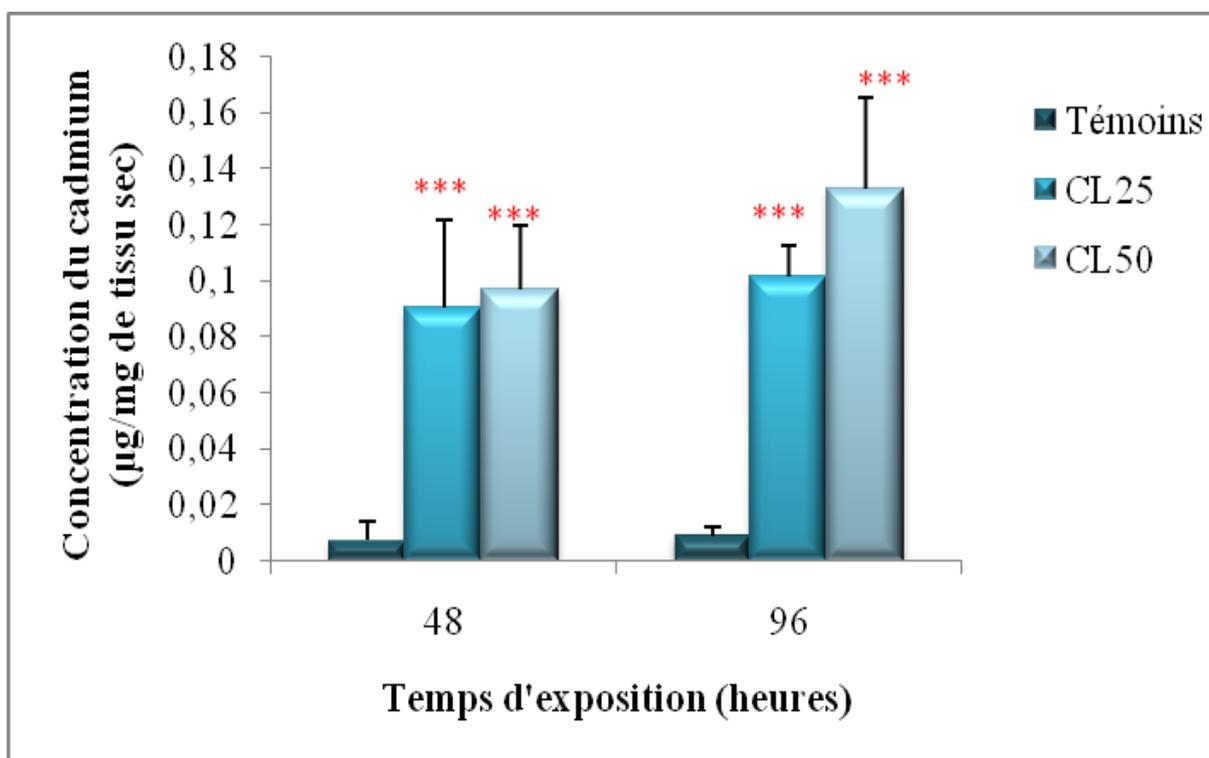


Figure 24. Concentration du cadmium ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu sec) chez *D. trunculus* pendant la période d'exposition ($m \pm \text{SD}$, $n=3$ pools). Les astérisques au dessus des séries traités indiquent une différence significative (***) : hautement significatif à $P < 0,001$).

Tableau 46. Concentration du cadmium ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu sec) chez *Donax trunculus* durant la période de restauration ($m \pm \text{SD}$, $n= 3$ pools comportant chacun 4 individus).

Traitement	Temps de restauration (heures)	
	0	96
Témoins	$0,00912 \pm 0,00281a$ A	$0,0371 \pm 0,0547a$ A
CL ₂₅	$0,1012 \pm 0,0116a$ B	$0,0525 \pm 0,0291b$ A
CL ₅₀	$0,1328 \pm 0,0329a$ B	$0,0665 \pm 0,0298b$ A

Tableau 47. Analyse de la variance à deux critères de classification (traitement, temps) de la concentration du cadmium ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu sec) chez *Donax trunculus* durant la période de restauration.

Sources de variation	DDL	SCE	CM	F obs	P
Traitement	1	0,03087	0,01543	15,54	0,000***
Temps	2	0,00630	0,006302	6,34	0,019
Interaction traitement/temps	2	0,01257	0,006286	6,33	0,006**
Erreur résiduelle	24	0,02383	0,000993	-	-
Totale	29	0,07358	-	-	-

* significatif ($P < 0,05$) ** très significatif ($p < 0,01$) *** hautement significatif ($P < 0,001$)

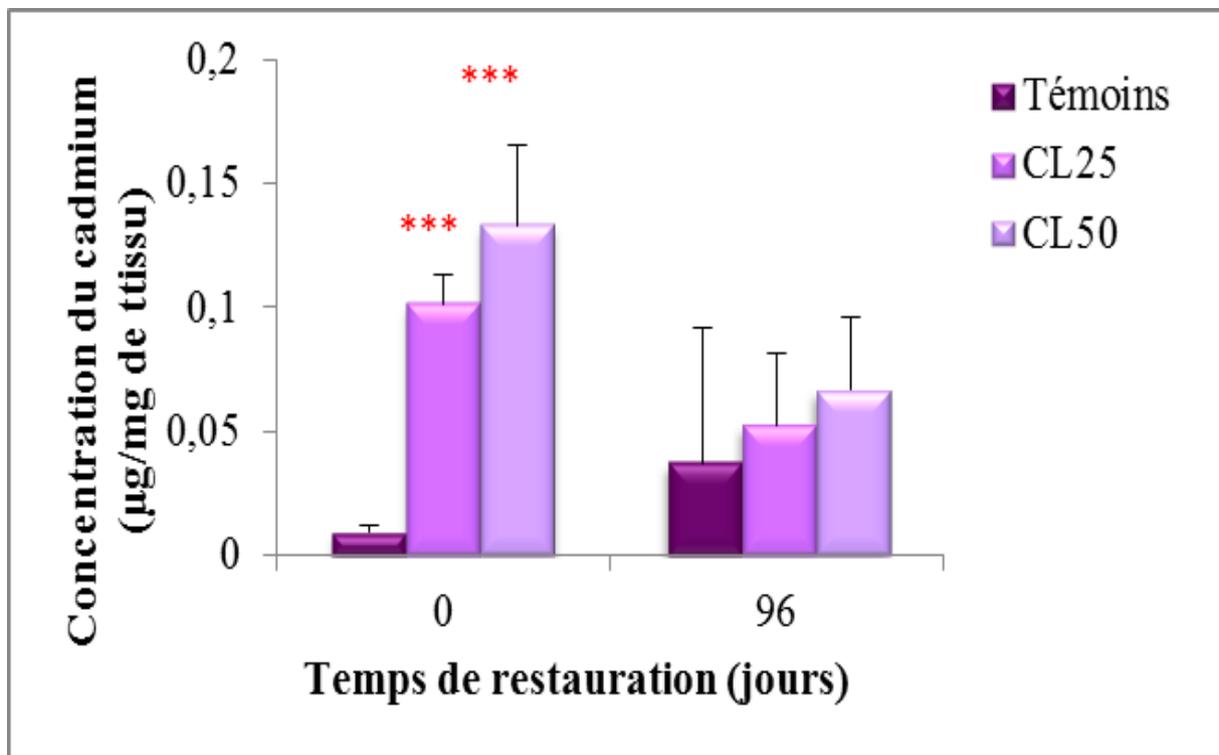


Figure 25. Concentration du cadmium ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu sec) chez *D. trunculus* pendant la période de restauration ($m \pm SD$, $n=3$ pools). Les astérisques au dessus des séries traités indiquent une différence significative (***) : hautement significatif à $P < 0,001$).

DISCUSSION

4. DISCUSSION

4.1. Toxicité aigüe du cadmium

Des essais de toxicité aigüe sur des individus adultes de *Donax trunculus* exposés au cadmium à différentes concentrations (5- 7,6 et 10 mg/L) ont été effectués afin d'estimer les concentrations létales 50 (CL₅₀) et 90 (CL₉₀) ainsi que leurs intervalles de confiance à 95% à différentes temps d'exposition (24, 48, 72 et 96 heures). Les données toxicologiques révèlent une toxicité du cadmium à l'égard de *D. trunculus* avec un effet dose et durée d'exposition. Les concentrations létales exprimées en mg/L sont de l'ordre de 13,61 ; 9,83 ; 4,27 ; 2,59 à 24, 48, 72, 96 heures respectivement pour les CL₅₀ alors que celles des CL₉₀ correspondent à 30,55; 28,43 ; 21,23 et 9,25 respectivement. Nos données sont proches de celles de Neuberger-Cywiak *et al.* (2002) obtenues chez la même espèce après une exposition de 48 et 96 h au cadmium : CL₅₀-48 h : 7,6 mg/L (intervalle de confiance de 5,6 - 10,0) et CL₅₀-96 h : 3,8 mg/L (intervalle de confiance de 1,0 - 5,6).

D'autres espèces de Poissons et de Mollusques Bivalves ont fait l'objet de nombreux essais toxicologiques afin d'estimer les CL₅₀ après une exposition de 96 h au même métal lourd. La toxicité du cadmium observée chez de nombreux organismes aquatiques porte surtout sur plusieurs paramètres physiologique qui dépendent des espèces testées et des conditions expérimentales (Chiffolleau *et al.*, 1999). Chez les espèces de Mollusque, la CL₅₀-96 h est de 0,22 mg/L chez *Perna indica* (Baby & Menon, 1987), 2,7 µg/L chez *Vellorita cyprinoides* (Abraham *et al.*, 1986) et 0,71 mg/L chez *Mytilopsis sallei* (Uma Devi, 1996). Dans notre étude, la CL₅₀-96 h du Cd chez *D. trunculus* apparaît plus élevée comparativement aux autres Mollusques, mais néanmoins relativement comparables à celle rapportée sur la même espèce (Neuberger-Cywiak *et al.*, 2002). Ceci suggère une plus grande résistance de *D. trunculus* face à l'exposition au cadmium. De plus, le cadmium manifeste à l'égard de *D. trunculus* une toxicité qui varie en fonction du sexe, de la concentration et la durée d'exposition. En effet, le cadmium provoque chez *D. trunculus* traité à la CL₅₀-96 h et CL₉₀-96 h une mortalité plus élevée chez les adultes femelles comparativement aux mâles après 24, 48, 72 et 96 h d'exposition. Cela peut être lié à une réduction de la mobilisation des réserves énergétiques et des précurseurs vitellogéniques durant la période de reproduction. Ces résultats suggèrent d'une relative sensibilité des femelles qui accumulent plus de réserves et mobilisent plus d'énergie lors de leur reproduction.

La toxicité de ce métal chez le Mollusque Gastéropode *Bullia digitalis* révèle une CL₅₀-96 h de 0,9 mg/L (Brown, 1982) et de 8 mg/L chez le Mollusque Bivalve *Ruditapes decussatus* (Vicente *et al.*, 1988). D'autre part, Ramakritiman *et al.* (2012) estime une CL₅₀-96 h du Cd de 9,19 mg/L et

0,22 mg/L chez les Mollusques *Cerithedia cingulata* et *Modiolus philippinarum* respectivement. Les travaux menés par Spehar *et al.* (1978) sur le Poisson *Jordanella floridae* signalent une CL₅₀-96 h de 2,5 mg/L, tandis que la CL₅₀-72 h du Cd est de 4,87 mg/L chez le Poisson *Mugil seheli* (Hamed, 2002). El-Moselhy (2001) a obtenu chez *Mugil seheli* après 24, 48, 72 et 96 heures d'exposition les CL₅₀ de 12,34 ; 8,92 ; 6,01 et 3,45mg/L, respectivement. Tandis que chez le Poisson d'eau douce *Tilapia Mossambicus*, la CL₅₀-96 h est de 4,8 mg/L (Anushia *et al.*, 2012). Chez *Gambusia affinis*, les CL₅₀ sont de l'ordre de 35,48 ; 18,10 ; 15,66 et 9,34 mg/L à 24, 48, 72 et 96 h d'exposition (Chouahda, 2010). La CL₅₀-96 h a été reporté chez d'autre espèces de Poisson comme *Channa punctata* (Bloch) (Teleostéen) exposées à différentes concentrations du cadmium est 14,95 mg/L (Tiwari *et al.*, 2011), est de 5,4 mg/L chez *Garra mullya* (Wani and Latey, 1983), 16,71 mg /L chez *Oreochromis mossambicus* (James *et al.*, 1991), 173,78 mg/L chez *Rita rita* (Ghosh & Mukhopadhyay, 2000), 121,8 mg/L chez *Cyprinius carpio* (Muley *et al.*, 2000), et 17,9 mg/L chez *Cherax tenuimanus* (Chambers, 1995). Shuhaimi-Othman *et al.* (2011) ont obtenu chez *Stenocypris major* (Arthropode : Ostracode) une CL₅₀-96 h de 13,15 µg/L. Se basant sur ces concentrations létales *D. trrunculus* semble relativement plus sensibles au cadmium que les autres espèces citées.

4.2. Effet du cadmium sur les biomarqueurs du stress environnemental

4.2.1. Activité de l'acétylcholinestérase

Les acétylcholinestérases (AChE : EC 3.1.1.7) sont des enzymes essentielle dans le système nerveux des vertébrés et invertébrés, où elles sont responsables de la dégradation de l'acétylcholine, un neurotransmetteur, dans la fente synaptique (Varo *et al.*, 2012) ; elles catalysent l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique (Matozzo *et al.*, 2005). Dans les jonctions neuromusculaires et interneurales, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui va permettre la transmission de l'influx nerveux. Lors d'une stimulation nerveuse, l'acétylcholine libérée des terminaisons nerveuses dans l'espace synaptique, active les récepteurs cholinergiques post-synaptiques. L'interaction de l'acétylcholine avec le récepteur provoque une dépolarisation de la membrane post-synaptique, générant ainsi un potentiel d'action qui assure la transmission du signal nerveux. L'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase permet au système de revenir à son état de repos (Bocquené *et al.*, 1997). De nombreuses études ont montré que l'inhibition de l'AChE peut perturber la bonne transmission de l'influx nerveux (Payne *et al.*, 1996; Guilhermino *et al.*, 2000). L'AChE est le site cible d'inhibition essentiellement par les insecticides organophosphorés et carbamates (Kavitha & Venkateswara, 2007) et les métaux lourds (Amiard-Triquet *et al.*, 1998).

L'inhibition de l'AChE par les polluants neurotoxiques induit une transmission permanente de l'influx nerveux causant de nombreuses anomalies telles que la paralysie et même la mort (Matozzo *et al.*, 2005). L'AChE peut être donc considérée comme l'un des biomarqueurs de non-compensation qui représentent des marques plus ou moins indélébiles de l'exposition à des polluants neurotoxiques (Lagadic *et al.*, 1997). Des études *in vitro* et *in vivo* menées sur des mammifères, des poissons ou des invertébrés ont signalé une inhibition de l'AChE par des métaux, parmi lesquels le cadmium (Schmidt & Ibrahim, 1994 ; Labrot *et al.*, 1996).

L'analyse des résultats obtenus sur l'activité de l'acétylcholinestérase mesurée au niveau du manteau de *D. trunculus* traités avec le cadmium à la CL₅₀-96 h (2,59 mg/L) révèle une inhibition de l'activité de cette enzyme au cours de la durée d'exposition (96 h). Cette inhibition est due à l'effet neurotoxique induit par l'exposition au cadmium. Des études ont montré que les éléments métalliques comme le mercure, le cadmium, le cuivre ou le zinc inhibent l'activité de l'acétylcholinestérase (Frasco *et al.*, 2005; Varo *et al.*, 2012; Tu *et al.*, 2012). Badiou & Belzunces (2008) ont montré que la diminution de l'AChE est utilisée en tant que biomarqueur de neurotoxicité. L'inhibition de l'AChE a donc été suggérée comme une indication du stress général (Kamel *et al.*, 2012) et utilisée dans les programmes de biosurveillance (Escartin & Porte, 1997; Stien *et al.*, 1998; Mora *et al.*, 1999 ; Roméo *et al.*, 2003). En effet, le développement des biomarqueurs de pollution et leur intégration dans les programmes de surveillance des milieux aquatiques ont montré l'intérêt de l'activité AChE pour évaluer l'effet neurotoxique des organophosphorés (OPs), des carbamates (Cs) et de métaux traces sur les espèces aquatiques (Galgani *et al.*, 1992 ; Bonacci *et al.*, 2008).

L'inhibition de l'activité de l'AChE par différents types de polluants a été l'objet de plusieurs études après une exposition au Cd chez les Bivalves (Sokolova *et al.*, 2005) exposés, les Poissons traités au cadmium (Baldissorotto *et al.*, 2005) et chez les Crustacés exposés à différents métaux dont le Cd (Ferrer *et al.*, 2005). Cette inhibition a été observée chez les espèces suivantes de Mollusque : *Cerastoderma glaucum* exposée à une pollution métallique (surtout Cd) (Machreki-Ajmi *et al.*, 2008), *Ruditapes decussatus* exposée au Cu (Hamza-Chaffai *et al.*, 1998), *Ruditapes philippinarum* et *Crassostrea gigas* exposées aux composés organochlorés (Bris *et al.*, 1995), *Mytilus galloprovincialis* exposée aux pesticides (Mora *et al.*, 1999), *Mytilus trossulus* exposée à différents métaux (Cu, Pb, Ni, Zn, Hg) (Kopecka *et al.*, 2004) et chez *Perna viridis* exposé au cadmium à différentes concentrations (Rajkumar & John Milton, 2011). En outre, des études ont été effectuées sur *D. trunculus* au niveau du golfe d'Annaba ont montré une diminution de l'activité de l'AChE en rapport avec la pollution notamment métallique (Abbes *et al.*, 2003 ; Abdenour *et al.*, 2004 ; Beldi *et al.*, 2006 ; Sifi *et al.*, 2007; Amira *et al.*, 2011 ; Soltani *et al.*, 2012). L'inhibition de l'activité de

l'AChE a été également notée chez les Mollusques *M. galloprovincialis* et *Perna perna* traités avec le Cu (Najimi, 1997), ainsi que chez la moule bleu *M. edulis* exposée au azamethiphos (Canty *et al.*, 2007), et la moule *Dreissena polymorpha* traitée au chlorpyrifos et terbutylazine (Binelli *et al.*, 2006). Chez d'autres organismes aquatiques une diminution de l'activité de l'AChE a été enregistrée comme chez les Poissons *G. affinis* exposé au FCX (Zaidi & Soltani, 2010) et au chlorpyrifos (Venkateswara *et al.*, 2005) et *Sparus aurata* après 24 h d'exposition au cadmium (Souid *et al.*, 2012).

En outre, l'activité AChE est extrêmement variable entre les espèces (Bocquené *et al.*, 1990). Par exemple, lorsque les juvéniles de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus oncorhynchus*) ont été exposés à 24 et 96 h aux différentes doses du cadmium, aucune modification n'a été observée de l'activité enzymatique de l'AChE (Beauvais *et al.*, 2001). De plus, les facteurs naturels doivent être pris en compte, car les variations environnementales peuvent avoir un effet direct ou indirect sur l'activité AChE tels que, la température de l'eau, est le paramètre environnemental le plus déterminant sur l'activité AChE (Bocquené & Galgani, 2004). D'après Escartin & Porte (1997) la température de l'eau fait augmenter la susceptibilité des bivalves à accumuler les pesticides présents dans le milieu. L'activité de l'AChE varie aussi selon les sites et les saisons et cette variation est probablement due aux deux facteurs exogènes (variation des facteurs du milieu, disponibilité des polluants) et endogènes (état physiologique de l'animal) (Boussoufa *et al.*, 2012).

Les résultats relatifs à la période de restauration montrent une augmentation significative de l'activité de l'AChE chez les individus de *D. trunculus*. La diminution de l'activité de cet enzyme au niveau du manteau de *D. trunculus* après traitement avec le cadmium est suivie d'une récupération progressive après 0, 48 et 96 h. Ces résultats traduisent la capacité de cette espèce à résister au stress causé par le cadmium. Zaidi & Soltani (2010) ont remarqué chez les femelles de *G. affinis* traités avec DFB et FCX, que l'activité de l'AChE a été récupérée après 4 et 8 jours. Morgan *et al.* (1990) ont rapporté que les Poissons *Salmo salar* intoxiqués par le fénitrothion peuvent récupérer leur activité AChE au bout de 6 semaines de restauration. *Rhamdia quelen*, exposée au cadmium pendant 7 et 14 jours, a récupéré son activité AChE après 14 jours de restauration (Pretto *et al.*, 2010).

4.2.2. Activité de la glutathion S-transférase

Le processus de métabolisation des xénobiotiques implique une activation des systèmes enzymatiques de la phase I ainsi que les enzymes de la phase II tels que les glutathion-S-transférases (GST). De ce fait, ces réponses biochimiques sont couramment utilisées comme biomarqueurs de pollution du milieu aquatique (Livingstone *et al.*, 1993 ; Bouraoui *et al.*, 2008). Les glutathions S-transférases (GST : E.C.2.5.1.18) sont des enzymes qui catalysent la conjugaison du

glutathion (possède un groupement nucléophile -SH) à une grande variété de composés (porteurs de groupements électrophiles) et également impliquée dans le transport et l'élimination de composés réactifs qui effectuent d'autres fonctions antioxydantes (Sies, 1993 ; Livingstone, 2003). Ce sont des isoenzymes de la phase II du processus de détoxification cellulaire (Elia *et al.*, 2003). Pendant cette phase II (phase de conjugaison), les métabolites des xénobiotiques, déjà rendus moins hydrophobes par les réactions d'oxydation ou d'hydroxylation de la phase I, sont transformés en substances encore plus hydrosolubles. Les composés ainsi conjugués au GSH sont souvent moins toxiques et peuvent ensuite être expulsés plus facilement de la cellule (Salinas & Wong, 1999). Ces enzymes sont généralement solubles (cytosoliques) et présentes sous plusieurs isoformes, dont certaines sont inductibles par les contaminants qu'elles rendent moins toxiques. Les GST ont été mises en évidence dans la plupart des êtres vivants tels que la levure (Foley & Sheehan, 1998), les mollusques (Fitzpatrick & Sheehan, 1993; Fitzpatrick *et al.*, 1995; Blanchette & Singh, 1999), les vers de terre (Stenersen *et al.*, 1979, Borgeraas *et al.*, 1996), les crustacés (Keeran & Lee, 1987; Leblanc & Cochrane, 1987), les insectes (Stenersen *et al.*, 1987; Prapanthadara *et al.*, 1996), les poissons (George & Young, 1988; Martínez-Lara *et al.*, 1997; Pérez-López *et al.*, 2000), les mammifères (Habig *et al.*, 1974; Kamisaka *et al.*, 1975; Rouimi *et al.*, 1996; Bolton & Ahokas, 1997) et les plantes (Pascal *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 1999). L'activité de la GST a également été largement utilisée comme un biomarqueur de stress (Fitzpatrick *et al.*, 1997 ; Shailaja & D'Silva, 2003; Cunha *et al.*, 2007).

Le stress oxydatif provoqué par le Cd a été bien documenté dans de nombreux animaux aquatiques (Reddy & Bhagyalakshmi 1994; Roméo *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2002; Risso-de Faverney *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). Les enzymes antioxydantes constituent le système de défense majeur contre les ROS (Lei *et al.*, 2011) ; cependant, les réponses varient selon les espèces, les enzymes, et les contaminants (Livingstone, 2001). Des études qui ont été faites au sein de notre laboratoire sur *G. affinis*, ont montré que l'augmentation de l'activité de la GST est hautement corrélée avec la diminution du taux de GSH, ce qui suggère que le xénobiotique conjugué par le GSH est catalysé par la GST pour réduire son effet toxique (Zaidi & Soltani, 2011 ; Chouahda & Soltani, 2009). Dans la présente étude, une induction de l'activité spécifique de la GST a été enregistrée chez *D. trunculus* traité avec le cadmium (CL₅₀-96 h) dans les différents temps d'exposition. L'augmentation de l'activité de la GST après le traitement est une forme de défense qui traduit la détoxification du xénobiotique dans l'organisme pour permettre son élimination. Des études similaires ont révélé une induction de la GST chez les Mollusques Bivalves tels que *Ruditapes decussatus* suite à une exposition à différents HAP (Hoarau *et al.*, 2001), et aussi traité par les effluents municipales (Kamel *et al.*, 2012), *Perna viridis* exposé à différentes doses du cadmium, cuivre, plomb et au zinc

(Rajkumar & John Milton, 2011), ainsi que chez *D. trunculus* pêché au niveau d'un site pollué (Amira *et al.*, 2011 ; Soltani *et al.*, 2012). L'induction de cette enzyme a été aussi rapportée chez le Mollusque Bivalve *Pecten maximus* traité par le tributyltén (TBT), l'éthylméthane et le sulfatane (Le Penneec & Le Penneec, 2003). En effets, le Cd provoque l'induction de la GST chez plusieurs espèces tels que les Poissons d'eau douce : *Channa punctatus* (Dabas *et al.*, 2012), *G. affinis* (Chouahda & Soltani, 2009) et *Rhamdia quelen* (Pretto *et al.*, 2011). Concernant les polluants organiques on note également une induction de la GST avec le flucycloxyuron (pesticide) chez *G. affinis* (Zaidi & Soltani, 2011), avec le naphthalène chez *Anguilla anguilla* (Teles *et al.*, 2003). Wu *et al.* (2011) ont observé chez *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acrididae) une augmentation de l'activité de la GST après traitement au malathion (pesticide organophosphoré). De plus, la stimulation de l'activité de la GST a été observée par Won *et al.* (2011) chez l'Annélide polychète *Perinereis nuntia* après exposition au Cd, et aussi chez *Laonereis acuta* subit au même traitement (Sandrini *et al.*, 2008). La réponse de l'activité de la GST dépend de plusieurs facteurs comme le type de xénobiotique, la concentration, le temps d'exposition et de l'espèce (Oruç & Ünner, 2000).

De nombreuses études ont montré après exposition aux polluants une augmentation et / ou réduction de la GST dans divers organismes aquatiques (Geracitano *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2004; Ait Alla *et al.*, 2006). En fait, une inhibition de cette dernière a été observée chez la moule *Mytilus galloprovincialis* contaminée par le benzo[a]pyrène (Akcha *et al.*, 2000). Des études menées aussi en terrain ont montré de même une inhibition de la réponse des GST chez des Bivalves *Scrobicula plana* collectés dans un site contaminé par comparaison à des organismes provenant de sites de référence (Erkuden *et al.*, 2004). De même, une étude menée par Stephensen *et al.* (2000) a montré une absence de changement chez le Poisson *Myoxocephalus scorpius* provenant des sites contaminés par rapport à leurs témoins relatifs.

Les résultats obtenus durant la période de restauration (96 h) révèlent une diminution progressive de l'activité de la GST. Cette diminution traduit la récupération rapide de l'activité de l'enzyme. Après de nombreuses recherches, aucun travail sur l'activité de l'AChE, la CAT et la GST chez les Mollusques Bivalves traités par les polluants en période de restauration n'a été trouvé. En effet, chez les Poissons les mêmes observations ont été signalées, *Rhamdia quelen* exposé au Cd, il a été récupéré son activité initiale après 7 et 14 jours de restauration (Pretto *et al.*, 2011), chez *G. affinis* traités avec le diflubenzuron et flucycloxyuron, l'activité de la GST a été récupéré après 1 et 2 jours respectivement. Cependant, la récupération est plus chez les individus traités avec le (DFB), et ceci est en fonction de la dose utilisée durant le traitement (Zaidi & Soltani, 2011).

4.2.3. Activité de la catalase

Le stress oxydatif peut provenir de la production accrue des espèces réactives de l'oxygène (ROS) induites par des métaux lourds et de nombreux contaminants organiques (Livingstone, 2001). Les ROS stimulent l'activité des enzymes antioxydantes (Bagnyukova *et al.*, 2006). Les antioxydants au sens large représentent l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les ROS (Sies, 1997a; 1997b). Ces antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces ROS, en les piégeant pour former un composé stable. Les mécanismes d'actions antioxydantes agissent pour éliminer ces espèces réactives ainsi que leurs catalyseurs, induire la synthèse des antioxydants et augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées (Cossu *et al.*, 1997). Les enzymes antioxydantes sont des biomarqueurs du stress oxydatif ; cependant, les réponses à la pollution varient selon les espèces, les enzymes, et les contaminants (Pandey *et al.*, 2003). Le Cd peut diminuer la concentration et/ou l'activité des antioxydants ou conduire à leur augmentation dans les cellules en fonction de l'importance du stress (Ochi *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 1997; Dagnino *et al.*, 2007; Cuypers *et al.*, 2010).

La catalase (CAT : EC 1.11.1.6) est une enzyme antioxydante impliquée dans la défense de la cellule contre les effets toxiques du peroxyde d'hydrogène en catalysant sa décomposition en eau et oxygène, c'est un biomarqueur de stress oxydatif (Almeida *et al.*, 2007; Jebali *et al.*, 2007). Les catalases sont des hémoprotéines tétramériques ayant un atome de fer par sous-unité, ont une masse d'environ 240 KDa. Elles sont sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydatif, comme les HAP, PCB ou certains pesticides (Livingstone, 1993) et les métaux (Labrot *et al.*, 1996). Dans le présent travail, l'exposition de *D. trunculus* au Cd (CL₅₀-96 h) produit une augmentation significative de l'activité de la CAT après 24 h d'exposition. L'induction de l'activité spécifique de la CAT en corrélation avec le SOD constitue la première ligne de défense contre le stress oxydatif (Asagba *et al.*, 2008). L'augmentation de l'activité de la CAT chez *D. trunculus* par rapport aux témoins suggère l'élimination des H₂O₂ résultant de l'exposition au Cd. De nombreuses études ont montré des changements de l'activité de la CAT lors de l'exposition au Cd. Verlecar *et al.* (2008) signalent que les métaux lourds (Cd, Cu, Pb, et Zn) peuvent induire une augmentation de l'activité CAT chez les Bivalves. Une augmentation de la CAT a été observée dans les tissus de *Perna viridis* exposé au cadmium, cuivre, zinc et au plomb (Rajkumar & John Milton, 2011) et dans la glande digestive de *Ruditapes decussatus* exposés aux effluents municipaux traités (Kamel *et al.*, 2012), ainsi que chez *D. trunculus* pêché au niveau d'un site pollué (Amira *et al.*, 2011). Une induction de l'activité de la CAT chez *Mytilus galloprovincialis* a été remarquée au niveau des sites pollués (Box *et al.*, 2007). Plusieurs contaminants organiques tels que les pesticides et les fertilisants ont induisent

une induction de l'activité de la CAT chez les organismes marins (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1993; Solé *et al.*, 1995; Cossu *et al.*, 1997; Khessiba *et al.*, 2001, 2005). L'augmentation de la CAT a été aussi observée chez les Poissons ; exemple, dans l'hépatopancréas de *Gambusia affinis* traité avec diflubenzuron et flucycloxyuron (Zaidi & Soltani, 2010 ; 2013), dans le foie de *Rhamdia quelen* après 7 et 14 jours de traitement avec le cadmium (Pretto *et al.*, 2011) ainsi chez *Sparus aurata* après 24 h d'exposition au métal polluant (Souid *et al.*, 2012). Différentes concentrations du Cu, Cd, Zn et Cr (0,1 à 1,5 mg/L) augmentent l'activité de la CAT dans le foie de Tilapia du Nil *Oreochromis niloticus* après 96 h d'exposition (Atli *et al.*, 2006). Chez *Leporinus obtusidens* l'exposition au Zn (2,3 et 4,6 mg/L) et au Cu (0,02 and 0,04 mg/L) pendant 30 et 45 jours provoque l'augmentation de l'activité de la CAT (Gioda *et al.*, 2007). Dabas *et al.* (2012) ont observé une augmentation de la CAT dans le foie de *Channa punctatus* traité avec le Cd en réponse à H₂O₂ produit par le SOD. D'autre part, la diminution de l'activité de la CAT a été rapportée par plusieurs auteurs. Par exemple, chez le Poisson *Esomus danricus* traité avec le cuivre (Vutukuru *et al.*, 2005), chez *G. affinis* exposé au pesticide chlorpyrifos (Kavitha & Venkateswara Rao, 2008). Par contre, aucune variation de l'activité de cet enzyme n'a été enregistrée dans le foie de *Rhamdia quelen* exposé à un herbicide Roundup 48% (Cavalheiro de Menezes *et al.*, 2011), de même que chez *Oreochromis niloticus* après exposition au pesticide organofluorine l'etoxazole (Sevgiler *et al.*, 2004).

De plus, lors du transfert dans une eau non contaminée (période de restauration), l'activité de la CAT a été récupérée ; en effet, nous avons enregistré une diminution significative après 48 h. Des résultats similaires ont été observés chez le Poisson téléostéen *R. quelen* traité avec le Cd, l'activité enzymatique de la CAT au niveau du foie diminue après 7 jours de restauration (Pretto *et al.*, 2011). Cavalheiro de Menezes *et al.* (2011) ont constaté chez *R. quelen* (traité avec herbicide Roundup 48%) que l'activité de la CAT a été récupérée après 8 jours de restauration, chez *G. affinis*, on note une récupération au bout de 16 jours après traitement avec le chlorpyrifos (Kavitha & Venkateswara Rao, 2008) et au bout de 8 jours de restauration après traitement par le diflubenzuron et flucycloxyuron (Zaidi & Soltani, 2010).

4.3. Bioaccumulation du cadmium et dépuration

Le golfe d'Annaba est la plus importante zone touristique et économique côtière située à l'Est de l'Algérie. Il est contaminé par de grandes quantités de polluants d'origine urbaine, agricole, portuaire et aussi les activités industrielles. Plusieurs travaux antérieurs ont étudié l'accumulation des métaux traces chez les Crustacés décapodes (Abdenour *et al.*, 2000 ; 2004) et chez les Bivalves (Drif *et al.*, 2005 ; Abdenour & Drif, 2009 ; Beldi *et al.*, 2006). Divers métaux lourds dont le Cd ont été détectés dans les sédiments (Abdenour *et al.*, 2000), mais également dans les tissus de *Donax trunculus* à des

taux qui varient significativement selon les saisons et les sites (Beldi *et al.*, 2006). De plus, l'accumulation des métaux lourds chez *D. trunculus* conséquence des activités anthropiques affecte la physiologie des mâles et des femelles de cette espèce (Hamdani & Soltani-Mazouni, 2011).

Les concentrations des métaux traces (Zn, Cu, Fe, Cd et Pb) ont été trouvées chez différentes espèces de *Donax* qui varient en fonction des saisons et le niveau de contamination des sites : *D. deltoides* (Haynes *et al.*, 1997), *D. trunculus* (Fishelson *et al.*, 1999; Usero *et al.*, 2005) and *D. rugosus* (Sidoumou *et al.*, 2006). Des variations saisonnières similaires des teneurs en métaux traces ont été observées chez diverses espèces de Mollusques filtreurs: *Pecten maximus*, *Chlamys opercularis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. californianus*, *C. gigas*, *C. virginica* (Bryan, 1973 ; Phillips, 1976 ; Majori *et al.*, 1978; Boyden & Phillips, 1981 ; Ritz *et al.*, 1982 ; Farrington *et al.*, 1983 ; Metayer *et al.*, 1985 ; Usero, 2005). En effet, *D. trunculus* a fait l'objet de plusieurs études s'intéressant à l'analyse de certains métaux traces comme celles de Chouba *et al.* (2004) sur le littoral du golfe de Tunis, Roméo & Gnassia Barelli, (1988) sur les côtes Mauritanienues, Uséro *et al.* (2005) sur les côtes sud de l'Espagne, Beldi *et al.* (2006) sur le littoral du golfe d'Annaba (Algérie) et Ozkan *et al.* (2009) sur les côtes de la mer Marmara (Turquie).

La bioaccumulation des métaux lourds par les organismes aquatiques implique un transfert du métal du milieu environnant vers le milieu intérieur. En effet, le passage du Cd dans le milieu interne des organismes dépend également de leur état physiologique. Les Mollusques Bivalves sont largement utilisés dans les programmes de biosurveillance en raison essentiellement pour leur sédentarité et de leur capacité considérable de concentrer les polluants dans leurs tissus (Feldstein *et al.*, 2003). Or, les invertébrés marins, notamment les Bivalves concentrent très rapidement le Cd (Ray, 1986). L'écotoxicologie et la chimie du cadmium (Cd) ont été largement étudiées dans les milieux marins. En tenant compte des normes Européennes (1997) de quelques métaux lourds qui ont été fixées, pour autoriser la consommation de ces organismes comestibles. Les concentrations maximales permises sont les suivantes : pour le plomb 25 µg/g de tissu sec (BOE, 1991) et 50 µg/g de tissu sec (Great Britain-Parliament, 1979), le cadmium 5 µg/g de tissu sec (CEFAS, 1997) et 10 µg/g de tissu sec (NHMRC, 1987), Zn 250 µg/g de tissu sec (Ministry of Food, 1953) et 750 µg/g de tissu sec (NHMRC, 1987) et le Cu 100 µg/g de tissu sec (BOE, 1991) et 350 µg/g de tissu sec (NHMRC, 1987). La concentration du cadmium dans les tissus mous des organismes marins pouvant être plusieurs fois supérieure aux concentrations en métaux dans le milieu environnant (Ansari *et al.*, 2004; Apeti *et al.*, 2009). Au laboratoire, après traitement avec le cadmium à la CL₂₅-96 h (1,32 mg/L) et à la CL₅₀-96 h (2,59 mg/L) pendant 48 et 96 h d'exposition, une augmentation significative de la concentration du Cd (µg/mg de tissu sec) a été notée dans la chair de *D. trunculus*

comparativement aux témoins. Les données de la présente étude indiquent que l'exposition au cadmium produit une bioaccumulation importante de ce métal chez *D. trunculus*. L'accumulation du Cd est augmentée corrélativement avec l'augmentation de la dose administrée dans les différents temps d'exposition. La capacité bioaccumulatrice des Bivalves exposés à une contamination métallique soit au laboratoire soit dans leur milieu naturel a été mise en évidence chez plusieurs espèces de Bivalves telles que *R. decussatus* (Bebianno *et al.*, 1993 ; Smaoui-Damak *et al.*, 2003 ; 2004), *C. fluminea* (Legeay *et al.*, 2005) et *D. polymorpha* (Marie *et al.*, 2006). La pénétration du cadmium dans les cellules est en fonction du temps et directement proportionnelle à sa concentration dans l'eau (George *et al.*, 1978; Kohler & Riisgard, 1982; Poulsen *et al.*, 1982; Chong & Wang, 2001). Luoma & Rainbow (2008) ont rapporté que l'accumulation de métaux traces par les organismes aquatiques est principalement dépendante de la concentration. Les travaux sur la bioaccumulation et la dépuration du cadmium sur *D. trunculus* après une exposition aiguë n'ont pas encore été rapportés pour le moment dans la littérature. L'accumulation du Cd a été observée chez les Gastéropodes marins *Nassarius reticulatus* (Hylland *et al.*, 1994) et *Austrocochlea constricta* (Walsh *et al.*, 1994). Après 30 jours d'exposition à 0,1 et 1 mg/L du Cd chez le Tilapia du Nil *Oreochromis niloticus* une accumulation de ce métal a été détecté à des taux élevés dans le foie (Cogun *et al.*, 2003). Une contamination du crabe *Carcinus maenas* à 3 µg/L du Cd pour une période de 21 jours a conduit à une bioaccumulation du métal au niveau des branchies puis de l'hépatopancréas (Martín-Díaz *et al.*, 2005). Une même tendance a été observée chez l'écrevisse *Procambarus clarkii* exposé 21 jours à 10 ou 30 µg/L du Cd (Martín-Díaz *et al.*, 2006). Knakievicz & Ferreira (2008) ont montré que le Cu s'accumule dans le corps de la planaire *Girardia tigrina* (0,2 mg/L après 24 h d'exposition). Une corrélation entre la concentration du polluant dans les tissus des organismes et dans les sédiments a été observée (Baumard *et al.*, 1998). En effet, Freitas *et al.* (2012) ont montré une élévation de la concentration des métaux lourds (Zn, As et Cd) chez les Mollusques Bivalves *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* collectés au niveau d'un même site comparativement au sédiment. Haiqing *et al.* (2009) ont également trouvé des concentrations élevées du Cd et Zn dans les tissus de *Ruditapes philippinarum* par rapport aux sédiments. Contrairement, chez la moule *Mytilus trossulus* au niveau de la Mer Baltique les concentrations de métaux traces ne sont pas corrélées avec ceux des sédiments (Rainbow *et al.*, 2004).

Chez les Mollusques Bivalves l'accumulation du Cd dépend du temps d'exposition et varie selon l'organe étudié. Chez le Bivalve *Pyganodon grandis* l'accumulation du Cd au niveau de la glande digestive suit le gradient de la contamination métallique (Bonneris *et al.*, 2005). Chez la moule *Mytilus edulis* les concentrations en Cd augmenteraient proportionnellement à la période d'exposition (Amiard-Triquet *et al.*, 1986). Nos résultats sont en accord avec ces observations. Mouneyrac *et al.*

(1998) ont observé chez l'huître *Crassostrea gigas* que les concentrations du métal (Cd) dans la glande digestive étaient plus élevées que celles enregistrées dans les branchies. Chez *Ruditapes decussatus*, les études de contamination au Cd effectuées au laboratoire (Géret *et al.*, 2002 ; Ladhar-Chaabouni *et al.*, 2007), ainsi que les études menées *in situ* (Hamza-Chaffai *et al.*, 1999) ont montré d'une part, que les concentrations en Cd augmentaient avec sa teneur dans le milieu environnemental, et d'autre part, que l'ordre d'accumulation était : glande digestive > branchies > reste du corps (Bebiano & Serafim, 2003). De plus, Souid *et al.* (2012) ont obtenu que l'exposition à court terme (24 h) du Poisson *Sparus aurata* traité au Cd à la CL₅₀ (0,5 mg/L) induit une accumulation importante de ce métal au niveau de l'intestin. En outre, plusieurs auteurs ont soulevé l'effet des variations thermiques sur l'absorption et l'accumulation des métaux par les Mollusques Bivalves. Par exemple, Ritz *et al.* (1982) ont trouvé que le taux d'accumulation du Cu, Zn et Pb par *Mytilus edulis* baisse quand la température s'élève, tandis que Asso (1984) a mis en évidence que le couple salinité/température était à l'origine des fluctuations saisonnières de l'accumulation des métaux lourds chez les moules *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis* en baie d'Alger. D'autres auteurs ont évoqué l'influence du pH sur la biodisponibilité et la bioaccumulation des métaux en agissant sur leur spéciation chimique. Boyden (1974) a été rapporté que la concentration du Pb, Cu, Zn et Fe chez *Mytilus edulis* a été diminuée avec l'augmentation du poids corporel alors que la concentration du Ni et Cd reste constante. De plus, les facteurs abiotiques par leur action sur les processus physiologiques liés au métabolisme et surtout à la reproduction joueraient un rôle important dans la bioaccumulation des métaux. Selon Mauri & Arando (1983) et Cheggour *et al.* (1990) les processus physiologiques liés à la reproduction (gamétogenèse et ponte) semblent être les facteurs essentiels qui expliquent les variations des concentrations métalliques chez les Mollusques Bivalves. Il a été rapporté que l'accumulation des métaux lourds (Zn, Cd et Cu) chez ces espèces pourrait être affectée par le cycle de reproduction (Combra & Carraca, 1990). Des résultats similaires ont été enregistrés par Moukrim *et al.* (2000) chez *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna*. Cependant, Drif & Abdenmour (2010) ont signalé que la concentration des métaux traces (Pb, Zn, Cu et Ni) chez *D. trunculus* variée considérablement entre les sexes. De plus, Une baisse concentration en métaux durant la période de reproduction, et des taux plus élevés durant la gamétogenèse ont été observé chez *D. trunculus* (Idardare *et al.*, 2011).

Durant la période de dépuración, une diminution de la concentration du Cd dans la chair de *D. trunculus* a été observée après 96 h. Les résultats obtenus révèlent que *D. trunculus* a la capacité de bioaccumuler et d'éliminer le Cd après une période d'exposition assez courte. Ceci suggère que cette espèce est un excellent bioaccumulateur du Cd. De plus, elle possède des systèmes d'élimination ou de neutralisation des métaux dont le rôle est de rétablir l'homéostasie. Un des systèmes les plus

importants est la prise en charge des métaux par des ligands spécifiques tels que les métallothionéines (Viarengo & Nott, 1993). La synthèse de ces protéines est induite par une augmentation de l'exposition aux métaux, ils assurent ainsi la régulation des concentrations intracellulaires de différents éléments métalliques. Une autre possibilité de séquestration des métaux lourds est l'inclusion de ces éléments dans des lysosomes. Les résultats obtenus sont en accord avec d'autres travaux ayant testé différents polluants. En effet, Sobral & Widdows (1997) ont révélé une réduction de Cu après 5 jours de dépuración chez *Ruditapes decussatus*. Naqvi *et al.* (1998) ont constaté une réduction du Cd, As, et Pb pendant les 2 premières semaines de députation chez l'écrevisse *Procambarus clarkii*, tandis que chez l'écrevisse *Astacus leptodactylus*, une baisse concentration du Cd a été observée après 3 semaines de dépuración (Guner, 2010). Par contre, Cinier *et al.* (1999) ont noté qu'après un délai de 42 jours de dépuración, la concentration du Cd dans les reins de *Cyprinus carpio* a été augmentée ; cette augmentation peut se produire en raison d'une redistribution du Cd dans les tissus avant son excrétion ultime.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

5. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette étude, en continuité avec les travaux antérieurs, vise à examiner la toxicité aigüe d'un élément trace métallique prépondérant dans le golfe d'Annaba, le cadmium, chez une espèce bioindicatrice de la pollution *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia). Dans un premier temps, ce travail a pour objectif d'estimer les concentrations létales CL_{50} et la CL_{90} du Cd additionné dans l'eau d'élevage à différentes concentrations (5, 7,6 et 10 mg/L) pendant 24, 48, 72 et 96 h d'exposition, et d'évaluer l'effet du Cd en mesurant l'activité spécifique de trois biomarqueurs, l'acétylcholinestérase (AChE), la catalase (CAT) et la glutathion S-transférase (GST). Le Cd entraîne une mortalité de l'espèce étudiée avec une relation dose-réponse. Les données obtenues serviront de base à des études toxicologiques et physiologiques sur l'impact du cadmium sur *D. trunculus*. Cette série d'expérience montre que *D. trunculus* met en place un système de détoxification relativement efficace suite à une exposition au Cd. Le traitement des individus de *D. trunculus* avec le Cd indique une inhibition de l'AChE et une induction de la CAT et GST au cours de la période d'exposition, ceci révèle que le Cd induit un stress oxydatif par la stimulation du système de détoxification (CAT et GST), et il exerce une action neurotoxique mise en évidence par l'inhibition de l'AChE. De plus, les activités enzymatiques initiales ont été récupérées progressivement après une période de restauration de 96 h, ce qui indique une détoxification rapide du Cd dans l'organisme. Ces résultats suggèrent que *D. trunculus* pourrait être utilisé dans les programmes de biosurveillance de la qualité des milieux aquatiques.

Dans une seconde série d'expérience, nous avons effectué un traitement avec le Cd à deux concentrations (CL_{25-96} h et CL_{50-96} h) chez *D. trunculus* pour déterminer sa bioaccumulation après 48 et 96 h d'exposition suivi d'une période de dépuración de 96 h. Les résultats obtenus nous montrent que le Cd s'accumule rapidement chez *D. trunculus*. De plus, cette espèce a un grand potentiel pour l'élimination de Cd/ Ainsi, l'espèce testée est un bon bioindicateur de la pollution et possède de grandes potentialités en tant qu'outil d'évaluation notamment de l'impact de la pollution métallique.

A l'avenir, il serait intéressant de poursuivre ces investigations par :

- Évaluer expérimentalement l'impact des xénobiotiques chez les bivalves à différents niveaux d'organisation biologique (moléculaire, subcellulaire, cellulaire, tissulaire, de l'organisme, de la population et de l'écosystème).

- Développer des recherches par le dosage d'autres enzymes de détoxification comme le cytochrome P450 et des biomarqueurs spécifiques de la pollution métallique (les métallothionéines) chez *D. trunculus* afin d'obtenir des informations complémentaires sur l'action des métaux lourds.
- Compléter l'étude expérimentale de toxicité à une durée d'exposition plus longue afin de percevoir la réversibilité ou non des effets dans les organismes exposés.
- Réaliser une analyse des eaux et du sédiment afin de déterminer la nature des polluants présents en complément de ce qui a été fait dans les tissus *in situ*.
- Étudier l'effet de la toxicité du cadmium en période de repos sexuel chez *D. trunculus*.
- Faire une étude ultrastructure des organes cibles dont les gonades et le manteau.
- Utiliser un mélange de polluants lors d'expérimentation au laboratoire pour se rapprocher du milieu naturel.

RESUMES

6.1. RESUME

La pollution métallique est l'une des formes de pollution anthropique les plus dangereuses menaçant le golfe d'Annaba. L'étude menée vise à l'évaluation de la toxicité aiguë du cadmium, à l'égard d'un Mollusque Bivalve *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) en condition de laboratoire. Trois aspects ont été examinés :

- **Aspect toxicologique :** Les bioessais de toxicité du cadmium à différentes concentrations (5, 7,6 et 10 mg/L) ont été réalisés afin d'estimer les concentrations létales 50 (CL₅₀) et 90 (CL₉₀) pendant 24, 48, 72 et 96 h d'exposition. Le Cd entraîne une mortalité de l'espèce étudiée avec une relation dose-réponse.

- **Aspect enzymatique :** L'impact du Cd au niveau de manteau de *D. trunculus* a été déterminé sur trois biomarqueurs de neurotoxicité l'acétylcholinestérase (AChE), et du stress oxydant respectivement, la catalase (CAT) et la glutathion S-transférase (GST). L'étude comporte deux périodes successives, une période de traitement continue avec le Cd (CL₅₀) pendant 96 h d'exposition suivie d'une période de restauration dans l'eau non contaminée pendant 96 h. Les résultats obtenus révèlent une inhibition de l'AChE associée à une augmentation des activités CAT et GST après 96 h d'exposition au Cd, comparativement aux témoins. Le transfert des individus exposés au Cd dans l'eau non traitée montre une récupération progressive du statut normal.

- **Aspect bioaccumulation dans les tissus :** Les taux de cadmium dans les tissus de *D. trunculus* ont été déterminés au cours du temps durant l'exposition et la restauration en utilisant deux concentrations (CL_{25-96 h} et CL_{50-96 h}). Au cours de la période d'exposition, on note une augmentation de la concentration du Cd dans les tissus après 48 et 96 h chez les séries traitées comparativement aux témoins. Durant la période de restauration, on observe une réduction des taux de Cd dans les tissus ont pour les deux concentrations au bout de 96 h.

L'ensemble des résultats montre que *D. trunculus* est sensible au Cd. Celui-ci s'incorpore progressivement dans le corps. Son organisme réagit rapidement en mettant un système de détoxification relativement efficace.

Mots clés : Cadmium, *Donax trunculus*, Toxicité aiguë, Biomarqueurs, Enzymes, Bioaccumulation.

6.2. ABSTRACT

Metal pollution is one of the most dangerous forms of anthropogenic pollution in the Gulf of Annaba. The study aims to assess the acute toxicity of cadmium, in *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) under laboratory conditions. Three aspects have been examined:

-Toxicological aspect: Bioassays of cadmium of toxicity were performed at different concentrations (5, 7, 6 and 10 mg / L) in order to estimate the lethal concentrations 50 (LC₅₀) and 90 (LC₉₀) for 24, 48, 72 and 96 h of exposure. Cd causes mortality of the species studied with a dose-response relationship.

-Enzymatic aspects: The impact of Cd in *D. trunculus* was determined on three biomarkers of neurotoxicity acetylcholinesterase (AChE), and of oxidative stress, catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST), respectively. This study includes two successive periods, metal exposure period (LC₅₀ for 96 h) followed by a recovery period in untreated water for 96 h. The results show an inhibition of AChE associated with an increase of CAT and GST activities after 96 h of exposure to Cd, compared to controls. The transfer of individuals exposed to Cd in untreated water shows a gradual recovery of normal status.

-Bioaccumulation of Cd in tissues: Cadmium levels in the tissues of *D. trunculus* were measured using atomic absorption spectrophotometry during exposure (LC₂₅-96 h and LC₅₀-96 h) and recovery periods. During the exposure period, there was an increase in the concentration of Cd in the tissues after 48 and 96 h in treated series compared to controls. During the recovery period, a reduction of Cd content was observed in the tissues for both tested concentrations after 96 h exposure period. The results revealed that *D. trunculus* is sensitive to Cd. This metal was gradually incorporated into the body. *D. trunculus* responds quickly with a relatively effective detoxification system.

Key words: Cadmium, *Donax trunculus*, Acute toxicity, Biomarkers, Enzymes, Bioaccumulation.

3.6 . ملخص

يعتبر التلوث المعدني من أهم أشكال التلوث التي تهدد خليج عنابة . تهدف هذه الدراسة إلى تقييم السمية الحادة للكادميوم تحت

ظروف المخبر لدى حيوان رخوي ثنائي القوقعة *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758)

ثلاثة جوانب تمت دراستها:

فحص السمية الحادة للكادميوم : تمت دراسة السمية الحادة للكادميوم بتركيز مختلفة (5 - 7,6 و 10ملغ/ل) وذلك لتعيين التراكيز المميتة 50 (CL₅₀) و 90 (CL₉₀) خلال 24 - 48 - 72 و 96 ساعة من التعرض. وقد اثبت من خلال هذه الدراسة أن الكادميوم يسبب الوفيات لدى الحيوان المدروس العلاقة تركيز- إجابة.

الجانب الإنزيمي : تم تحديد تأثير الكادميوم لدى *D. trunculus* على مستوى ثلاث مؤشرات حيوية : الاسيتيل كولين استرا (مؤشر السمية العصبية) (AChE), الغلوتاثيون- S ترانسفيراز (GST) و الكاتلاز (CAT) (مؤشرين التوتير التاكسدي) و تشمل الدراسة مرحلتين متتاليتين : مرحلة العلاج المستمر (CL₅₀-96 h) إلى 96 ساعة من التعرض تليها مرحلة النقاهاة في الماء الغير ملوث خلال 96 ساعة. النتائج المتحصل عليها تدل على تثبيط نشاط AChE و زيادة في نشاط GST و CAT بعد 96 ساعة من التعرض مقارنة مع الشواهد. نقل الأفراد المعالجة بالكادميوم في ماء غير ملوث ينتج عنه استعاد تدريجي في الوضع الطبيعي.

التراكم الحيوي للكادميوم : تم تحديد معدل تراكم الكادميوم داخل الكائن الحي باستعمال اثنين من التراكيز (CL₅₀-96 h و CL₂₅-96 h) خلال مرحلة التعرض و النقاهاة . خلال مرحلة التعرض: نلاحظ زيادة في تركيز Cd داخل جسم *D. trunculus* بعد 48 و 96 ساعة لدى الكائنات المعالجة مقارنة مع الشواهد. أما خلال مرحلة النقاهاة لوحظ وجود انخفاض محتوى Cd لكلتا التراكيز . أظهرت النتائج الإجمالية أن *D. trunculus* حساس للكادميوم الذي دمج تدريجيا داخل الكائن الحي. *D. trunculus* يتفاعل عند تعرضه للاضطرابات الناتجة عن Cd بوضع نظام فعال لإزالة السموم.

الكلمات المفتاحية : كادميوم - *D. trunculus* - السمية الحادة - مؤشرات حيوية - إنزيمات - التراكم الحيوي.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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 Science du Vivant, Géosciences, et Science de l'environnement, option : Ecotoxicologie des milieux aquatiques, 276 p.
- Abbes A., Chouahda S. & Soltani N., 2003.** Activité comparée de deux biomarqueurs du stress environnemental dans divers tissus chez deux espèces de Bivalves pêchées dans la région d'Annaba. *Bulletin de l'INSTM.*, **8**: 123-126.
- Abbott W.B., 1925.** A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, **18**: 265-267.
- Abdenmour C., Smith B.D., Boulakoud M.S., Samraoui B. & Rainbow P.S., 2000.** Trace metals in shrimps and sediments from Algerian water. *J. Catalog. Mat. Env.*, **3**: 9-12.
- Abdenmour C., Khelili K., Boulakoud M.S. & Rainbow P.S., 2004.** Trace metals in marine, brackish and freshwater prawns (*Crustacea, Decapoda*) from north-east Algeria. *Hydrobiologia*, **432**: 217-227.
- Abdenmour C. & Drif F., 2009.** Trace metals in the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* from Annaba estuaries, Algeria. Global Conference on Global Warming (GCGW-09). Istanbul, Turkey, July 5-9. www.gcgw.org. 2009. Consulted 20 Sept 2009.
- Abraham T.J., Salih K.Y.M. & Chacko J., 1986.** Effects of heavy metals on the filtration rate of bivalve *Villorita cyprinoides* (Hanley) var *Cochensis*. *Indian. J. Mar. Sci.*, **15**:195-196.
- Adriano D.C., 1986.** Trace elements in the environment. New York, *Springer Verlag.*, pp 155.
- Ait Alla A., Mouneyrac C., Moukrim A. & Pellerin J., 2006.** Tolerance and biomarkers as useful tools for assessing environmental quality in the Oued Souss estuary (Bay of Agadir, Morocco). *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **143**: 23-29.
- Aït-Aïssa S., 2003.** Réponses multi-biomarqueurs chez des poissons exposés à des métaux, seuls ou en mélange. Journée de la SFRP section Environnement, Paris, 15 Septembre 2003. Présentation invitée.
- Akcha F., Izuel C., Venier P., Budzinski H., Burgeot T. & Narbonne J.F., (2000).** Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo(a)pyrene contaminated mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol.*, **49**: 269-287.
- Almeida J.A., Diniz Y.S., Marques S.F.G., Faine L.A., Ribas B.O. & Burneiko R.C., 2002.** The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ Int.*, **27**: 673-679.
- Almeida E.A., DiasBainy A.C., MeloLoureiro A.P., MartinezRegina R., Miyamoto S., Onuki J., FujitaBarbosa L., MachadoGarcia C.C., MansoPrado F., Eliza Ronsein G., Sigolo C.A., Barbosa Brochini C., Gracioso Martins A.M., Gennari de Medeiros M.H., Di Mascio P., 2007.** Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol., A.* **146**: 588-600.
- Amiard-Triquet C., Berthet B., Metayer C. & Amiard J.C., 1986.** Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, copper, and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. II Experimental study. *Mar. Biol.*, **92**: 7-13.
- Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Ballan-Dufrançais C., Berthet B., Jeantet A.Y., Martoja R. & Truchet M., 1989.** Study of the bioaccumulation at the molecular, cellular and organism levels of lead and copper transferred to the oyster *Crassostrea gigas* thunberg directly from water or via food. Polish. *Academy of Sciences.*, **34**: 521-529.
- Amiard-Triquet C., Altmann S., Amiard J.C., Ballan-Dufrançais C., Baumard P., Budzinski H., Crouzet C., Garrigues P., His E., Jeantet A.Y., Menasria R., Mora P., Mouneyrac C., Narbonne J.-F. & Pavillon J.F., 1998.** Fate and effects of micropollutants in the Gironde estuary, France: a multidisciplinary approach. *Hydrobiol.*, **373/374**: 259-279.

- Amira A., 2008.** Evaluation du stress environnemental chez *Donax trunculus* : Mesure de biomarqueurs (GSH et MDA) et corrélation avec le métabolisme lipido-glucidique durant la période de reproduction au niveau du Golfe d'Annaba. Mémoire de Magistère en Biologie et physiologie Animale Option Reproduction et développement. Université d'Annaba, 79 p.
- Amira A., Sifi K. & Soltani N., 2011.** Measure of environmental stress biomarkers in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria). *European Journal of Experimental Biology*, **1**(2):7-16.
- Amouroux J.M., 1974.** Etude des peuplements infralittoraux de la côte du Roussillon. III. Variations spatiales et saisonnières. *Vie Milieu*, **24** : 321-354.
- Ansari T., Marr I. & Tariq N., 2004.** Heavy metals in marine pollution perspective – a mini review. *J. Appl. Sci.*, **4** (1): 1–20.
- Ansell A.D. & Bodoy A., 1979.** Comparison of events in the seasonal cycle for *Donax vittatus* and *Donax trunculus*. Dans: *Cyclic phenomena in marine plants and animals, 13^{ème} Europ. Mar. Biol. Symp., Naylor, E et Hartno, R. G. Pergamon Press, Oxford et New York.*, pp. 191-198.
- Ansell A.D. & Lagardère F., 1980.** Observations on the biology of *Donax trunculus* and *D. vittatus* at Ile d'Oléron (French Atlantic Coast). *Mar. Bio.*, **57**(4): 287- 300.
- Ansell A.D., 1983.** The biology of the genus *Donax*. In *Sandy beaches as ecosystems.* (McLachlan, A. & Erasmus, T., eds). Junk publishers, *The Hague.*, 607–635.
- Anushia C., Sampath kumar P. & Selva Prabhu A., 2012.** A Pilot Study on Effect of Copper and Cadmium Toxicity in *Tilapia Mossambicus*. *Journal of Research in Animal Sciences.*, **1**: 20-27.
- Aouadene A., 2003.** Evaluation spatio-temporelle de quelques paramètres biométriques et biochimiques chez *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia). Mémoire de magistère en Biologie et Physiologie Animale, option Ecologie Animale Appliquée. Université d'Annaba, 88 p.
- Apeti D.A., Lauenstein G.G. & Riedel G.F., 2009.** Cadmium distribution in coastal sediments and mollusks of the US. *Mar. Pollut. Bull.*, **58**: 1016–1024.
- Arapis G., 2005.** Modern Problems of Ecotoxicology. Equidosimetry – Ecological Standardization and Equidosimetry for Radioecology and Environmental Ecology, Springer Netherlands, editors (Athènes : NATO Security trough Science Series)., pp: 101-109.
- Asagba S.O., Eriyamremu G.E. & Igberaese M.E., 2008.** Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish(*Clarias gariepinus*). *Fish Physiol. Biochem.*, **34** : 61–69.
- Asso A., 1984.** Etude des teneurs globales en métaux lourds chez la moule *Perna perna* dans la région d'Alger. Variation de ces teneurs en fonction des paramètres biologiques. VIIème journées d'étude des pollutions, Lucerne, C.I.E.S.M.
- Atli G., Alptekin O., Tukul S. & Canli M., 2006.** Response of catalase activity to Ag^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **143**: 218–224.
- Baby K.V. & Menon N.R., 1987.** Salt forms of metals and their toxicity in the brown mussel *Perna indica* (Kuriakose and Nair). *Indian. J. Mar. Sci.*, **16**:107-109.
- Badiou A. & Belzunces L.P., 2008.** Is acetylcholinesterase a pertinent biomarker to detect exposure of pyrethroids? A study case with deltamethrin. *Chem. Biol. Interact.*, **175**: 406–409.
- Bagnyukova T. V., Chahrak O. I. & Lushchak V. I., 2006.** Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquatic Toxicology.*, **78**: 325-331.
- Baldisserotto B., Chowdhury M.J. & Wood C.M., 2005.** Effects of dietary calcium and cadmium on cadmium accumulation, calcium and cadmium uptake from the water, and their interactions in juvenile rainbow trout. *Aqua. Toxicol.*, **72**: 99-117.
- Baumard P., Budzinski H. & Garrigues P., 1998.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean Sea. *Environ. Toxicol. Chem.*, **17**: 765–776.
- Bayed A., 1991.** Etude écologique des écosystèmes de plages de sable fin de la côte atlantique marocaine: Modèles de zonation, Biotypologie, Dynamique de populations. *Thèse Doctorat d'Etat, Univ. Mohammed V, Rabat* : 229p.

- Beauvais S.L., Jones S.B., Parris J.T., Brewer S.K., Little E.E., 2001.** Cholinergic and behavioural neurotoxicity of carbaryl and cadmium to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **49**: 84-90.
- Bebianno M.J., Nott J.A. & Langston W.J., 1993.** Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussatus* : the role of metallothioneins. *Aquat. Toxicol.*, **27**: 315- 334.
- Bebianno M.J., Serafim M.A., 2003.** Variation of metal and metallothionein concentrations in a natural population of *Ruditapes decussatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **44**: 53- 66.
- 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.
- 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. Agric. Res.*, **1**(4): 85-90.
- Beldi H., 2007.** Etude de *Gambusia affinis* (Poisson, Téléostéen) et *Donax trunculus* (Mollusque, Pélécyfode) : écologie, physiologie et impacts de quelques altéragènes. Thèse de doctorat d'état en Sciences Naturelles, mention Biologie Animale. Université d'Annaba, p. 105.
- Benelli A., Ricciardi F., Riva C. & Provini A., 2006.** New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chem.*, **62**: 510-519.
- Ben Kheder Dhaoui R., 2001.** Contribution à l'étude écobioologique de *Donax trunculus*, mollusques bivalves, dans le golfe de Tunis. Rapport de DEA d'écologie générale de l'université de Tunis.
- Blanchette B.N. & Singh B.R., 1999.** Induction of Glutathione-s-Transferase in the Northern Quahog *Mercenaria mercenaria* After Exposure the Polychlorinated Biphenyl (PCB) Misture aroclor 1248. *J. Prot. Chem.*, **(21)8**: 489-494.
- Bocquene G., Galgani F. & Truquet P., 1990.** Characterisation and assay for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research.*, **30**: 75-89.
- Bocquené G., Galgani F. & Walker C.H., 1997.** Les cholinesterases, biomarqueurs de neurotoxicité. In: Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux. *Masson, Paris*. pp. 209-240.
- Bocquené G. & Galgani F., 2004.** Les marqueurs biologiques des effets polluants: l'acétylcholinestérase, Méthodes d'analyse en milieu marin, Ifremer, Issy-les-Moulineaux, 28 pp.
- Bodoy A., 1982.** Croissance saisonnière du bivalve *Donax trunculus* en méditerranée nord-occidentale (France). *Malacologia*, **22** (1-2): 353-358.
- BOE (Boletín Oficial del Estado or Official Gazette of the State), 1991.** ‘‘Normas microbiológicas, limites de contenido en metales pesados y métodos analíticos para la determinación de metales pesados para los productos de la pesca y de la agricultura (Microbio-logical standards, limits of heavy metal concentration and analytical methods for the determination of heavy metals in fish and agricultural produce)’’ August 2 Order. Madrid, Spain: Ed. BOE: 5937-5941.
- Boening D.W. 1999.** An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. *Environmental monitoring and assessment*, **55**: 459-470.
- Bolton R.M. & Ahokas J.T., 1997.** Ontogenic expression of detoxication enzymes in an Australian marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **118**(1): 239-40.
- Bonacci S., Ilaria C. & Silvano F., 2008.** Cholinesterase activities in the scallop *Pecten jacobaeus*: characterization and effects of exposure to aquatic contaminants. *Sci. Total Environ.*, **392**: 99-109.
- Bonneris E., Perceval O., Masson S., Hare L. & Campbell P.G.C., 2005.** Sub-cellular partitioning of Cd, Cu and Zn in tissues of indigenous unionid bivalves living along a metal exposure gradient and links to metal-induced effects. *Environ. Pollu.*, **135**: 195-208.

- Borgeraas J., Nilsen K. & Stenersen J., 1996.** Methods for purification of glutathione transferase in the earthworm Genus *eisenia*, and their characterization. *Comp Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **114** (2): 129-40.
- Borgmann U., 2000.** Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: bio-accumulation-toxicity relationships, water concentrations and sediment spiking approaches. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, **3**: 277-289.
- Bougis., 1976.** Océanographie biologique appliquée, l'exploitation de la vie marine. *Edition Masson*, p.17-23.
- Bouraoui Z., Banni M., Ghedira J., Clerandeanu C., Guerbej H., Narbonne J.F. & Boussetta H., 2008.** Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata*. *Fish Physiol. Biochem.*, **34**: 201-207.
- Bouraoui Z., Ghedira J., Jebali J., Banni M., Clerandeanu C., Narbonne J-F. & Boussetta H., 2009.** Étude de l'effet du cadmium et du benzo[a]pyrène sur des enzymes de phase I et phase II de biotransformation chez le polychète *Nereis diversicolor*. *Revue des Sciences de l'Eau*, **22** (3): 451-459.
- 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.
- Bouthir F.Z., Chafik A., Benbrahim S., Souabi S., El Merdhy H., Messoudi A. & Sifeddine M., 2004.** Qualité physico-chimique des eaux côtières du littoral de la wilaya du grand Casablanca (Océan Atlantique Marocain) utilisant la moule *Mytilus galloprovincialis* comme indicateur de la contamination métallique. *Mar. Life – Maroc*, **14** (1-2): pp 59-70.
- Box A., Sureda A., Galgani F., Pons A. & Deudero S., 2007.** Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **146**: 531-539.
- Boyden C.R., 1974.** Trace element content and body size in Molluscs. *Nature*, **251**: 311-314.
- Boyden C.R. & Phillips D.J.H., 1981.** Seasonal variation and inherent variability of trace elements in oysters and their implications for indicator studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **5**: 29-40.
- Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, **72**: 248-254.
- Bris H., Maffart P., Bocqueneé G., Buchet V., Galgani F. & Blanc G., 1995.** Laboratory study on the effect of dichlorvos on two commercial bivalves. *Aquaculture*, **138**: 139-144.
- Brown A.C., 1982.** The biology of sandy beach whelks of the genus *Bullia* (Nassareidae) oceanogr. *Mar. Biol. Ann. Rev.*, **20**: 309-361.
- Brown A. C. & McLachlan A., 1990:** Ecology of sandy shores. Elsevier, Amsterdam : 328 pp.
- Bryan G.W., 1973.** The occurrence and seasonal variation of trace metals in the scallops *Pecten maximus* (L) and *Chlamys opercularis* (L). *J. Mar. Biol. Ass., U.K.*, **53**: 145-166.
- Burger J. 2006.** Bioindicators: a review of their use in the environmental literature 1970-2005. *Environmental bioindicators*, **1**: 136-144.
- Burton G.A., 1992.** Sediment toxicity assessment. Lewis Publishers, London, 211 p.
- Byrne R.H., L.R. Kemp. & K.J., Cantrell., 1988.** The influence of temperature and pH on trace metal speciation in seawater. *Mar. Chem.*, **25**: 163-181.
- Canty M.N., Hagger J.A., Moore R.T.B., Cooper L. & Galloway T.S., 2007.** Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar Pollut Bull.*, **54**: 396-402.
- Carriker M.R., 1961.** Interrelation of functional morphology, behavior, and autecology in early stages of the bivalve *Mercenaria mercenaria*. *J Elisha Mitchell Society*, **77**: 168-241.
- Cavalheiro de Menezes C., Braga da Fonseca M., Loro V.L., Santi A., Cattaneo R., Clasen B., Pretto A. & Morsch V.M., 2011.** Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery Pattern of *Rhynchomytilus quelen*. *Arch Environ Contam Toxicol.*, **60**: 665-671.

- CEFAS (Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science), 1997.** "Monitoring and surveillance of non-radioactive contaminants in the aquatic environment and activities regulating the disposal of waste at sea (1994). *Aquatic Environment Monitoring Report 47*", Lowestoft, UK: Centre for Environment, Fisheries, and Agriculture Science.
- Chambers M.G., 1995.** The effect of acute cadmium toxicity on marron, *Cherax tenuimanus* (Smith, 1912) (Family Parastacidae). In: Geddes M.C., Fielder D.R. and Richardson A.M.M. (eds). Tenth International Symposium on Fresh water Crayfish, Freshwater Crayfish- vol. 10. Adelaide, Australia, 209-220.
- Cheggour M., 1988.** Contribution à l'étude d'un milieu paralique: l'estuaire de Bou regreg (Côte atlantique marocaine) : conditions écologiques globales ; étude de la contamination métallique. Thèse de Doct., Rabat, 337pp.
- Cheggour M., Texier H., Moguedert. & Elkaïm B., 1990.** Metal exchange in the fauna-sediment system; the case of *Nereis diversicolor* and *Scrobucularia plana* in the Bou Regreg estuary (Morocco). *Hydrobiologia*, **207**: 209-219.
- Chiffolleau J. F., Gonzalez J. L., Miramand P. & Thouvenin B., 1999.** Le cadmium: Comportement d'un contaminant métallique en estuaire. *Programme Scientifique Seine-Aval (France)*, p 31.
- Chiu S.T., Lam F.S., Tze W.L., Chau C.W. & Ye D.Y., 2000.** Trace metals in mussel from mariculture zones, Hong Kong. *Chemosphere*, **41**: 101-108.
- Chong K. & Wang W.X., 2001.** "Comparative studies on the biokinetics of Cd, Cr and Zn in the green mussel *Perna viridis* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*." *Environ. Pollut.*, **115**(1): 107-121.
- Chouahda S., 2006.** Impact de deux xénobiotique (cadmium et halofenozide) sur *Gambusia affinis* et évaluation du stress environnemental dans le golfe d'Annaba par l'utilisation de *Donax trunculus*. Thèse de Magistère en Biologie et Physiologie Animale, option Ecotoxicologie Animale Appliquée, Université d'Annaba, 76p.
- Chouahda S. & Soltani N., 2009.** Impact du cadmium et du halofenozide sur les indices métriques des femelles adultes d'un poisson culiciphage, *Gambusia affinis*. *Science & Technologie C*, **29** : 9-14.
- Chouahda S., 2010.** Evaluation de l'impact de deux xénobiotiques (cadmium et halofenozide) sur un poisson culiciphage à intérêt médical, *Gambusia affinis*. Thèse de Doctorat en Sciences Naturelles, mention Biologie Animale. Université d'Annaba, 137p.
- Chouba L., Langar-Zamouri N., Romdhane M.S. & El Abed A., 2004.** Accumulation of Heavy metals in shellfish of marine environment along the coast of Tunisia. *Proceedings of the international Conference on Isotopes in Environmental Studies. IAEA, CN.*, **118**: 613-616p.
- Cinier C.C., Petit-Ramel M., Faure R., Garin D. & Bouvet Y., 1999.** Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues. *Comp Biochem Physiol C.*, **122**: 345-352.
- Claiborne A., 1985.** In Greenwald R.A (Ed). Handbook of Methods for Oxygen Radical Research CRC press, Boca Raton, FL., 283.
- Cogun H.Y., Yuzereroglu T.A. & Kargin F., 2003.** Accumulation of copper and cadmium in small and large Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **71**: 1265-1271.
- Combra J. & Carraca S., 1990.** Accumulation of Fe, Zn, Cu and Cd during different stages of the reproductive cycle in *Mytilus edulis*. *Comp Biochem Physiol.*, **95**(2): 265-270.
- Connell DW., Chaisuksant Y. & Yu J., 1999.** Importance of Internal Biotic Concentrations in Risk evaluations with Aquatic Systems. *Mar Pollut Bull*39., **1-12**:54-61.
- Cossu A., Doyotte A., Jacquin M.C. & Vasseur P., 1997.** Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques. In: Lagadic L, Caquet T, Amiard J.C, Ramade F, editors. Biomarqueurs en écotoxicologie Aspects fondamentaux. Paris : *Masson.*, 149-63.
- Costa, C.; Bianchini, M.; Ceccarelli, P.; Orecchia, P.; Rambaldi, E.; Volterra, R., 1987.** Indagine sui molluschi bivalvi di interesse commerciale (telline, cannolicchi e vongole) delle coste

della Toscana, del Lazio e della Campania, 1985–1987. *Quad. Ist. Idrobiol. Acquacolt. G. Brunelli.*, **7**: 3-58.

- Cunha I., Mangas-Ramirez E. & Guilhermino L., 2007.** Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathioneS-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **145**: 648–657.
- Cuyppers A., Plusquin M., Remans T., Jozefczak M., Keunen E., Gielen H., Opdenakker K., Nair A.R., Munters E., Artois T.J., Nawrot T., Vangronsveld J. & Smeets K., 2010.** Cadmium stress: An oxidative challenge. *Bio Metals.*, **23**: 927-940.
- Dabas A., Nagpure N. S., Kumar R., Kushwaha B., Kumar P. & Lakra W.S., 2012.** Assessment of tissue-specific effect of cadmium on antioxidant defense system and lipid peroxidation in freshwater murrel, *Channa punctatus*. *Fish Physiol Biochem.*, **38**: 469–482.
- Daby D., 2006.** Coastal pollution and potential biomonitoring of metals in Mauritius. *Water, Air and soil pollution*, **174**: 63-91.
- D'adamo R., Di Stasio M. & Fabbrochini A., 2008.** Migratory crustaceans as biomonitoring of metal pollution in their nursery areas. The Lesina lagoon (SE Italy) as a case study. *Environmental monitoring and assessment*, **143**: 15-24.
- Dagnino A., Allen J.I., Moore M.N., Broeg K., Canesi L. & Viarengo A., 2007.** Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers*, **12** :155-172.
- Degiovanni C. & Mouëza M., 1972.** Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque, Lamellibranche), dans l'Algérois : écologie en Baie de Bou-Ismaïl. *Tethys*, **4**(3) : 729-744.
- Depledge M.H., Fossi M.C., 1994:** The role of biomarker in environmental assessment, *Ecotoxicology*, **3**: 161-172.
- Drif F., Abdennour C., Boulakoud M.S. & Ounissi M., 2005.** The effect of chemical and organic pollution on *Mytilus galloprovincialis* in the gulf of Annaba, Algeria. *4th Maghreb Congress of Marine Sciences, 17-21 December, Monastir, Tunisia.*
- Drif F. & Abdennour C., 2010.** Trace Metals in the Mussel *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) from Urban and Industrial Contaminated Locations. *Journal of Applied Sciences Research*, **6** (12): 2063-2067.
- Elia A.C., Galarini R., Taticchi M.I., Dörr A.J.M. & Mantilacci L., 2003.** Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **55**: 162-167.
- Ellman G. L., Courtney K.D., Andres V. & Featherstone R.M., 1961.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7** (3): 88-95.
- El-Moselhy Kh.M., 2001.** Toxicity of cadmium to the marine fish *Mugil sehelii* and its accumulation in different tissues. *Journal Egypt Academy Society. Environmental Development*, **2** (1):17-28.
- Ercal N., Gurer-Orhan H. & Aykin-Burns N., 2001.** Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry*, **1**: 529-539.
- Erk M., Ruus A., Ingebrigtsen K. & Hylland K., 2005.** Cadmium accumulation and Cd -binding proteins in marine invertebrates -A radiotracer study. *Chemosphere*, **61**: 1651–1664.
- Erkuden P., Julian B. & Montserrat S., 2004.** Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cadiz Bay (SW Spain). *Mar. Environ. Res.*, **58**: 275-279.
- Escartin E. & Porte C., 1997.** The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environ Toxicol Chem.*, **16**: 2090–2095.
- Espinosa F., Guerra-García J.M. & García-Gómez J.C., 2007.** Sewage pollution and extinction risk: an endangered limpet as bioindicator? *Biodiversity and conservation.*, **16**: 377-397.
- European Communities, Draft commission regulation setting maximum limits for certain contaminants in foodstuffs. III/5125/95 Rev. 3.** Official Journal of the European Communities. *European Communities, Brussels.* **1997.**

- Farrington J.W., Goldberg E.D., Riseborough R.W., Martin J.H. & Bowen V.T., 1983.** U.S. "Mussel Watch", 1976-1978: an overview of the trace metals, DDE, PCB, Hydrocarbon and artificial radionuclide data. *Env. Sci. et Technol.*, **17**: 490-496.
- Fassett D.W., 1974.** Cadmium. In: Lee, D.H.K., Editor, 1974. Metallic contaminants and Human Health, *Academic Press, New York*.
- Feldstein T., Kashman Y., Abelson A., Fishelson L., Mokaday O., Bresler V. & Erel Y., 2003.** Marine molluscs in environmental monitoring. III trace metals and organic pollutants in animal tissue and sediment. *Helgoland Mar. Res.*, **57**: 212-219.
- Ferrer L., Andrade S., Asteasuain R. & Marcovecchio J., 2005.** Acute toxicities of four metals on the early life stages of the crab *Chasmagnathus granulata* from Bahia Blanca estuary, Argentina. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **65**(2) : 209-217.
- Finney D.J., 1971.** Probit analysis (3rd edn) Cambridge University Press, London.
- Fishelson L., Bresler V., Manelisa R., Zuk-Rimon Z., Dotan A., Hornung H. & Yawetz A., 1999.** Toxicological aspects associated with the ecology of *Donax trunculus* (Bivalvia, Mollusca) in a polluted environment. *Sci. Total Environ.*, **226**: 121-131.
- Fisher R.A. & Yates F., 1957.** Statical tables for biological agricultural and medical research. 5^{ème} edition, Olivier et Boyd. London., pp: 64-66.
- Fischer W., Bauchat M.L.F. & 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., 76pp.
- Fitzpatrick P.J. & Sheehan., 1993.** Separation of multiple forms of glutathione S-transferase from the blue mussel *Mytilus edus*. *Xenob.*, **23**: 851-861.
- Fitzpatrick P.J., Krag T.O.B, Hojrup P. & Sheehan D., 1995.** Characterization of glutathione S-transferase and related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biochem. J.*, **305**:145-150.
- Fitzpatrick P.J., O'Halloran J., Sheehan D. & Walsh A.R., 1997.** Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis*(L.) as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*, **2**: 51-56.
- Foley Y. & Sheehan D., 1998.** Glutathione S-transferases of the yeast *Yarrowia Lipolytica* have unusually large molecular mass. *Biochem J.*, **1**: 839-45.
- Fränzle O., 2003.** Bioindicators and environmental stress assessment. Bioindicators and biomonitors: principles, concepts and applications, B.A. Market, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, editors (Amsterdam: Elsevier Science Ltd.), pp. 41-84.
- Frasco M.F., Fournier D., Carvalho F. & Guilhermino L., 2005.** Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, **10** (5): 360-375.
- Frehi H., Ayada M., Kara M.H. & Coute A., 2004.** Hydrologie de la baie d'Annaba (Algérie-Nord-Est) : Caractères physico-chimiques et biomasse chlorophy-lienne. *Rapp. Comm. Int. Mer Medit.*, **37**: 359.
- Freitas R., Ramos Pinto L., Sampaio M., Costa A., Silva M., Rodrigues A.M., Quintino V. & Figueira E., 2012.** Effects of depuration on the element concentration in bivalves: Comparison between sympatric *Ruditapes decussates* and *Ruditapes philippinarum*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, doi: 10.1016/j.ecss.01.011.
- Galgani F., Bocquené G. & Cadiou Y., 1992.** Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. *Mar. Ecol.*, **91**: 77-82.
- Gaspar M. B., Ferreira R. & Monteiro C., 1999:** Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L. (Mollusca: Bivalvia) in Faro, southern Portugal. *Fish. Res.*, **41**: 309-316.
- Geores G.S. & Young P., 1988.** Purification and properties of plaice liver cytosolic glutathione S-transferase. *Mar. Environ. Res.*, **24**: 93-96.
- George S. G., Carpena E. & Coombs T.L., 1978.** The effect of salinity on the uptake of cadmium by the common mussel, *Mytilus edulis* (L.). Physiology and behaviour of marine organisms. D. S. McLusky et A. J. Bary. Oxford, Pergamon Press: 189-193.

- Geracitano L.A., Luquet D., Monserrat J.M. & Bianchini A., 2004.** Histological and morphological alterations induced by copper exposure in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). *Mar. Environ. Res.*, **58**: 263–267.
- Géret F., Serafim A., Barreira L. & Bebianno M.J., 2002.** Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Biomarkers*, **7**: 242–256.
- Ghosh S. & Mukhopadhyay M.K., 2000.** Toxicity of five industrial metals on Gangetic catfish *Rita rita*. *Geobios*, **27**: 93-95.
- Gioda C.R, Lissner L.A, Pretto A, da Rocha J.B.T, Schetinger M.R.C. & Neto J.R., 2007.** Exposure to sublethal concentrations of Zn (II) and Cu (II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. *Chemosphere*, **69**: 170–175.
- Goksoyr A. & Förlin L., 1992.** The cytochrome P-450 in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, **22**: 287-312.
- Gouiez H., Ounissi M., Laabed S., Saker L., Haridi H., Khélifi-Touhami M. & Djorfi S., 2006.** Apports en phosphates et azote minéral de Oued Seybouse au littoral d'Annaba (Algerie) 8^{ème} conférence internationale des Limnologues d'Expression Française "CILEF 2006". Tunisie, 17-21 mars 2006.
- Gouletquer P., 1997.** Natural reproduction cycle of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. La Reproduction Naturelle et Contrôlée des Bivalves Cultivés en France. IFREMER, Nantes.
- Great Britain-Parliament., 1979.** "Food and Drugs Composition. The Lead in Food Regulation 1979", Statutory Instrument N° 1254: 1–7. London: Her Majesty's Stationery Office.
- Grimes., 1994.** Contribution à la connaissance des populations de *Cardium glaucum* (Bruguère., 1789), *Lorupes lacteurs* (Lirmaly) du lac El-Mellah (El-Kala, Algérie). Ecologie et Dynamique. Thèse de Magister institut des sciences de la mer et de l'aménagement du littoral. ISMAL (Alger), 221pp et annexes.
- Grimes S., Boutiba Z., Bakalem A., Bouderbala M., Boudjllal B., Boumaza S., Boutiba M., Guedioura A., Hafferssas A., Hemida F., Kaidi N., Khelifi H., Kerzabi F., Merzoug A., Nouara A., Sellali B., Sellali M.H., Samroud R., Seridi H., Taleb M.Z. & Touahria T., 2004.** Biodiversité marine et littorale algérienne. *Editions Diwan, Alger*, 400p.
- Guelorget O. & Perthuisot J.P., 1984.** Indicateurs biologiques et diagnose écologique dans le domaine paralytique. *Bull. Ecol.*, **15**: 67-76.
- Guidi P., Frenzilli G., Benedetti M., Bernardeschi M., Falleni A., Fattorini D., Regoli F., Scarcelli V. & Nigro M., 2010.** Antioxidant, genotoxic and lysosomal biomarkers in the freshwater bivalve (*Unio pictorum*) transplanted in a metal polluted river basin. *Aquatic Toxicology*, **100**: 75–83.
- Guilhermino L., Lacerda M.N., Nogueira A.J.A. & Soares A.M.V.M., 2000.** In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Sci. Total. Environ.*, **247**: 137–141.
- Guillemet M., 1988.** Impact des rejets urbains et industriels de la région Toulouse-sud sur l'écosystème aquatique de la Saudre. Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle, Univ. Paul. Sabatier. Toulouse.
- Guillou J. & Le Moal Y., 1980.** Aspects de la dynamique des populations de *Donax trunculus* et *D. vittatus* en baie de Douarnenez. *Annal, Inst. océanogr. Paris.*, **56** (1): 55-64.
- Guner U., 2010.** Cadmium Bioaccumulation and Depuration by Freshwater Crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Ekoloji*, **19**: 77: 23-28.
- Habig W.H., Pabst M.J. & Jacobi W.B., 1974.** The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.*, **249**: 7130-7139.
- Haiqing M.A., Qian S. & Xuchen W., 2009.** Accumulation of petroleum hydrocarbons and heavy metals in clams (*Ruditapes philippinarum*) in Jiaozhou Bay, China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **27**: 887-897.

- Hamdani A. & Soltani-Mazouni N., 2011.** Changes in Biochemical Composition of the Gonads of *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) from the Gulf of Annaba (Algeria) in Relation to Reproductive Events and pollution. *Jordan Journal of Biological Sciences*, **4** (3): 146-156.
- Hamdani A., 2007.** Caractérisation biochimique des populations de *Donax trunculus* vivants dans deux sites du golfe d'Annaba : analyse quantitative des acides nucléiques et qualitative et quantitative des protéines. Thèse de Magistère. Université d'Annaba, 79 p.
- Hamdani A., 2013.** La reproduction chez un Mollusque Bivalve *Donax trunculus* L. dans le golfe d'Annaba. Rapport entre les aspects cytologique et biochimique et la pollution. Thèse de doctorat en Sciences Naturelles, mention Biologie Animale. Université d'Annaba, p. 365.
- Hamed M.A., 2002.** Physicochemical variables that regulate mobilization and immobilization of toxic heavy metals in aquatic environment. *Report National Institute of Oceanography and Fisheries*, 96.
- Hamza-Chaffai A., 1993.** Bioaccumulation métallique et métallothionéines chez des poissons de la côte de Sfax (Golfe de Gabe`s). Doctorat de spécialité, Université de Sfax, pp 168.
- Hamza-Chaffai A., Roméo M., Gnassia-Barelli M. & El Abed A., 1998.** Effects of copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **61**: 397- 404.
- Hamza-Chaffai A., Amiard J.C. & Cosson R.P., 1999.** Relationship between metallothioneins and metals in a natural population of clam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast: a nonlinear model using box-cox transformation. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **123**: 153-163.
- Harriague A., Gaozza L., Montella A. & Misic C., 2006.** Benthic communities on a sandy Ligurian beach (NW Mediterranean). *Hydrobiologia*, **571**: 383-394.
- Haynes D., Leeder J. & Rayment P., 1997.** A comparison of the bivalve species *Donax deltoides* and *Mytilus edulis* as monitors of metal exposure from effluent discharges along the ninety mile beach, Victoria, Australia. *Mar. Pollut. Bull.*, **34**: 326-331.
- Hoarau P., Gnassia-Barelli M., Roméo M. & Girard J.P., 2001.** Differential induction of Glutathione S-Transferases in the clam *Ruditapes decussates* exposed to organic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 523-529.
- Hong S.H., Park H.J. & Kong K.H., 1999.** Purification and biochemical properties of glutathione S-transferase from *Oryza sativa*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **122**: 21-27.
- Huang Y. H., Shih C. M., Huang C. J., Lin C. M., Chou C. M., Tsai M. L., Liu T. P., Chiu J. F. & Chen C. T., 2006.** Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu, Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *Journal of cellular biochemistry*, **98**: 577-89.
- Huang H., Wu., J.Y. & Wu., J.H., 2007.** Heavy metal monitoring using bivalved shellfish from Zhejiang coastal waters, East China Sea. *Environmental monitoring and assessment*, **129**: 315-320.
- Hylland K., Kaland T. & Andersen T., 1994.** Subcellular Cd accumulation and Cd-binding proteins in the netted dog whelk, *Nassarius reticulatus* L. *Mar Environ Res.*, **38**: 169-193.
- Idardare Z., Moukrim A., Chiffolleau J.F. & Ait Alla A., 2011.** Trace metals in the clam *Donax trunculus* L. from the Bouadisse sandy beach, discharge zone of a plant sewage outfall in Agadir Bay (Morocco). Bayed A. (ed.). Sandy beaches and coastal zone management – Proceedings of the Fifth International Symposium on Sandy Beaches, 19th-23rd October 2009, Rabat, Morocco *Travaux de l'Institut Scientifique*, Rabat, série générale, n°6, 51-58.
- Indeherberg M.B.M, van Straalen N.M. & Schockaert E.R., 1999.** Combining life-history and toxicokinetic parameters to interpret differences in sensitivity to cadmium between populations of *Polycelis tenuis* (Platyhelminthes). *Ecotoxicol Environ Saf.*, **44**: 1–11.
- James R., Sampath K., Sivakumar V. & Manthiramoorthy S., 1991.** Individual and combined effect of heavy metals on survival and biochemistry of *Oreochromis mossambicus*. *Indian J. Fish.*, **38**: 49-54.
- Jeanet A.Y., Ballan-Dufrançais C. & Martin J.L., 1985.** Recherche des mécanismes de détoxification du cadmium par l'huître *Crassostrea gigas* (Mollusque Bivalve). II. Sites

intracellulaires d'accumulation du métal dans les organes absorbants et excréteurs. *C. R. Acad. Sci., Paris, sér. III.*, **301**: 177-182.

- Jebali J., Banni M., De Almeida E.A., Boussetta H., 2007.** Oxidative DNA damage levels and catalase activity in the clam *Ruditapes decussatus* as pollution biomarkers of Tunisian marine environment. *Environ. Monit. Assess.*, **124**: 195–200.
- Johnson D., 2008.** Environmental indicators: their utility in meeting the OSPAR Convention's regulatory needs. *ICES journal of marine science*, **65**: 1387-1391.
- Juste C., Chassin P., Gomez A., Linères M. & Mocquot B., 1995.** Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines. Convention Ademe /I.N.R.A. (contrat INRA n° 22/92.039-contrat Ademe n° 2750007).
- Kaiser J., 2001.** Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment (Enfield: Sciences publishers inc).
- Kamel N., Jebali J., Banni M., Ben Khedher S., Chouba L. & Boussetta H., 2012.** Biochemical responses and metals levels in *Ruditapes decussates* after exposure to treated municipal effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **82**: 40–46.
- Kamisaka K., Habig W.H., Kelly J.N., Arias I.M. & Jackoby W.P., 1975.** Multiple forms of human glutathione S-transferase and their affinity for bilirubin. *Eur. J. Biochem.*, **60**: 153-161.
- Kavitha P. & Venkateswara J., 2007.** Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **87**: 182-188.
- Kavitha P. & Venkateswara Rao J., 2008.** Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **26**: 192–198.
- Key P.B., Wirth E.F. & Fulton M.H., 2006.** A review of grass shrimp, *Palaemonetes* spp., as a bioindicator of anthropogenic impacts. *Environmental bioindicators*, **1**: 115-128.
- Labrot F. R. D., Tisnerat G., Cabridenc R. & Narbonne J.F., 1996.** Le plomb dans l'environnement : sources, mécanismes de transfert et effets biologiques. Dans: "Aspects analytiques du plomb dans l'environnement". *coordonateur M. Morlot, Lavoisier Tec & Doc éditions.*, 3-15.
- Lagadic L. & Amiard J.C., 1997.** Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In Biomarqueurs en Ecotoxicologie. Aspects Fondamentaux. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.). *Paris, Masson*, 1-9.
- Keeran W. S. & Lee 1987.** The purification and characterisation of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **225**: 233-243.
- Kennedy V.S., 1996.** Biology of larvae and spat. In: V.S. Kennedy, R.I.E. Newell, and A.F. Able (Eds.), *The eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College Publication UM-SG-TS-96-01. 371-442.
- Khammar H., 2007.** Caractères chimiques des effluents urbains introduits au littoral d'Annaba. Mémoire de Magister. Université d'Annaba, 49p.
- Khélifi-Touhami M., Ounissi M., Saker I., Haridi A., Djorfi S. & Abdenour C., 2006.** The hydrology of the Mafrag estuary (Algeria): Transport of inorganic nitrogen and phosphorus to the adjacent coast. *Journal of food, agriculture and environment*, **4**(2): 340-346.
- Khessiba A., Hoarau P., Gnassia-Barelli M., Aissa P. & Roméo M., 2001.** Biochemical response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Bizerta (Tunisia) to chemical pollutant exposure. *Arch Environ Contam Toxicol.*, **40**: 222–229.
- Khessiba A., Roméo M. & Aissa P., 2005.** Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environ Pollut.*, **133**: 275–281.
- Knakievicz T. & Ferreira H.B., 2008.** Evaluation of copper effects upon *Girardia tigrina* freshwater planarians based on a set of biomarkers. *Chemosphere*, **71**: 419–428.

- Kohler K. & Riisgard H.U., 1982.** "Formation of metallothioneins in relation to accumulation of cadmium in the common mussel *Mytilus edulis*." *Mar. Biol.*, **66**: 53-58.
- Kopecka J., Rybakovas A., Barsiene J. & Pempkowiak J., 2004.** AChE levels in mussels and fish collected off Lithuania and Poland (southern Baltic). *Oceanologia*, **46**: 405–418.
- Ladhar-Chaabouni R., Gargouri R. & Hamza-Chaffai A., 2007.** Effect of cadmium on some biomarkers in the clam *Ruditapes decussatus* : Metallothionein quantification by using two techniques. *Inter.J. Environ. Pollu.*, **30**: 593-601.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. & Ramade F., 1997.** Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. *Masson. Paris*, pp 417.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. & Ramade F., 1998.** Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Lavoisier. Paris*, pp 320.
- Laib E. & Leghouchi E., 2011.** Cd, Cr, Cu, Pb, and Zn concentrations in *Ulva lactuca*, *Codium fragile*, *Jania rubens*, and *Dictyota dichotoma* from Rabta Bay, Jijel (Algeria). *Environ Monit Assess* DOI 10.1007/s10661-011-2072-0.
- Langston W. J. & Spence S. K., 1995.** Biological factors involved in metal concentrations observed in aquatic organisms. *Environ. Sci. Tech.*, **26**: 407-467.
- 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.
- Leblanc G.A. & Cochrane B.J., 1987.** Identification of multiple glutathione S-transferases from *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **88** (1): 39-45.
- Legeay A., Achard-Joris M., Baudrimont M., Massabuau J.C. & Bourdineaud J.P., 2005.** Impact of cadmium contamination and oxygen levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Aquat. Toxicol.*, **74**: 242–253.
- Lei W., Wang L., Liu D., Xu T. & Luo J., 2011.** Histopathological and biochemical alternations of the heart induced by acute cadmium exposure in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. *Chemosphere*, **84**: 689–694.
- Leiniö S. & Lehtonen K., 2005.** Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comp. Biochem. Physiol C.*, **140**: 408–421.
- Le Pennec G., & Le Pennec M., 2003.** Induction of glutathione S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L.): application of a new cellular model in biomonitoring studies. *Aquat. Toxicol.*, **64**: 131-142.
- Livingstone D.R., Lemaire P., Matthews A., Peters L., Bucke D. & Amlap W.R., 1993.** Pro-oxidant, anti-oxidant and 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity responses in liver of Dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Mar. Pollut. Bull.*, **26**: 602-606.
- Livingstone D.R., 1998.** The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative biochemistry and physiology part A: Molecular & integrative physiology*, **120**: 43-49.
- Livingstone D.R., 2001.** Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, **42**: 656–666.
- Livingstone D.R., 2003.** Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev Med Vet.*, **154**: 427–430.
- Lucas A., 1965.** Recherche sur la sexualité des Mollusques Bivalves. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, **99**: 115-247.
- Luna A., Costa A .L .H., Da Costa A.C.A. & Henriques C.A., 2010.** Competitive biosorption of cadmium (II) and zinc (II) ions from binary system by *Sargassum Filipendula* *Bioresour.Technol.*, **101**: 5104-5111.
- Luoma N. & Rainbow P.S., 2008.** Metal Contamination in Aquatic Environment. Science and Lateral Management, Cambridge University Press, New York, NY, USA, 2008.

- Luzzatto D. C. & Penchaszadeh P. E., 2001.** Regeneration of the inhalant siphon of *Donax hanleyanus* (Philippi, 1847) (Bivalvia, Donacidae) from Argentina. *Journal of Shellfish Research*, **20**: 149–153.
- Machreki-Ajmi M., Ketata I., Ladhar-Chaabouni R. & Hamza-Chaffai A., 2008.** The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers in *Cerastoderma glaucum*. *Ecotoxicology*, **17**: 1–11.
- Majori L., Nedoclan G., Modonutti G.B. & Daris F., 1978.** Study of the seasonal variations of some trace elements in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* taken in the Gulf of Trieste. *Rev. Int. Océanogr. Méd.*, **39**: 37–50.
- Manca Zeichen M., Agnesi S., A. Mariani A., Maccaroni A. & Ardizzone G.D., 2002.** Biology and Population Dynamics of *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Donacidae) in the South Adriatic Coast (Italy). *Estuarine. Coastal Shelf Science*, **54** (6): 971–982.
- Mariani A., Maccaroni A., Mamone R., D'Ambra R., Rampacci M. & Tancioni L., 1998.** Studio sulla distribuzione e valutazione della consistenza dei banchi di telline (*Donax trunculus*) nell'area marina prospiciente la laguna di Lesina al fine di identificare appropriate misure gestionali della risorsa. *Biol. Mar. Medit.*, **5** (3): 428–436.
- Marie V., Baudrimont M. & Boudou A., 2006.** Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere*, **65**: 609–617.
- Markert B.A., Breure A.M. & Zechmeister H.G., 2003.** Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. Bioindicators and biomonitors: principles, concepts and applications, B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, editors. *Oxford : Elsevier Science Limited*, pp: 3–39.
- Marobin D., Prat M. & Jouvenel J.Y., 2007.** Etude globale sur la Telline *Donax trunculus* (Linné 1767) en Camargue. Parc Naturel Régional de Camargue. Rapport Intermédiaire de la campagne d'automne. Contrat BIOTOPE/P2A Développement.
- Martinez-Lara E., George S.G., Lopez-Barea J. & Barcena J.A., 1997.** Purification and characterization of multiple glutathione transferase isoenzymes from grey mullet liver. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **53** (9):759–68.
- Martin-Diaz M.L., Villena-Lincoln A., Bamber S., Blasco J. & DelValls T.A., 2005.** An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, *Carcinus maenas*. *Chemosphere*, **58**: 615–626.
- Martin-Diaz M.L., Tuberty S.R., McKenney Jr C.L., Blasco J., Sarasquete C. & Del Valls T.A., 2006.** The use of bioaccumulation, biomarkers and histopathology diseases in shape *Procambarus clarkii* to establish bioavailability of Cd and Zn after a mining spill. *Environ. Monit. Assess.*, **116**: 169–184.
- Matozzo V., Tomei A. & Marin M.G., 2005.** Effects of 4-nonylphenol (xenoestrogen) and chlorpyrifos (organophosphorus pesticide) on acetylcholinesterase activity in the clam *Tapes philippinarum*. *Fresenius Environ. Bull.*, **15**: 710–714.
- Mauri M. & Orlando E., 1983.** Variability of zinc and manganese concentration in relation to sex and season in the bivalve *Donax trunculus*. *Mar. pollut., Bull.*, **14** (9): 342 - 346.
- McCarthy J.F. & Shugart L.R., 1990.** Biomarkers of environmental contamination. *Lewis Publishers, Boca Raton*.
- McLachlan A., 1990.** Dissipative beaches and macrofauna communities on exposed intertidal sands. *J. Coast. Res.*, **6**: 57–71.
- McLachlan A., 1996.** Physical factors in benthic ecology: effects of changing particle size on beach fauna. *Marine Ecology Progress Series*, **131**: 205–217.
- Mensi S.G., Moukha S., Creppy E.E. & Maaroufi K., 2008.** Metal accumulation in marine bivalves and seawater from the lagoon of Boughrara in Tunisia (North Africa). *Int. J. Environ. Res.*, **2** (3): 279–284.

- Metayer C., Gamiard J.C., Amiard-Triquet C. & Berthet B., 1985.** Facteurs biologiques et écologiques contrôlant le niveau d'éléments traces (Cd,Pb, Cu, Zn) chez les Moules et les Huîtres de la Baie de Bourgneuf. *Bull. Soc. Sc. Nat. Ouest Fr., nlle. sér., 7 (2) : 53-69.*
- Millero F.J. & Hawke D.J., 1992.** Ionic interactions of divalent metals in natural waters. *Mar. Chem., 40, 19-48.*
- Ministry of Food, Food Standards Committee, 1953.** "Report on Zinc", London: Her Majesty's Stationery Office.
- MNHN., 2006.** Inventaire du patrimoine naturel. Muséum d'histoire naturel de France. Ttp : //inpn.mnhn.fr/isb/servlet/ISBServlet.
- Mora P., Michel X. & Narbonne J.-F., 1999.** Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environ. Toxicol. Pharmacol., 7: 253-260.*
- Morgan A.J., Gregory Z.D.E. & Winters C., 1990.** Responses of thehepatopancreatic "B" cells of a terrestrial isopod (*Oniscus asellus*) to metals accumulated from a contaminated habitat: a morphomet-ric analysis. *Bull Environ Contam Toxicol., 44: 363-368.*
- Moukrim A., Kaaya A., Najimi S., Roméo M., Gnassia-Barelli M. & Narbonne J.F., 2000.** Assessment of the trace metal levels in two species of mussels from the Agadir Marine Bay, South of Morocco. *Bull. Environ. Contam. Toxicol., 65: 478-485.*
- Moukrim A., El Hamidi F., Lagbouri A., Kaaya A., Zekhnini A., Bouhaimi A. & Narbonne J.F., 2004.** *Donax trunculus* as a sentinel species for environmental monitoring of sandy beaches on Moroccan coasts. *Bull. Environ. Contam. Toxicol., 73 : 674-681.*
- 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, 130p.
- Mouëza M., 1972.** Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque Lamellibranche) dans l'Algérois : la croissance. *Pelagos, 4: 25-35.*
- Mouëza M. & Chessel D., 1976.** Contribution à l'étude de la Biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque, Lamellibranche) dans l'Algérois : analyse statistique de la dispersion le long d'une plage en baie de Bou-Ismaïl. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 21: 211-221.*
- Mouëza M. & Frenkiel-Renault L., 1973.** Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusques: Lamellibranches) dans l'Algérois: la reproduction. *Cah. Biol. Mar., 14: 261-283.*
- Mouneyrac C., Amiard J.C. & Amiard-Triquet C., 1998.** Effect of natural factor (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters (*Crassostrea gigas*) from a polluted estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser., 162: 125-135.*
- Muley D.V., Kamble G.B. & Bhilave M.P. 2000.** Effect of heavy metals on nucleic acids in *Cyprinus carpio*. *J. Environ. Biol., 21: 367-370.*
- Najimi S., 1997.** Evaluation de l'état de santé de la baie d'Agadir: bioaccumulation métallique et réponses de deux biomarqueurs de pollution chez *Mytilus galloprovincialis* et *Perna perna*. Agadir, Maroc7 Thèse Université Ibnou Zohr., 236 pp.
- Naqvi S.M., Devalraju I. & Naqvi N.H., 1998.** Copper bioaccumulation and depuration by red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 61: 65-71.*
- Neuberger-Cywiak L., Achituv Y. & Mizrahi L., 1990.** The ecology of *Donax trunculus* Linnaeus and *Donax semistriatus* Poli from the Mediterranean coast of Israel. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol., 134: 203-220.*
- Neuberger-Cywiak L., Achitwo Y., Garcia E. M., 2002.** Effects of Zinc and Cadmium on the Burrowing Behavior, LC50, and LT50 on *Donax trunculus* Linnaeus (Bivalvia,Donacidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol., 70: 713-722.*
- Neuberger-Cywiak L., Achituv Y., & Garcia E. M., 2003.** Effects of zinc and cadmium on the burrowing behavior LC50 and LT50 on *Donax trunculus* Linnaeus (Bivalvia-Donacidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 70: 713-722.*
- Neuberger-Cywiak L., Achituv Y. & Garcia E.M., 2007.** Effects of sublethal Zn++ and

- Cd⁺⁺ concentrations on filtration rate, absorption efficiency and scope for growth in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **79**: 622–627.
- NHMRC (National Health and Medical Research Council), 1987.** "National Food Standard A 12: Metals and Contaminants in Food", Canberra, Australia Australian Government Publishing Service.
- Ochi T., Takahashi K. & Ohsawa M., 1987.** Indirect evidence for the induction of a prooxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction. *Mutation Research*, **180**: 257-266.
- Oruç E.Ö. & Üner N., 2000.** Combined effects of 2, 4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **127** : 291–296.
- Ounissi M., Fréhi H. & Khélifi-Touhami M., 1998.** Composition et abondance du zooplancton en situation d'europhisation dans un secteur côtier du golfe d'Annaba (Algérie). *Analyse de l'institut océanographique, Paris*, **73** (1) : 53-67.
- Ounissi M., 2007.** Devenir et incidences des flux de matières continentales enrichissantes et polluantes dans le littoral d'Annaba. Bilan final du projet de recherche. ONEDD/MATE/05/04: 11p.
- Özden O, Erkan N, Mehmet C.D., 2009.** Trace mineral profiles of the bivalve species *Chamelea gallina* and *Donax trunculus*. *Food Chemistry*, **113**: 222–226.
- Pandey S., Parvez S., Sayeed I., Haque R., Bin-Hafeez B. & Raisuddin S., 2003.** Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallago attu (Bl. & Schn.). *Sci. Total Environ.*, **309**: 105–115.
- Parant M., 1998.** Le métabolisme des xénobiotiques chez les bivalves. *Sc. Life.*, **321** : 485-494.
- Pascal S. & Scalla R., 1998.** Purification and characterization of safener-induced glutathione S-transferase from wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.*, **106**: 17-27.
- Payne J.F., Mathieu A., Melvin W. & Fancey L.L., 1996.** Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.*, **32**: 225–231.
- Peakall D.B., 1992.** Animal biomarkers as pollution indicators. London: *Chapman Prog. Ser.*, **162**: 125-135.
- Penchaszadeh P.E. & Olivier S.R., 1975.** Ecología de una población de 'berberecho' (*Donax hanleyanus*) en Villa Gesell, Argentina. *Malacologia*, **15**: 133-146.
- Pérez E., Blasco J. & Solé M., 2004.** Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereia diversicolor* from the Cádiz bay (SW Spain). *Mar. Environ. Res.*, **58**: 275–279.
- Perez-Lopez M., Anglade P., Bec-Ferte M.P., Debrauwer L., Perdu E., Cravedi J.P. & Rouimi P., 2000.** Characterization of hepatic and extrahepatic glutathione S-transferases in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their induction by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Fish. Physiol. Biochem.*, **22**: 21-32.
- Peterson C. H., Hickerson D. H. M. & Johnson G. G., 2000.** Shortterm consequences of nourishment and bulldozing on the dominant large invertebrates of a sandy beach. *Journal of Coastal Research*, **16**: 368–378.
- Phillips D.J.H., 1976.** The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. *Mar. Biol.*, **38**: 59-69.
- Phillips D.J.H., 1990.** Use of macro algae and invertebrates as monitors of metal levels in estuaries and coastal waters. In: Heavy metals in the marine environment. Furness, R.W. et Rainbow, P.S. Eds, CRC Press, Boca Raton, pp. 81-99.
- Poulsen E., H. U. Riisgard H.U. & Mohlenberg F., 1982.** "Accumulation of cadmium and bioenergetics in the mussel *Mytilus edulis*." *Mar. Biol.*, **68**: 25-29.

- 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.
- Prapantadara L.A., Koottathep S., Promtet N., Hemingway J. & Ketterman A.J., 1996.** Purification and characterization of major glutathione S-Transferase from the mosquito *Anopheles dirus* (species B). *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **26**: 277-285.
- Pretto A., Loro V-L., Morsch V.M., Moraes B.S, Menezes C., Clasen B., Hoehne L. & Dressler V., 2010.** Acetylcholinesterase Activity, Lipid Peroxidation, and Bioaccumulation in Silver Catfish (*Rhamdia quelen*) Exposed to Cadmium. *Arch Environ Contam Toxicol.*, **58**: 1008–1014 doi 10.1007/s00244-009-9419-3.
- Pretto A., Loro V- L., Baldisserotto B., Pavanato M-A., Moraes B.S., Menezes C., Cattaneo R., Clasen B., Finamor I-A., Dressler V., 2011.** Effects of Water Cadmium Concentrations on Bioaccumulation and Various Oxidative Stress Parameters in *Rhamdia quelen*. *Arch Environ Contam Toxicol.*, **60**: 309–318 doi 10.1007/s00244-010-9586-2.
- Pruell R.J. & Engelhardt F.R., 1980.** Liver cadmium uptake, catalase inhibition and cadmium thionein production in the killifish (*Fundulus heteroclitus*) induced by experimental cadmium exposure. *Mar. Environ. Res.*, **3**: 101–111.
- Rainbow P.S., Flalkowski W., Sokolowski A., Smith B.D. & Wolowicz M., 2004.** Geographical and seasonal variation of trace metal bioavailabilities in the gulf of Gdansk, Baltic Sea, using mussels (*Mytilus trossulus*) and barnacles (*Balanus improvisus*) as biomonitors. *Mar Bio.*, **144**: 271-286.
- Rajkumar J. S. I. & John Milton M.C., 2011.** Biochemical changes induced by cadmium, copper, lead and zinc exposure to *Perna viridis* under long term toxicity test. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **2** (3) : 50-59.
- Ramakritiman A.C., Rothishri C. & Kumaraguru., 2012.** Acute toxicity of metals: Cu, Pb, Cd, Hg and Zn on marine Molluscs, *Cerithedia cingulata* G., and *Modiolus philippinarum* H. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences.*, **41** (2): 141-145.
- Ramón M., Abello P. & Richardson C. A., 1995.** Population structure and growth of *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) in the western Mediterranean. *Mar. Biol.*, **121**: 665-671.
- Rao J.V., Kavitha P., Srikanth K., Usman P.K. & Rao T.G., 2007.** Environmental contamination using accumulation of metals in marine sponges, *Sigmadocia fibulata* inhabiting the coastal waters of Gulf of Mannar, India. *Toxicological and environmental chemistry.*, **89**: 487-498.
- Rarnon M., 1993.** Estudio de las poblaciones de *Chamelea gallina* (Linnaeus, 1758) y *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) (Mollusca:Bivalvia) en el golfo de Valencia (Mediterráneo occidental). Thesis, University of Barcelona.
- Ray S., 1986.** Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Experientia*, **50**: 65-75.
- Reddy P.S. & Bhagyalakshmi A., 1994.** Changes in oxidative metabolism in selected tissues of the crab (*Scylla serrata*) in response to cadmium toxicity. *Ecotoxicol Environ Saf.*, **29**: 255–264.
- Regoli F. & Principato G., 1995.** Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*, **31**:143-164.
- Risso-de Faverney C., Orsini N., de Sousa G. & Rahmani R., 2004.** Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress. *Aquat Toxicol.*, **69**: 247–258.
- Ritola O, Livingstone D.R, Peters L.D. & Lindstrom-Seppa P., 2002.** Antioxidant processes are affected in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to ozone and oxygen-supersaturated water. *Aquaculture*, **210**: 1–19.
- Ritz D.A., Swain R. & Elliot N.G., 1982.** Use of the mussel: *Mytilus edulis planulatus* (Lamarck) in monitoring heavy metal levels in seawater. *Aus. J. Mar. Fresh Water Res.*, **33**: 491-506.
- Rodriguez-Ariza A., Martinez-Lara E., Pascual P., Pedrajas J.R, Abril N. & Dorado G., 1993.** Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Sci Total Environ Suppl.*, **93**: 109–13.

- Romeo M. & Gnassia-Barelli M., 1988.** *Donax trunculus* and *Venus verrucosa* as bioindicators of trace metal concentrations in Mauritanian coastal waters. *Mar. Biol.*, **99**: 223-227.
- Romeo M, Bennani N, Gnassia-Barelli M, La Faurie M. & Girard J.P., 2000.** Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat Toxicol.*, **48**: 185–194.
- Roméo M., Hoarau P., Garello G., Gnassia-Barelli M. & Girard J.P., 2003.** Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environ Pollut.*, **122**: 369–378.
- Rosenthal H. & Sperling K.R., 1974.** Effects of cadmium on development and survival of herring eggs. Blaxter, J.H.S., Editor, 1974. The Early Life History of Fish Proc. In. Symp., Springer-Verlag, New York/ Berlin., PP: 383-396.
- Rouimi P., Anglade P., Debrauwer L. & Tulliez J., 1996.** Characterization of pig liver glutathione S-transferases using HPLC-electrospray-ionization mass spectrometry. *Biochem. J.*, **317**: 879-884.
- Saker I.E., 2007.** Pollution chimiques par les effluents industriels directs introduits au littoral d'Annaba. Mémoire de Magister. Université d'Annaba, 34p.
- Salas C., 1987.** Ecología de los Donacidae (Mollusca, Bivalvia) de la Bahía de Málaga (SE de España). *Inv. Pesq.*, **51** (1): 67-77.
- Salas C., Tirado C. & Manjon-Cabeza M. E., 2001.** Sublethal footpredation on Donacidae (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Sea Research*, **46**: 43–56.
- Salinas A.E. & Wong M.G., 1999.** Glutathione S-transferases--a review. *Curr Med Chem.*, **6** (4): 279-309.
- Sammarco P.W., Hallock P., Lang J.C. & LeGore R.S., 2007.** Roundtable discussion groups summary papers: environmental bio-indicators in coral reef ecosystems: the need to align research, monitoring, and environmental regulation. *Environmental bioindicators*, **2**: 35-46.
- Sandrini J.Z., Ventura Lima J., Regoli F., Fattorini D., Nottic A., Marinsa L.F. & Monserrat J. M., 2008.** Antioxidant responses in the nereidid *Laeonereis acuta* (Annelida, Polychaeta) after cadmium exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **70**: 115–120.
- Sanita Di Toppi L. & Gabbrielli R., 1999.** Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp. Bot.*, **41**: 105-130.
- Sarkar B., 2002.** Heavy metals in the environment. pp. 231-234/457-458.
- Scheifler R., Gauthier-Clerc M., Bohec CL., Crini N., Cœurduassier M. & Badot P.M., 2005.** Mercury concentrations in king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) feathers at Crozet Islands (sub-Antarctic): temporal trend between 1966–1974 and 2000–2001. *Environ Toxicol Chem.*, **24**: 125–8.
- Schmidt G. H. & Ibrahim N. M. M., 1994.** Heavy metals content (Hg²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺) in various body parts: impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in the grasshopper *Aiolopus thalassinus* adultes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **29**: 149-164.
- Semadi A. & Deruelle S., 1993.** Lead pollution monitoring by transplanted lichens in Annaba area (Algeria). *Rev. Poll. Atmos.*, Oct-Dec: 86-102.
- Sevgiler Y., Oruc N, U. & Ner N., 2004.** Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Pest Biochem Physiol.*, **78**: 1–8.
- Shailaja M.S. & D'Silva C., 2003.** Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere*, **53**: 835–841.
- Shuhaimi-Othman M., Yakub N., Ramle N.A. & Abas A., 2011.** Toxicity of Metals to a Freshwater Ostracod: *Stenocypris major*. *Journal of Toxicology*, ID 136104, doi:10.1155/2011/136104.
- Sidoumou Z., Gnassia-Barelli M., Siau Y., Morton V. & Romeo M., 2006.** Heavy metal concentrations in molluscs from the Senegal coast. *Environ. Int.*, **32**: 384-387.
- Siedlecka A. & Krupa Z., 2002.** Functions of enzymes in heavy metal treated plants. In: Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Prasad M.N.V. et Strzalka K. (Eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 303-324.

- Sies H., 1993.** Strategies of antioxidant defenses. *Eur J Bio-chem.*, **215**: 213–219.
- Sies H., 1997a.** Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy. London, UK: *Academic Press*.
- Sies H., 1997b.** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, **82**: 291-5.
- 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.
- Sifi K., 2009.** Biosurveillance de la qualité des eaux du golfe d'Annaba : croissance, composition biochimique et dosage des biomarqueurs du stress environnemental chez *Donax trunculus* (Mollusque, Bivalve). Thèse de Doctorat en Biologie Animale, Université d'Annaba, 229.
- Sifi K., Amira A. & Soltani N., 2013.** Oxidative stress and biochemical composition in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria). *Advances in Environmental Biology*, **7** (4): 595-604.
- Smaoui-Damak W., Hamza-Chaffai A., Berthet B. & Amiard J.C., 2003.** Preliminary study of the clam *Ruditapes decussates* exposed in situ to metal contamination and originating from the Gulf of Gabès, Tunisia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **71**: 961-970.
- Smaoui-Damak W., Hamza Chaffai A., Bebianno M.J. & Amiard J.C., 2004.** Variation of metallothioneins in gills of the clam (*Ruditapes decussatus*) from the Gulf of Gabès, (Tunisia). *Comp. Biochem. Physiol.C.*, **139**: 181-188.
- Smolders R., Bervoets L., Wepener V. & Blust R., 2003.** A conceptual framework for using mussels as biomonitors in whole effluent toxicity. *Human and ecological risk assessment*, **9**: 741-760.
- Sobral P. & Widdows J., 1997.** Effects of copper exposure on the scope for growth of the clam *Ruditapes decussatus* from Southern Portugal. *Marine. Pollution. Bulletin*, **34**: 992-1000.
- Sokolova I. M., Sokolova E. P. & Ponnappa K. M., 2005.** Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquat. Toxicol.*, **73**: 242-255.
- Solé M., Porte C. & Albaiges J., 1995.** The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. *Sci Total Environ.*, **159**: 147–53.
- Soltani N., Amira A, Sifi K. & Beldi H., 2012.** Environmental monitoring of the Annaba gulf (Algeria): measurement of biomarkers in *Donax trunculus* and metallic pollution. *Bull. Soc. Zool.*, **137** (1-4): 47-56.
- Sorensen E.M., 1991.** Cadmium In, Metal Poisoning in Fish. *CRC Press, Boca Raton, Florida, USA*, pp. 175-234.
- Souid G., Souayed N, Yaktiti F. & Maaroufi K., 2012.** Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, article in press.
- Souid G., Souayed N., Yaktiti F. & Maaroufi K. 2012.** Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.015> (In press).
- Spehar R., Anderson R. & Fiandt J. 1978.** Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic invertebrates. *Environ Pollut.*, **15**: 195-208.
- Stagg R.M., 1998.** The development of an international programme for monitoring the biological effects of contaminants in the OSPAR convention area. *Marine environmental research*, **46**: 307-313.
- Stenersen J., Guthenberg C. & Mannervik B., 1979.** Glutathione transferase in earthworms (Lumbricidae). *Biochem. J.*, **181**: 47-50.
- Stenersen J., Bjerke M. & Arend U., 1987.** Glutathione transferases in aquatic and terrestrial animals from nine phyla. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **86** (1):73-82.
- Stephensen E., Svavarsson J, Sturve J, Ericson G, Adolfson-Erici M. & Forlin L., 2000.** Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the south-west coast of Iceland. *Aquat. Toxicol.*, **48**: 431-442.

- Stien X., Percic P., Gnassia-Barelli M., Roméo M. & Lafaurie M., 1998.** Evaluation of different biomarkers in caged fish and mussels to assess the quality of waters in the bay of Cannes (Côte d'Azur), SE France. *Environ Pollut.*, **99**: 339–45.
- Swaroop S., Gilroy A.B. & Uemura K., 1966.** Statistical methods in Malaria eradication. World Health Organisation, *Geneva*, **51**: 1-164.
- Tayaa H., 2007.** Caractéristique morphologique et variation de deux biomarqueurs du stress environnemental (LDH, MDA) dans deux sites du golfe d'Annaba chez *Donax trunculus* : corrélation avec le métabolisme lipido-glucidique. Thèse de Magistère en Biologie Animale option Ecologie Animale Université d'Annaba, 72p.
- Taylor D., 1983.** The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotox. Environ. Safe.*, **71**: 33-42.
- Teles M., Pacheco M. & Santos M.A., 2003.** *Anguilla Anguilla L.*, liver ethoxyresorufin odeethylation, glutathioneS-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalène and B-naphthoflavone. *Ecotoxicology Environmental and Safety*, **55** (1): 98–107.
- Thébaud 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. 73 p et annexes.
- Tiwari M., Nagpure N.S., Saksena D.N., Kumar R., Singh S.P., Kushwaha B. & Lakra W.S., 2011.** Evaluation of acute toxicity levels and ethological responses under heavy metal cadmium exposure in freshwater teleost, *Channa punctata* (Bloch). *International Journal of Aquatic Science*, **2** (1): 36-47.
- Tlili S., Métais I., Boussetta H. & Mouneyrac C., 2010.** Linking changes at subindividual and population levels in *Donax trunculus*: assessment of marine stress. *Chemosphere*, **81** : 692–700.
- Toutant J.P. & Massoulié J., 1988.** Cholinesterases: tissue and cellular distribution of molecular forms and their physiological regulation. In: Whittaker, V.P. (Ed.), *The Cholinergic Synapse*. Springer, Berlin and Heidelberg, pp. 225–265.
- Truhaut R., 1977.** Ecotoxicology: objectives, principles, and perspectives. *Ecotox Envir Saf.*, **1**: 151-173.
- Tu T.H., Silvestre F., Meulder D.B., Thome J.P., Phuong N.T. & Kestemont P., 2012.** Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Chemosphere*, **86**: 83–91.
- Uma D., 1996.** Bioaccumulation and Metabolic Effects of Cadmium on Marine Fouling Bivalve, *Mytilopsis sallei* (Reeluz). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **31**: 47-53
- Usero J., Morillo J. & Gracia I., 2005.** Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain. *Chemosphere*, **59**: 1175-1181.
- Vaissière R. & Fredj G., 1963.** Contribution à l'étude de faune benthique du plateau continental de l'Algérie. 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, 130p.
- Van Kolck M., Huijbregts M.A.J., Veltman K. & Hendriks A.J., 2008.** Estimating bioconcentration factors, lethal concentrations and critical body residues of metals in the mollusks *Perna viridis* and *Mytilus edulis* using ion characteristics. *Environ. Toxicol. Chem.*, **27**: 272–276.
- Van der Oost R., Beyer J. & Vermeulen N.P.E., 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **13**: 57-149.
- Varo I., Pastor A., Ramo J. & Torreblanca A., 2012.** Long-term effect of temperature on bioaccumulation of dietary metals and metallothionein induction in *Sparus aurata*. *Chemosphere*, **87**: 1215–1221.

- Veloso K.P., Beck H. & Wiedemann R.O., 1953.** Moluscos comestíveis da costa riograndense (*Donax hanleyanus*). *Res. Assoc. Bras. Quím.*, **10**: 216-224.
- Venkateswara Rao J., Begum G., Pallela R., Usman PK. & Nagaswara Rao R., 2005.** Changes in behavior and brain acetylcholinesterase activity in mosquitofish, *Gambusia affinis* in response to the sub-lethal exposure to chlorpyrifos. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **2** (3): 478–483.
- Verlecar X.N., Jena K.B. & Chainy G.B.N., 2008.** Modulation of antioxidant defences in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposures, *Chemos.*, **71**: 1977-1985.
- Viarengo A. & Nott J.A., 1993.** Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **104**: 355-372.
- Viaroli P., Bartoli M., Giordani G., Austoni M. & Zaldivar J.M., 2005.** Biochemical processes in coastal lagoons : from chemical reactions to ecosystem functions and properties. Indicators of stress in the marine benthos. IOC workshop report No. 195, pp. 27-30.
- Vicente N., Henry M., Chabert D. & Riva A., 1988.** Contrôle de métaux lourds dans les écosystèmes littoraux et dans les chaînes alimentaires marines : expériences de contamination par un élément métallique, le cadmium. *Océanis.*, **14** (1): 201-223.
- Vutukuru S.S., Suma C., Radha Madhavi K., Juveria Smitha Pauleena J., Venkateswara Rao J. & Anajaneyulu Y., 2005.** Studies on the development of potential biomarkers for rapid assessment of copper toxicity to freshwater fish using *Esomus danricus* as model. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, **2**: 63– 73.
- Walsh K., Dunstan R.H., Murdoch R.N., Conroy B.A., Roberts T.K. & Lake P., 1994.** Bioaccumulation of pollutants and changes in population parameters in the gastropod mollusk, *Austrocochlea constricta*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **26**: 367–373.
- Wang L., Yan B., Liu N., Li Y. & Wang L.Q., 2008.** Effects of cadmium on glutathione synthesis in hepatopancreas of freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense*. *Chemosphere*, **74**: 51–56.
- Wani G.P. & Latey A.N., 1983.** Toxic effects of cadmium on the liver of a freshwater teleost, *Garra mullaya* (Sykes). *Curr. Sci.*, **52**: 1034-1035.
- Warwick R., 2005.** Taxonomic distinctness as an indicator of stress in the marine macrobenthos. Indicators of stress in the marine benthos, IOC workshop report No. 195, pp.10-11.
- Wilson J.G., 1999.** Population dynamics and energy budget for a population of *Donax 753 variabilis* (Say) on an exposed South Carolina beach. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **239**: 61-83.
- Won E.J., Kim R.O., Rhee J.S., Park G.S., Lee J., Shin K.H., Lee Y.M. & Lee J.S., 2011.** Response of glutathione S-transferase (GST) genes to cadmium exposure in the marine pollution indicator worm, *Perinereis nuntia*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **154**: 82–92.
- Wood J.M., 1976.** Les métaux toxiques dans l'environnement. *La Recherche*, **70**: 711-719.
- Wu H., Zhang R., Liu J., Guo Y. & Ma E., 2011.** Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). *Chemosphere*, **83**: 599–604.
- Yang C.F., Shen H.M., Shen Y., Zhuang Z.X. & Ong C.N., 1997.** Cadmium-induced oxidative cellular damage in human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells). *Environmental Health Perspectives*, **105**: 712-716.
- Zaidi N. & Soltani N., 2010.** Chronic toxicity of flucycloxon in the mosquitofish, *Gambusia affinis* : acetylcholinesterase and catalase activities and pattern of recovery. *Ann. Biol. Res.*, **1**(4): 210-217.
- Zaidi N. & Soltani N., 2011.** Environmental risks of two chitin synthesis inhibitors on *Gambusia affinis*: Chronic effects on growth and recovery of biological responses. *Biological Control.*, **59**: 106–113.
- Zaidi N. & Soltani N., 2013.** Laboratory evaluation of environmental risk assessment of pesticides for mosquito control: toxicity of dimilin on a larvivorous fish, *Gambusia affinis*. *Advances in Environmental Biology*, **7** (4): 605-613.

Zhao X., Zheng M., Liang L., Zhang Q., Wang Y. & Jiang G., 2005. Assessment of PCBs and PCDD/Fs along the Chinese Bohai sea coastline using mollusks as bioindicators. *Archives in environmental contamination and toxicology*, **49**: 178-185.

ANNEXE 1

Production scientifique (publications & communications)

1. Publications (2) :

Belabed S., Allout S. & Soltani N., 2011. Pollution des eaux du golfe d'Annaba: croissance et stress oxydatif chez *Donax trunculus* (Linnaeus, 1767) (Mollusca, Bivalvia). *Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM Salammbô)*, NS **15** : 1-5.

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.

2. Communications (6) :

Belabed S., Allout S. & Soltani N., 2010. Pollution des eaux du golfe d'Annaba : croissance et stress oxydatif chez *Donax trunculus*. *8^{èmes} Journées Tunisiennes des Sciences de la Mer*, 16-19 décembre 2010- Hammamet.

Belabed S. & Soltani N., 2011. Toxicité aigue du cadmium à l'égard d'un mollusque bivalve *Donax trunculus*. *3^{ème} Séminaire International de Biologie Animale, Constantine 9-11 Mai 2011*.

Belabed S. & Soltani N., 2011. Létalité et restauration des réponses chez une espèce comestible et bioindicatrice de la pollution (*Donax trunculus*) : Stress oxydatif. *1^{er} Congrès sur la biodiversité Animale et Ecologie de la Santé* : 15 -18 Octobre 2011- Annaba.

Belabed S. & Soltani N., 2012. Etude de la toxicité aigue du cadmium a l'égard de *Donax trunculus* en condition de laboratoire. *Les 3^{èmes} Journées Scientifiques de l'Association Tunisienne de Toxicologie. Toxicologie- Environnement- Santé* : 03 - 05 Février 2012, Tabarka.

Belabed S. & Soltani N., 2012. Evaluation de la bioaccumulation du cadmium chez *donax trunculus* en condition de laboratoire. *Les 14^{èmes} journées tunisiennes des sciences de la mer*. 15–18 décembre 2012, Sousse.

Merad I., Belabed S. & Soltani N., 2012. Effet sublétaI du cadmium sur la biochimie des gonades de *Donax trunculus* L. en activité de reproduction : variation au cours de l'exposition et de la dépuratIOn. *Les 14^{èmes} Journées Tunisiennes des Sciences de la Mer*. 15–18 décembre 2012, Sousse.

ANNEXE 2

Pollution des eaux du golfe d'Annaba : croissance et stress oxydatif chez *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) (Mollusca, Bivalvia)

Soumeya BELABED, Selma ALLOUT & Noureddine SOLTANI*

Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar
d'Annaba, 23000-Annaba (Algérie)

*noureddine.soltani@univ-annaba.org

Résumé

Ce travail entre dans le cadre du programme de biosurveillance de la qualité des eaux du golfe d'Annaba utilisant une espèce bioindicateur de la pollution, comestible et très abondante, *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia). Pour cela nous avons effectué une étude biométrique portant sur la longueur antéro-postérieure de la coquille ainsi qu'un suivi mensuel de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) dans deux sites : El-Battah et Sidi Salem. L'étude biométrique montre qu'il existe une taille maximale (37 mm) enregistrée chez la population de *D. trunculus* du site El-Battah avec des différences mensuelles de croissance entre les deux sites d'études. Le dosage de la GPx indique une augmentation de l'activité de ce biomarqueur au niveau de Sidi Salem comparativement à El-Battah. Ceci est en rapport avec le niveau de pollution relativement élevé à Sidi Salem.

Abstract

This work is included within the framework of a biomonitoring program of the gulf of Annaba by the use a bioindicator species, *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia). For that, we carried out a biometric study on the antero-posterior length of the shell as well as a monthly measure of the activity of glutathione peroxidase (GPx) in two sites: El-Battah and Sidi Salem. The biometric study shows that there was a maximum size (37 mm) recorded in *D. trunculus* from El-Battah. The measurement of GPx indicates an increase in the rate of this biomarker at Sidi Salem, site considered as polluted, comparatively with those of El-Battah. These difference observed between the two sites is related to their pollution level.

الملخص

يدخل هذا العمل في إطار برنامج مراقبة نوعية مياه خليج عنابة ، و ذلك استخدام كائن رخوي ثنائي القوقعة حارس صالح للأكل و متوفر كثيرا على مستوى الخليج *Donax trunculus*. لذلك قمنا بانجاز دراسة بيومترية لطول القوقعة إضافة إلى متابعة شهرية لتغيرات نشاط GPx على مستوى موقعين سيدي سالم و البطاح. الدراسة البيومترية بينت وجود طول أقصاه 37 سم لقوقعة سجل عند فئة البطاح مع اختلافات شهرية في النمو بين الموقعين. قياس المؤشر الحيوي GPx يدل على وجود ارتفاع في نشاط هذا المؤشر عند فئة سيدي سالم و الذي يعتبر وسط ملوث مقارنة مع موقع البطاح.

INTRODUCTION

La pression anthropogénique exercée sur l'environnement marin, constitue un problème écologique réel, en particulier dans les pays industrialisés. La ville d'Annaba est le siège d'une forte activité industrielle qui contribue aux rejets de multiples polluants tels que les métaux lourds et les pesticides (ABDENOUR *et al.*, 2000; 2004 ; BELDI *et al.*, 2006 ; OUNISSI, 2007 ; BOYD, 2010). Les multiples pollutions qui découlent d'une telle activité humaine et industrielle ont pour point de convergence le milieu marin (BOUZERAA *et al.*, 2004). Ceci a permis la mise au point d'outils de biosurveillance écotoxicologique appelés biomarqueurs qui rendent compte des niveaux de pollution auxquels sont soumis les bioindicateurs (LAVADO *et al.*, 2006). Les biomarqueurs constituent donc un outil biologique naturel qui peut signaler la pollution d'un milieu ainsi que la biodisponibilité des substances toxiques (MC CARTHY & SHUGART, 1990 ; LAGADIC *et al.*, 1994 ; ROMEO *et al.*, 2000 ; LAM, 2009). En tant que filtreurs, les bivalves sont de meilleur modèle représentatif pour les études de l'effet du stress sur le mécanisme de défense antioxydant (VERLECAR *et al.*, 2006). C'est pourquoi, notre travail vise à préciser la variation mensuelle de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx, EC 1.11.1.9), enzyme impliquée dans la réduction du peroxyde d'hydrogène, des lipides hydroperoxydes et d'autres types de peroxydes en eau ou en alcools mais aussi dans l'élimination du radical hydroxylé (DRAPER & HADLEY, 1990), chez une espèce de bivalve *Donax trunculus*, considéré comme un excellent bioindicateur de la pollution marine (FISHELSON *et al.*, 1999; MOUKRIM, 2004; SOLTANI *et al.*, 2005 ; SIFI *et al.*, 2007). La croissance et la dynamique des populations (Beldi, 2007) ainsi que le cycle reproducteur (HAMDANI & SOLTANI-MAZOUNI, 2011) de *D. trunculus* dans le golfe d'Annaba ont été précisés. La GPx a été évaluée dans le manteau de *D. trunculus*, pêché durant trois mois (février, mars, avril) de l'année 2009 au niveau de deux sites du golfe d'Annaba : El Battah pris comme référence, et Sidi Salem, un site pollué par différents rejets issus des activités urbaines, portuaires et industrielles. Ce travail est complété par une étude biométrique.

MATERIEL ET METHODES

Présentation des sites de prélèvement

Le golfe d'Annaba est situé à l'extrême Nord Est du littoral algérien, le climat est de type méditerranéen caractérisé par un hiver doux et humide et un été sec et chaud. limité à l'Est par le cap Rosa (8° 15'E et 36° 58'N), et à l'Ouest par le cap Garde (7° 16'E et 36° 58' N), distant de 40 Km et une profondeur qui ne dépasse pas 65 m. Le site El Battah (36° 50'N-8° 50'E), placé environ 30 kilomètres à l'est d'Annaba caractérisé par son éloignement de toute source de pollution et est soumis à un régime hydrodynamique important, le second site Sidi Salem (36° 50'N-7° 47'E) situé environ 1 kilomètre à l'est d'Annaba, reçoit, par le biais de l'oued Seybouse, des déchets urbains en plus des rejets d'une zone industrielle spécialisée dans la production de fertilisants et de produits phytosanitaires (Fig. 1).



Figure 1. Position géographique du golfe d'Annaba et sites d'échantillonnage (1 Sidi Salem, 2 : El Battah).

Présentation de l'espèce

Donax trunculus (LINNAEUS, 1758) est un Mollusque Bivalve très répandu dans le golfe d'Annaba (VAISSIERE et FREDJ, 1963) et est consommé par les populations locales. C'est un organisme filtreur et sédentaire, qui reflètent au mieux les conditions du milieu, vu leurs capacités à accumuler dans leurs tissus divers polluants (VALAVANIDIS *et al.*, 2006) et métaux lourds (BELDI *et al.*, 2006). Il se nourrit de phytoplancton et de matières organiques en suspension.

Collecte des échantillons

L'échantillonnage de *D. trunculus* a été effectué mensuellement de février à avril 2009 d'une manière aléatoire à l'aide d'un râteau à main ou cope. Le dosage biochimique a été effectué sur des individus vivants ayant une taille moyenne de 25 ± 1 mm et un poids moyen 264 ± 67 mg. La moitié du manteau de chaque individu est prélevé et servira au dosage de la glutathion peroxydase (GPx). De plus, une mesure de la longueur antéro-postérieure a été réalisée à l'aide d'un pied à coulisse sur 100 individus/ site et par mois, prélevés d'une façon aléatoire.

Activité de la glutathion peroxydase

L'activité du glutathion peroxydase est mesurée avec un kit Sigma-Aldrich (LAWRENCE & BURCK, 1976.). Ce dernier utilise une méthode de détermination indirecte basée sur l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG); cette réaction est catalysée par le GPx, qui sera par la suite couplé pour le recyclage du GSSG en GSH en présence du glutathion réductase (GR) et du NADPH. La diminution de l'absorbance de NADPH mesurée à 340 nm pendant l'oxydation de NADPH en NADP⁺ est une indication de l'activité de GPx, puisque le GPx est le facteur limitant le taux de la réaction couplée. La réaction est exécutée à 25°C et pH 8. Après centrifugation (9000 trs/mn, 15 mn à 4 C°), une fraction aliquote de 50 µl du surnageant est récupérée et additionnée 890 µl du tampon glutathion peroxydase, 50 µl de NADPH et 10 µl de substrat tert-butyl Hydroperoxyde (t-Bu-OOH) sont ajoutés. Après 15 secondes de repos, la lecture des absorbances, s'effectue à 340 nm toutes les 10 secondes pendant 1 minute.

Analyse statistique

Les données obtenues ont été traitées par différents tests statistiques tels que la régression linéaire, le test "t" de Student et l'analyse de la variance à deux critères de classification (site, mois). Les données ont été traitées à l'aide du logiciel d'analyse statistique MINITAB (Version 13.31, Penn State College, PA, USA). Le niveau de signification est $p < 0,05$.

RESULTATS

Les variations mensuelles de la longueur (mm) de la coquille de *D. trunculus* sont représentées dans le tableau I. La longueur varie de $21,1 \pm 0,21$ à $22,2 \pm 0,12$ à Sidi Salem, et de $22,5 \pm 0,25$ jusqu'à $24,8 \pm 0,21$ à El Battah. Une différence hautement significative ($p < 0,001$) est notée aux mois de mars et avril entre les deux sites.

Tableau I: Variation mensuelle de la longueur de la coquille (mm) de *D. trunculus* pêché dans deux sites du golfe d'Annaba: El-Battah et Sidi Salem de février à avril 2009 ($m \pm s$; $n = 100$).

Sites Mois	Sidi Salem	El Battah	P
Février	$22,2 \pm 0,12$	$22,5 \pm 0,25$	0,290
Mars	$21,1 \pm 0,21$	$22,8 \pm 0,29$	0,000***
Avril	$21,3 \pm 0,20$	$24,8 \pm 0,21$	0,000***

Activité de la glutathion peroxydase (GPx)

Les résultats relatifs à la GPx exprimés en $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ du surnageant sont représentés dans le tableau II et la figure 1. Ils montrent une activité minimale enregistrée au mois de février aussi bien pour le site El-Battah que pour celui de Sidi-Salem avec des valeurs respectives de $0,019 \pm 0,002$ et $0,036 \pm 0,003 \mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$. Les valeurs maximales ont été observées au mois de mars ($0,053 \pm 0,008$ à El-Battah et $0,086 \pm 0,019 \mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ à Sidi-Salem). La comparaison des moyennes entre les deux sites indique une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) du taux de GPx au mois de février, et une augmentation significative ($p < 0,05$) au mois de mars et avril. L'analyse de la variance à deux critères de classification (site, mois) révèle des effets mois et site hautement significatifs (Tableau III, Fig. 2).

Tableau II: Variation mensuelle du taux de glutathion peroxydase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$) au niveau du manteau de *D. trunculus* pêché dans deux sites du golfe d'Annaba : El-Battah et Sidi Salem de Février à Avril 2009 ($m \pm s$; $n = 4$).

Mois	Sidi Salem	El Battah	P
Février	$0,036 \pm 0,003$	$0,019 \pm 0,002$	0,000***
Mars	$0,086 \pm 0,019$	$0,053 \pm 0,008$	0,038 *
Avril	$0,076 \pm 0,016$	$0,041 \pm 0,007$	0,017*

Tableau III : Analyse de la variance à deux critères de classification (site, mois) de l'activité de la glutathion peroxydase dans le manteau de *D. trunculus* pêché dans deux sites du golfe d'Annaba: El-Battah et Sidi Salem de février à avril 2009.

Sources de la variance	DDL	SCE	CM	F obs	P
Site	1	0,0047	0,0047	35,86	0,000***
Mois	2	0,0075	0,0037	28,65	0,000***
Interaction : Site/Mois	2	0,00042	0,0021	1,60	0,22
Erreur résiduelle	18	0,0023	0,00013		
Totale	23	0,015			

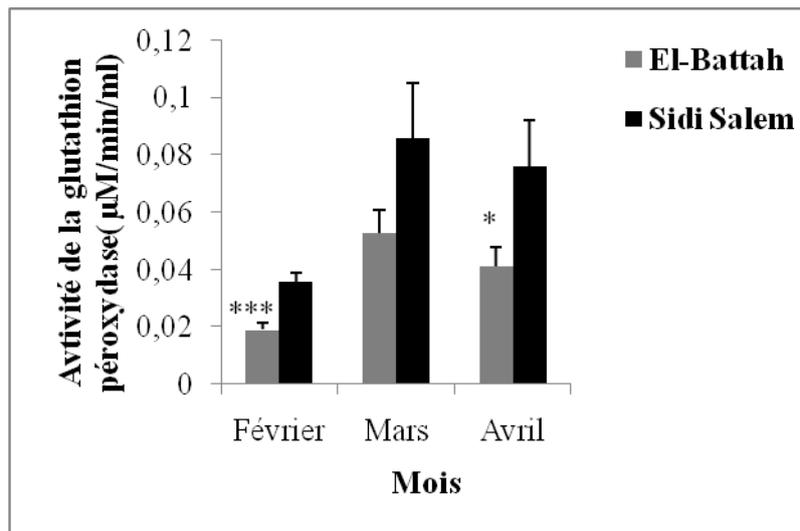


Figure 2: Variation mensuelle du taux de glutathion peroxydase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$) au niveau du manteau de *D. trunculus* pêché dans deux sites du golfe d'Annaba : El-Battah et Sidi Salem de Février à Avril 2009 ($m\pm s$; $n=4$).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Selon KENNISH (2002), la qualité de l'eau dans les régions d'estuaire est diminuée par suite des effluents anthropogéniques. L'analyse de la distribution des fréquences de tailles permet une estimation du taux de croissance chez *D. trunculus*; la méditerranée est caractérisée par un recrutement bimodal de ces populations. La taille maximale enregistrée des échantillons prélevés dans les deux stations est de 37 mm. L'activité de la GPx est également bien exprimée chez les invertébrés aquatiques tels que les crustacés, échinodermes, et les mollusques (GAMBLE *et al.*, 1995). Nos résultats montrent, une augmentation de l'activité de GPx à Sidi Salem pendant la période d'étude comparativement à El Battah. Cette différence observée entre les deux sites d'études peut être expliquée par une réduction des apports nutritifs durant la période estivale et par une pollution environnementale. La présence d'une grande quantité de coquilles vides dans le sédiment de la plage de Sidi Salem laisse supposer une mortalité massive de *D. trunculus* dans ce site exposé à différentes sources de pollution tels les éléments traces métalliques (BELDI, 2007). Une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes exposées à une variété de contaminants organiques et en métal avait été observée en réponse à améliorent l'effort oxydant, mais les réponses sont transitoires et variables selon les espèces, les enzymes, et les contaminants (COSSU *et al.*, 2000 ; LIVINGSTONE, 2001 ; VALAVANIDISA *et al.*, 2006).

BIBLIOGRAPHIE

- ABDENNOUR, C., SMITH, B.D., BOULAKOUD, M.S., SAMRAOUI, B., RAINBOW, P.S., 2000. Trace metals in shrimps and sediments from Algerian water. *J. Catalog. Mar. Env.* 3: 9-12.
- 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. Agric. Res.*, Vol 1(4) : 85-90.
- BELDI, H., 2007. Etude de *Gambusia affinis* (Poisson, Téléostéen) et *Donax trunculus* (Mollusque, Pélécy-pode) : écologie, physiologie et impacts de quelques altérage-nés. Thèse de doctorat d'état en Sciences Naturelles, mention Biologie Animale. Université d'Annaba, p. 105.
- BOUZERAA, N., ABBES, A., SOLTANI, N., 2004. Analyse des protéines chez trois espèces de bivalves vivants dans des milieux différents, la lagune d'El Mellah et le golfe d'Annaba. *Bulletin INSTM* 9: 97-100.
- BOYD, R.S., 2010. Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Chem. Ecol.* 36: 46-58.
- COSSU, C., DOYOTTE, A., BABUT, M., EXINGER, A., VASSEUR, P., 2000. Antioxidative biomarkers in freshwater bivalve *Unio tumidus* in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 45: 106- 121.

- DRAPER, H.H., HADLEY, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.*, 186: 241-431.
- FISHELSON, L., BRESIER, V., MANELISA, R., ZUK-RIMON, Z., DOTAN, A., HORNUNG, H., YAWETZ, A., 1999. Toxicological aspects associated with the ecology of *Donax trunculus* (Bivalvia, Mollusca) in a polluted environment. *Sci. Total Environ.*, 266: 121-131.
- GAMBLE, S.G., GOLDFARB, P.S., PORTE, C., LIVINGSTONE, D.R., 1995. Glutathione peroxidase and others antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*). *Mar. Environ. Res.* 39, 191-195.
- HAMDANI, A., SOLTANI-MAZOUNI, N., 2011. Changes in biochemical composition of the gonads of *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) from the Gulf of Annaba (Algeria) in relation to reproductive events and pollution. *Jordan Journal of Biological Sciences*, Volume 4, Number 3 (in press).
- KENNISH, M.J., 2002. Environmental threats and Environmental future of estuaries. *Environ. Conserv.* 29,78-107.
- LAGADIC, L., CAQUET, T., RAMADE, F., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology*, 3: 193-208.
- LAM, P.K.S., 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean and Coastal Management.* 52: 348-354.
- LAVADO, R., URENA, R., MARTIN-SKILTON, R., TORREBLANCA, A., DEL RAMO, J., RALDUA, D., PORTE, C., 2006. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environ. Pollut.*, 139 : 330-339.
- LAWRENCE, R.A., BURCK, F.B., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952-958.
- LIVINGSTONE, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 42: 656-666.
- MC CARTHY, F., SHUGART, L.R., 1990. *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, USA., 457pp.
- MOUKRIM, A., 2004. *Donax trunculus* as a sentinel species for environmental monitoring of sandy beaches on Moroccan coasts. *B Environ Contam Tox.*, 73 (4): 674-681.
- OUNISSI, M., 2007. Devenir et incidences des flux de matières continentales enrichissantes et polluantes dans le littoral d'Annaba. Bilan final du projet de recherche ONEDD/MATE/05/04 : 11p
- PORTE, C., 2006. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environ. Pollut.*, 139 : 330-339.
- ROMEO, M., SIDOUMOU, Z., GNASSIA-BARELLI, M., 2000. Heavy metals in various molluscs from the Mauritanian coast. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 65 : 269-276.
- SEMADI, A., DERUELLE, S., 1993. Lead pollution monitoring by transplanted lichens in Annaba area (Algeria). *Rev. Poll. Atmos.*, 35 : 86-102.
- 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.
- SOLTANI, N., AOUADENE, A., CHOUAHDA, S., 2005. Surveillance de la qualité des eaux du golfe d'Annaba (Algérie) par la mesure d'un biomarqueur du stress environnemental chez *Donax trunculus*. *INOC-Marine & Coastal Protected Areas*, 462-467.
- VAISSIERE, R., FREDJ, G., 1963. Contribution à l'étude de la faune benthique du plateau continental de l'Algérie. *Bull. Inst. Oceanogr. Monaco.* 60 : 83p.
- VALAVANIDIS, A., VLAHOGIANNI, T., DASSENAKIS, M., SCULLOS, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64: 178-189.
- VERLECAR, X. N., JENA, K. B., CHAINY, G. B., 2006. Modulation of antioxidant defences in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposures. *Chemosphere*, 71: 1977-1985.

Acute toxicity of cadmium on *Donax trunculus* acetylcholinesterase, glutathione S-transferase activities and pattern of recovery

Soumeya Belabel and Noureddine Soltani*

*Laboratory of Applied Animal Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University
Badji Mokhtar of Annaba, Annaba, Algeria
noureddine.soltani@univ-annaba.org

ABSTRACT

*Pollution by heavy metals is a serious problem due to their toxicity and ability to accumulate in the biota. The present study was undertaken to investigate the acute toxicity of cadmium, a heavy metal widely detected in the aquatic environment due to natural effects and anthropogenic activities. Thus, we evaluate the toxicity of this metal on acetylcholinesterase (AChE) and glutathione S-transferase (GST) activities in the marine bivalve *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia). Cadmium was added in the rearing water at a concentration corresponding to 96-h LC50 prealably determined. The activities of GST and AChE were determined in the mantle at different exposure times (0, 24, 48, 72 and 96 h). The results show a significant decrease ($p < 0.001$) in AChE activity and a significant increase ($p < 0.05$) in GST activity as compared with controls. In a second series of experiment, exposed animals were there after transferred to clean water up to 4 days to assess the recovery pattern. The data obtained suggested that *D. trunculus* was able to overcome relatively rapidly the stress induced by cadmium.*

INTRODUCTION

Pollution of aquatic environments by heavy metals is a world-wide problem due to the persistency and continuing accumulation of metals in the environment [1]. The occurrence of heavy metals in the environment mainly results from anthropogenic activities [2]. Trace metals are important persistent pollutants in aquatic ecosystems world-wide and are especially prevalent in freshwater, estuarine and coastal marine ecosystems exposed to high degrees of urban pressure [3,4,5]. The concentration of heavy metals in natural environment depends on both natural and anthropogenic factors, which may play an important physiological role, but, also may impose a toxic effect on biosensors [6]. Moreover, heavy metals can bioconcentrate and bioaccumulate in the food chain and contribute to chronic toxicity [7]. Consequently, evaluating the ecological and ecotoxicological risks linked to trace metal contamination is becoming a major issue [8]. Such heavy metal like cadmium (Cd), is a non essential element to living organisms in nature, which can cause highly toxicity [9]. Most of the cadmium in the marine environment is estimated to come from anthropogenic sources, mainly as industrial effluent [10]. Marine invertebrates represent an integrant part of aquatic ecosystem and for this reason they are essential keys to evaluate its health [11], they can bioaccumulate, biomagnificate or biotransfer certain metals to concentrations high enough to bring about harmful effects [12, 13]. The suspension-feeder bivalve *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) is largely distributed in West-African, European and Mediterranean coasts and has been previously used as a sentinel species in environmental assessment [14, 15, 16, 17]. [18,19]. This species was found in higher densities in the sand beaches of the Annaba gulf in Algeria [20]. Growth and population dynamics [21] and the reproductive cycle of *D. trunculus* in Annaba gulf have been examined [22]. Their habitats are exposed to several

pollutants from different sources [23]. Biomarkers are now generally accepted as useful tools in monitoring programs for the assessment of the impact on marine organisms and ecological health of pollutants and anthropogenic activities [24, 25, 26]. Indeed, these organisms are protected against oxidative stress by several defense mechanisms with antioxidant enzymes such as glutathione S-transferase, a family of enzymes with a key role in the general biotransformation of xenobiotics and endogenous substances [27]. Acetylcholinesterase activity is considered as an exposure biomarker to organophosphate and carbamate pesticides [28], and also to other contaminants such as metals, synthetic detergents, some components of fuel oils and algal toxins [29,30,31,32]. The present study was undertaken in order to estimate the 96-h LC50 value of cadmium, a heavy metal widely detected in the aquatic environment, and to investigate its acute toxicity on AChE and GST activities, and to study the recovery pattern in an edible species used as a sentinel organism *D. trunculus*.

MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals and experimental conditions

Donax trunculus (Linnaeus, 1758) were collected from El-Battah beach (36° 50'N- 8° 50'E).

The sandy beach of El-Battah was chosen as a relatively clean site, located approximately 30 kilometers to the East of Annaba city (Algeria), far from any source of pollution. After collection, bivalves (27.48 ± 2.28 mm) were transported to the laboratory and acclimatized during 48 h before exposure in 50-liter glass aquaria. Exposed and control bivalves were reared in aquaria containing seawater (temperature: 17.68 ± 0.14 °C, salinity: 34.0 ± 2.25 g/L, pH: 8.28 ± 0.27 , dissolved oxygen: 3.05 ± 0.06 mg/L) and sand which come from El-Battah site and 100 individuals in each aquarium.

2.2. Chemical and toxicity test

The concentrations of cadmium used in this study were 5, 7.6 and 10 mg/L. Three replications of 100 individuals per dose, were used. The duration of experiment was 96 h. The mortality percentages in the different treatments were corrected in accordance [33] and analysed by probit analysis [34]. The LD50 and LD90 values (i.e., the dose causing mortality/effects in 50 and 90% of the treated animals, respectively) together with corresponding 95% confidence limits (95% CL) were calculated [35].

2.3. Enzyme assays

D. trunculus were exposed to LC50 concentration for 96 h of cadmium determined previously. Bivalves that survived after 96 h of exposure were transferred into a medium not contaminated (considered as day 0) up to 4 days to study the recovery pattern of environmental biomarkers. In each experiment, untreated bivalves were also used as controls. At appropriate time, animals were sampled from control and treated series during the exposure (96 h) and recovery (4 days) periods. Each mantle was dissected and stored until biomarker analysis. The AChE activity was estimated accordingly to [36], using acetylthiocholine as a substrate. The activity rate was measured as change in optical density (OD/min) at 412 nm. GST activity was determined using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate according to [37]. The activity rate was measured as change in optical density (OD/min) at 340 nm. The final activity of AChE and GST was expressed as $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein. Protein content was quantified by the Coomassie Blue method [38], using Bovine Serum Albumin (BSA) as standard.

2.4. Statistical analysis

Results are presented as means \pm standard deviation (SD). Data from bioassays subjected to analysis of variance after angular transformation of corrected mortality percentages. When the analysis of variance was significant ($p < 0.05$), mean values obtained were separated by Least Significant Difference test (LSD). Differences between control and exposure groups were determined by Tukey's test. In the other experiments, the comparison of mean values was made by Student's t-test. A significant difference was assumed when $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using MINITAB Software (Version 15, Penn State College, PA, USA).

RESULTS

3.1. Toxicity tests

Figure 1 shows the relation between the cadmium concentration and the mortality rate of *Donax trunculus*.

Percentage of mortality at 96 h was 75% in 5mg/L and 83% in 7.6 mg/L of Cd. *D. trunculus* had 92% mortality in 10 mg/L. The results obtained from acute statistical toxicity experiments of cadmium upon *D. trunculus* were evaluated by using Finney's Probit Analysis. The lethal concentrations estimated after a 96-h exposure together with their corresponding 95% confidence limits were: LC50= 2.59 mg/L (2.25 - 2.97) and LC90= 9.25 mg/L (8.04 - 10.63).

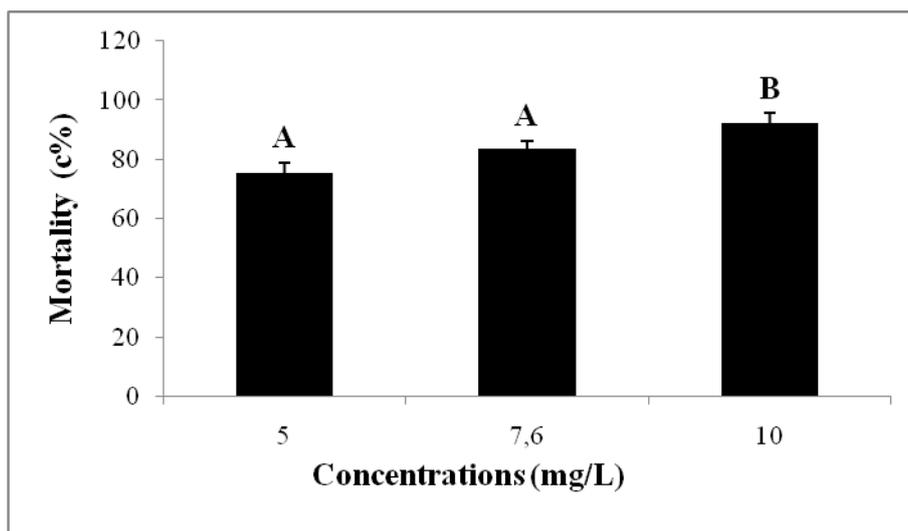


Fig 1. Acute toxicity of cadmium on *D. trunculus*: mortality (%) recorded after a 96-h exposure as function the concentration (means \pm SD; values affected with a different letter are significantly different at $p < 0.05$).

3.2. Change in glutathione S-transferase activity

The acute studies comprised of daily exposure to the metal at 2.59 mg/L for 96 h followed by a recovery studies up to 4 days. The results relating to the effect of cadmium on the GST activity are presented in figure 2. The exposed bivalves exhibited significant induction in GST activity. The increase in GST activity is significant ($p < 0.05$) at 24, 48 h, 72 h ($p < 0.01$) and at 96 h ($p < 0.001$) of exposure. The values recorded increased until 96 h of exposure to reach a maximum of 4.67 ± 1.00 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ proteins. These results were confirmed by ANOVA two-way, a significant ($p < 0.001$) time ($F = 7.13$ $\text{df} = 4, 33$) and treatment ($F = 43.78$, $\text{df} = 1, 33$) effects, and a significant ($p < 0.01$) time-treatment interaction ($F = 4.08$, $\text{df} = 4, 33$) were observed. The Tukey's test revealed that there was a significant difference in GST activity between controls and Cd-treated series.

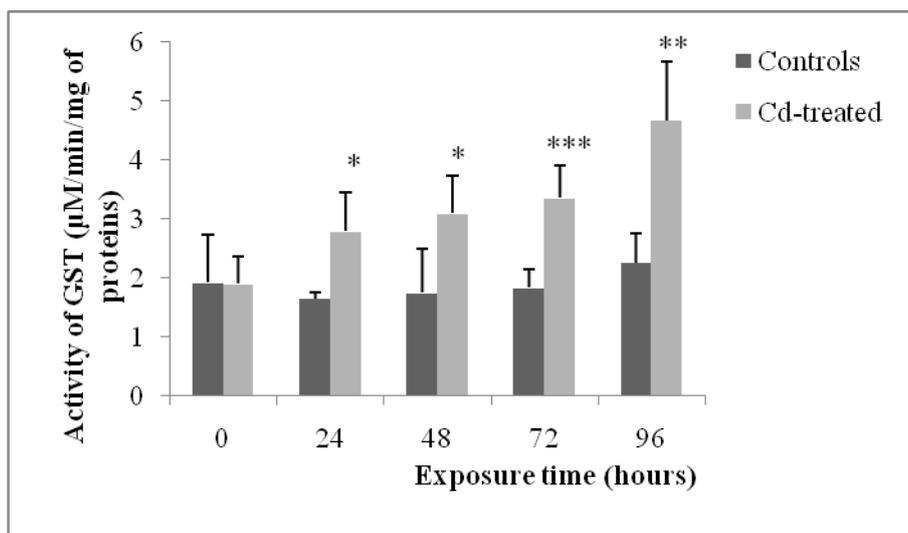


Fig 2. Activity of GST ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ of proteins) on *D. trunculus* exposed to cadmium at LC50 (m \pm SD; n=4-5) (*: significant difference at $p < 0.05$; **: significant difference at $p < 0.01$; ***: significant difference at $p < 0.001$).

3.3. Change in acetylcholinesterase activity

After a 24h exposure to Cd, data show that the rate of AChE activity decreased significantly in dose dependent manner in treated bivalves compared with the control (Fig 3). Variance analysis showed that the inhibition of AChE activity was

very highly significant ($p < 0.001$) at the end of exposure to achieve a minimum of $10.19 \pm 1.17 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ proteins. Two way ANOVA revealed a significant ($p < 0.001$) effects of treatment ($F = 60.87$, $df = 1, 40$) and exposure time ($p < 0.01$) ($F = 4.61$, $df = 4, 40$), and a significant ($p < 0.001$) time - treatment interaction ($F = 7.02$, $df = 4, 40$). The Tukey's test revealed that there was a significant difference in GST activity between controls and Cd-treated series.

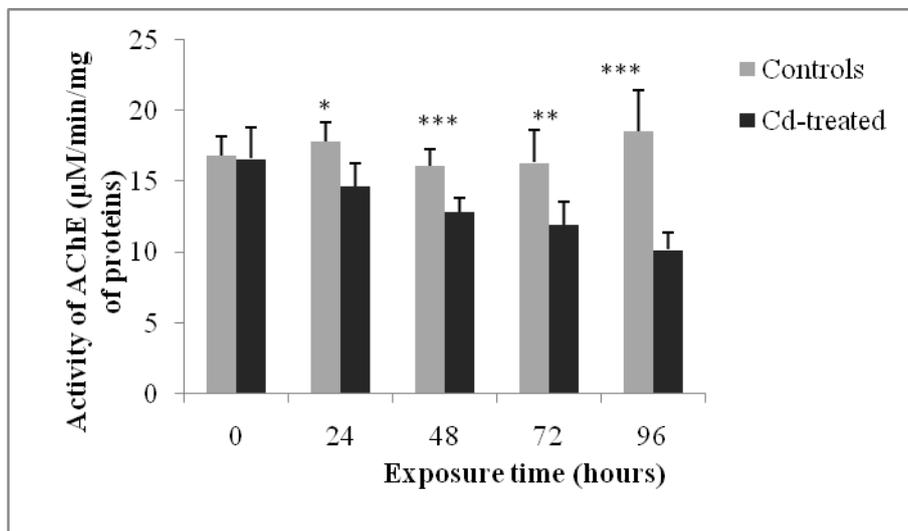


Fig 3. Activity of AChE ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ of proteins) on *D. trunculus* exposed to cadmium at LC50 ($m \pm SD$; $n=4-5$). (*: significant difference at $p < 0.05$; **: significant difference at $p < 0.01$; ***: significant difference at $p < 0.001$).

3.4. Recovery study

Bivalves were exposed to LC50 of cadmium for 96 h (day 0) then transferred to clean water, when AChE and GST activities were measured at different intervals of day 0, 2 and day 4 (Figs 4 & 5). At day 2, the exposed bivalves exhibited significant decrease in GST activity. In contrast, there was a very significant difference ($p < 0.01$) in GST amounts between Cd-treated series and controls at day 0 and 2, which was gradually restored to the control levels by day 4 (Fig 4). AChE activity remained relatively lower compared to control during the recovery period, followed by a significant decrease ($p < 0.05$) at day 2 (Fig 5). On the other hand, at the end of depuration period (4 days) there was no significant ($p > 0.05$) difference between control and treated series, which indicates that the mollusc bivalve *D. trunculus* have the ability to overcome the stress of toxicant.

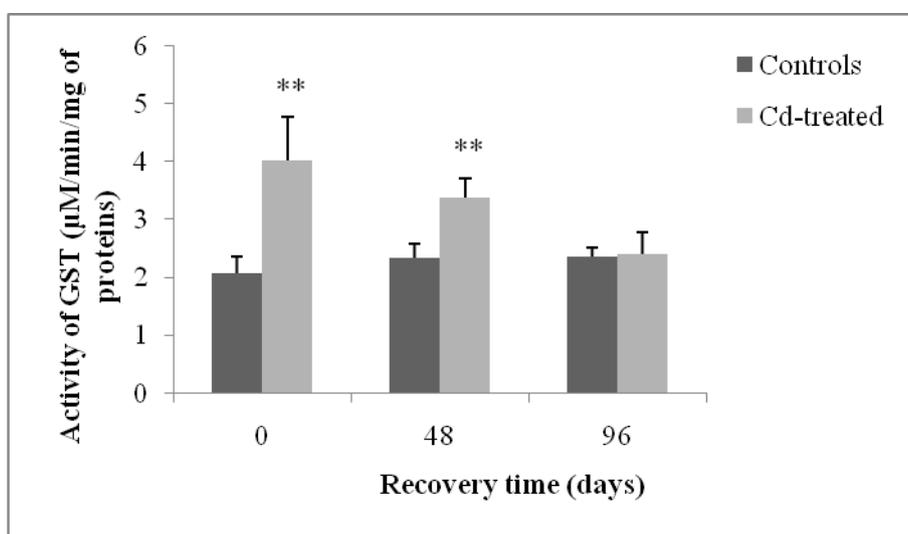


Fig 4. Activity of GST ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ of proteins) on *D. trunculus* exposed to cadmium at LC50 for 96 h and its recovery response ($m \pm SD$; $n=4-5$). (*: significant difference at $p < 0.05$; **: significant difference at $p < 0.01$; ***: significant difference at $p < 0.001$).

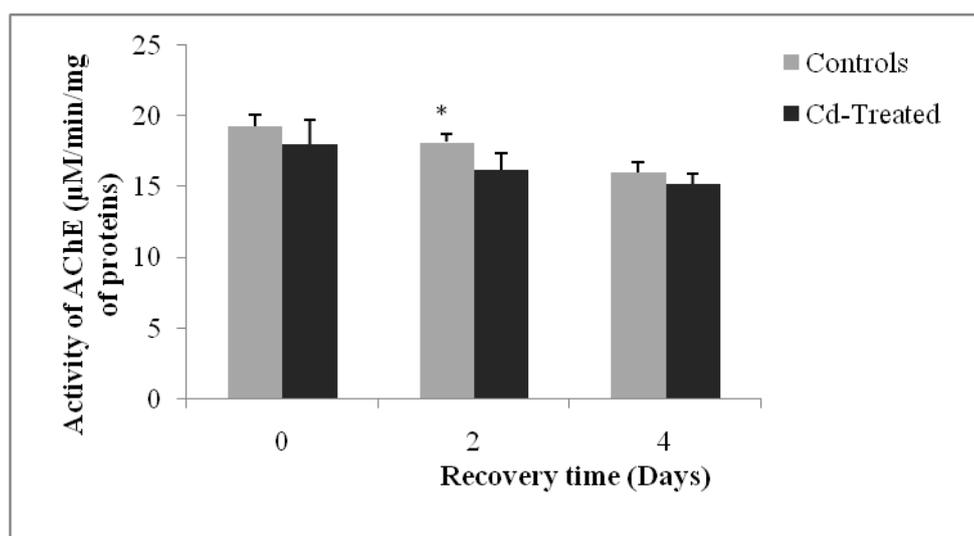


Fig 5. Activity of AChE ($\mu\text{M}/\text{mn}/\text{mg}$ of proteins) on *D. trunculus* exposed to cadmium at LC50 for 96 h and its recovery response ($m \pm \text{SD}$; $n=4-5$). (*: significant difference at $p < 0.05$; **: significant difference at $p < 0.01$; ***: significant difference at $p < 0.001$).

DISCUSSION

Antioxidant defense system, which is generally ubiquitous in animal species and different tissues types, is found widely in aquatic organisms. When subjected to metal contamination, bivalves are subjected to oxidative damage, increasing the cellular concentration of Reactive Oxygen Species (ROS). Under elevated metal levels, they are also able to activate their antioxidant systems in order to eliminate ROS, inducing the activity of antioxidant enzymes [39]. The present investigation presents the effect of Cd exposure to bivalve *D. trunculus*, we tested the responses of biochemical biomarkers such as GST activities, an enzyme of the phase II of biotransformation process, and the activity of AChE, an important enzyme in the maintenance of normal nerve function [40]. Induction of GST activity has been used as a biomarker of exposure to xenobiotics, that catalyze the conjugation of variety of electrophilic substrate to the thiol group of GSH, producing less toxic forms [41]. Numerous studies reported raised GST activities in diverse aquatic species in response to environmental or laboratory exposure to xenobiotics [42, 43]. However, the activity of antioxidant enzymes such as CAT, SOD, and GST, can vary depending on the intensity and duration of the chemical stress applied to the organism in addition to the susceptibility of the exposed species [44]. In the present work, GST activity of *D. trunculus* was increased in a time-dependent manner at all of the exposed concentrations of Cd, indicating that Cd stress can induce the ROS generation and interfere with the antioxidant enzymatic defense system in bivalves [45]. Additionally, some studies suggested that the oxidative stress induced by the heavy metals results in an increase in ROS, stimulating an increase in antioxidant enzyme activity [46]. It has been shown that antioxidant defense systems protect cells from Cd-induced toxicity [47]. GST plays a critical role in mitigating oxidative stress in all life forms [48, 49], and GST activity also has been widely used as a biomarker to detect stress [50, 51]. As an antioxidant enzyme, GST activities had either a significant increase or decrease with different patterns according to the exposed elements or exposure conditions [39]. In fact, GST activity of *D. trunculus* increased upon Cd exposure, coinciding with our study. Similar results were obtained in previous investigations of polychaetes *Nereis diversicolor* [39] and *Laonereis acuta* [52] exposed to Cd. The induction of GST activities was also reported in several fish species: *G. affinis* treated with cadmium [53], with halofenozide [54] or with diflubenuron and flucycloxuron [55], in *Oreochromis niloticus* exposed to diazinon [56] and in *O. mossambicus* exposed to monocrotophos [57] indicating ongoing detoxification mechanisms. [58] showed that with Cd contamination *Ruditapes philippinarum* increased the activity of GST. On the other hand, a decrease in the GST activity was reported in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to benzo[a]pyrene [59, 60]. It was also shown that the population of *D. trunculus* inhabiting in a polluted site had a lower activity of GST than that living in an unpolluted site [61]. GST is the most sensitive biomarker and its activity has been shown to increase in the whole organism or particular organs (gills, digestive gland) as a function of the xenobiotic concentration [62].

Acetylcholinesterase (AChE) activity is considered of great interest in evaluating the effects of exposure to neurotoxic compounds in aquatic animals [63]. It is an enzyme involved in the synaptic transmission of nerve impulses and is inhibited by neurotoxic compounds [64]. However, the responsiveness of AChE to other chemicals including metals has

also been reported [65, 66]. Several studies showed the potential use of this enzyme activity as a useful biomarker for detecting general physiological stress in aquatic organisms caused by exposure to contaminants [67]. The results of present study showed important inhibition of AChE activity after the exposure of *D. trunculus* to cadmium compared to controls. The significant responses indicated that the AChE activity decreased as function the exposure time to reach a minimum until the end of treatment (96h). This inhibition may be the result of a neurotoxic effect due to cadmium toxicity. Moreover, a correlation was reported between heavy metal pollution and decreases in AChE activity in *D. trunculus* from industrialised areas and harbour sectors in the gulf of Annaba [68, 23, 69, 19, 70]. Similar observations have been reported in Silver Catfish *Rhamdia quelen* exposed to Cadmium [71], in *G. affinis* exposed to FCX [72] and to chlorpyrifos [73]. [74] found significant reduction in AChE activity of *M. galloprovincialis* exposed to copper, and in the blue mussel *M. edulis* exposed to azamethiphos [75], as well as in the zebra mussels *Dreissena polymorpha* exposed to chlorpyrifos and terbutylazine [76]. The inhibition of AChE by different metals and PHC indicated that lead, cadmium and copper are the most predominant inhibitor [77]. Moreover, AChE activity is extremely variable between species [28].

When *D. trunculus* were removed from cadmium exposure and transferred to clean water, recovered rapidly AChE and GST activities after 4 days. In the recovery period, GST and AChE levels of mollusc exposed to cadmium for 4 days were similar to the control value. This metal induced an oxidative stress [78]. Subsequently, this rapidly stimulated the antioxidant defences as evidenced by changes in biomarkers measured during the treatment and the recovery period. However, these enzymes reacted during this period, GST decreased its activity, possibly indicating a compensatory response against the toxic. In contrast, AChE increased during the recovery period, indicating metal toxicity. Increased GST activity in *Rhamdia quelen* after cadmium exposure was observed and the recovery period of 7 days are needed [71]. GST activity in *G. affinis* exposed to DFB and FCX required periods of 1 and 2 days respectively of recovery [72]. The activity of GST showed in both species *Ruditapes decussates* and *Ruditapes philippinarum*, a decrease from environment condition to 7 days of depuration [79]. In *Rhamdia quelen* exposed to cadmium, a period of 14 days was necessary to recover AChE activity [71] while *G. affinis* exposed to FCX, recovered AChE activity after 4 and 8 days in cleanwater according to concentration [72]. The recovery was influenced by time of exposure and type of toxic used.

In conclusion, our results indicate that the mollusk bivalve *D. trunculus* can be used as a bioindicator for acute exposure to cadmium. This metal stimulated rapidly the antioxidant system as evidenced by an increase in GST activities. The decreases in AChE activity also suggested a neurotoxic action of Cd. The recovery pattern showed that *D. trunculus* have the ability to overcome rapidly the stress induced by treatment.

Acknowledgements

We would like to thank two anonymous referees for useful discussions and critical reading of the manuscript. This study was financed by the Algerian Fund for Scientific Research and by the Ministry of High Education and Scientific Research of Algeria (CNEPRU and PNR projects to Pr. N. Soltani).

REFERENCES

- [1] Dutta HM, Dalal R, *Int J Environ Res*, **2008**, 2, 215.
- [2] Zhipeng H, Jinming S, Naixing Z, Peng Z, Yayan X, *Environ Monit Assess*, **2009**, 157, 515.
- [3] Lau S, Mohammed M, Tan Chi Yen A, Su'ut S, *Sci Total Environ*, **1998**, 214, 113.
- [4] De Mora S, Fowler SW, Wyse E, Azemard S, *Mar Pollut Bull*, **2004**, 49, 410.
- [5] Hyun S, Lee T, Lee CH, Park YH, *Mar Pollut Bull*, **2006**, 52, 113.
- [6] Arkadiusz N, Jacek K, Agnieszka T, Sylwia M, *Ecological chemistry and Engineering*, **2007**, 14(1), 77.
- [7] Ahmad MK, Islam S, Rahman S, Haque MR, Islam MM, *Int J Environ Res*, **2010**, 4(2), 321.
- [8] Vellinger C, Parant M, Rousselle P, Usseglio-Polatera P, *Ecotoxicology*, **2012**, doi: 10.1007/s10646-012-0916-1.
- [9] Zhu B, Gao KS, Wang KJ, Ke CH, Huang HQ, *Chemosphere*, **2012**, 87, 397.
- [10] Vetillard A, Bailhache T, *Biol Reprod*, **2004**, 72, 119.
- [11] Rickwood CJ, Galloway TS, *Aqua Toxicol*, **2004**, 67, 45.
- [12] Naimo TJ, *Ecotoxicology*, **1995**, 4, 341.
- [13] Opuene K, Okafor EC, Agbozu E, *Int J Environ Res*, **2008**, 2(3), 285.
- [14] Roméo M, Gnassia-Barelli M, *Mar Biol*, **1988**, 99, 223.
- [15] Fishelson L, Bressler V, Manelis R, Zuk-Rimon Z, Dotan A, Yawetz A, *Sci Total Environ*, **1999**, 226, 121.

- [16] Moukrim A, El Hamidi F, Lagbouri A, Kaaya A, Zekhnini A, Bouhaimi A, Narbonne JF, *Bull Environ Contam Toxicol*, **2004**, 73, 674.
- [17] Neuberger-Cywiak L, Achituv Y, Garcia EM, *Bull Environ Contam Toxicol*, **2007**, 79, 622.
- [18] Soltani N, Aouadene A, Chouahda S, *INOC-Marine & Coastal Protected Areas*, **2005**, 462-467.
- [19] Sifi K, Chouahda S, Soltani N, *Mésogée*, **2007**, 63, 11.
- [20] Vaissière R, Fredj G, *Bull Inst Océanogr Monaco*, **1963**, 60, p83.
- [21] Beldi H, Thèse de doctorat d'état en Sciences Naturelles, mention Biologie Animale. Université d'Annaba, **2004**, p105.
- [22] Hamdani A, Soltani-Mazouni N, *Jordan Journal of Biological Sciences*, **2011**, 4 (3), 149.
- [23] Abdennour C, Khelili K, Boulakoud MS, Rainbow PS, *Hydrobiologia*, **2004**, 432, 217.
- [24] Wang ME, Zhou QX, *Ecotoxicol Environ Saf*, **2006**, 64, 190.
- [25] Zhou QX, *Chin J Meteorol Environ*, **2006**, 22, 38.
- [26] Lam PKS, *Ocean and Coastal Management*, **2009**, 52, 348.
- [27] Hyne RV, Maher WA, *Ecotoxicol Environ Saf*, **2003**, 54, 366.
- [28] Bocquéné G, Galgani F, Truquet P, *Mar Environ Res*, **1990**, 30, 75.
- [29] Payne JF, Mathieu A, Melvin W, Fancey LL, *Mar Pollut Bull*, **1996**, 23, 225.
- [30] Guilhermino L, Barros L, Silva MC, Soares AMVM, *Biomarkers*, **1998**, 3, 157.
- [31] Lehtonen KK, Kankaanpa H, Leiniö S, Sipilä VO, Pflugmacher S, Sandberg-Kilpi E, *Aquat Toxicol*, **2003**, 64, 461.
- [32] Tim-Tim ALS, Morgado F, Moreira S, Rangel R, Nogueira AJA, Soares AMVM, Guilhermino L, *Chemosphere*, **2009**, 77, 1465.
- [33] Abbott WB, *Journal of Economic Entomology*, **1925**, 18, 265.
- [34] Finney DJ, *Probit analysis* (3rd edn) Cambridge University Press, **1971**, London.
- [35] Swaroop S, Gilroy AB, Uemura K, *World Health Organisation, Geneva*, **1966**, 51, 1.
- [36] Ellman GL, Courtney DK, Andres V, Featherstone RM, *Biochem Pharmacol*, **1961**, 7, 88.
- [37] Habig WH, Pabst MJ, Jacobi WB, *J Biol Chem*, **1974**, 249, 7130.
- [38] Bradford MM, *Anal Biochem*, **1976**, 72, 248.
- [39] Won EJ, Kim RO, Rhee JS, Park GS, Lee J, Shin KH, Lee YM, Lee JS, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **2011**, Part C 154, 82.
- [40] Olsen T, Ellerbeck L, Fisher T, Callaghan A, Crane M, *Environ Toxicol Chem*, **2001**, 20, 1725.
- [41] Hayes JD, Pulford D, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **1995**, 30, 445.
- [42] Hoarau P, Gnassia-Barelli M, Roméo M, Girard JP, *Environ Toxicol Chem*, **2001**, 20, 523.
- [43] Camargo MMP, Martinez CBR, *Environ Toxicol Pharmacol*, **2006**, 21, 61.
- [44] Ballesteros ML, Wunderlin DA, Bistoni MA, *Ecotoxicol Environ Saf*, **2009**, 72, 199.
- [45] Fang Y, Yang H, Wang T, Liu B, Zhao H, Chen M, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **2010**, 151, 325.
- [46] Bagnyukova TV, Chahrak OI, Lushchak VI, *Aquatic Toxicology*, **2006**, 78, 325.
- [47] Ognjanovic´ B, Markovic´ SD, Pavlovic´ SZ, Z´ikic´ RV, Štajn A, Saic´ic´ ZS, *Toxicol Pharmacol*, **2006**, 22, 219.
- [48] Regoli F, Principato GB, Bertoli E, Nigro M, Orlando E, *Polar Biol*, **1997**, 17, 251.
- [49] Lee KW, Raisuddin S, Rhee JS, Hwang DS, Yu IT, Lee YM, Park HG, Lee JS, *Aquat Toxicol*, **2008**, 89, 158.
- [50] Shailaja MS, D'Silva C, *Chemosphere*, **2003**, 53, 835.
- [51] Cunha I, Mangas-Ramirez E, Guilhermino L, *Comp Biochem Physiol C*, **2007**, 145, 648.
- [52] Sandrini JZ, Ventura Lima J, Regoli F, Fattorini D, Nottic A, Marinsa LF, Monserrat JM, *Ecotoxicol Environ Saf*, **2008**, 70, 115.
- [53] Souissi M, Wali K, Hadj-Moussa W, Rouachdia R, Djabourabi A, Bensouilah M, *Environmental Research Journal*, **2008**, 2 (4), 177.
- [54] Chouahda S, Soltani N, *Science & Technologie C*, **2009**, 29, 9.
- [55] Zaidi N, Soltani N, *Biological Control*, **2011**, 59, 106.
- [56] Uner N, Sevgiler Y, Durmaz H, Piner P, *Toxicol Mech Methods*, **2007**, 17, 317.
- [57] Rao JV, *Chemosphere*, **2006**, 65, 1814.
- [58] Wang L, Pan L, Liu N, Liu D, Xu C, Miao J, *Food and Chemical Toxicology*, **2011**, 49, 3407.
- [59] Akcha F, Izuel C, Venier P, Budzinski H, Burgeot T, Narbonne JF, *Aquat Toxicol*, **2000**, 49, 269.
- [60] Hoarau P, Damiens G, Roméo M, Gnassia-Barelli M, Bebianno MJ, *Comp Biochem Physiol Part C*, **2006**, 143, 196.
- [61] Tlili S, Métais I, Boussetta H, Mouneyrac C, *Chemosphere*, **2012**, 81, 692.
- [62] Moreira SM, Guilhermino L, *Environmental Monitoring and Assessment*, **2005**, 105, 309.
- [63] Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A, *Science of the Total Environment*, **2000**, 247, 295.

-
- [64] Bocquene G, Galgani F, *Proceedings of the ICES techniques in marine environmental sciences*, **1998**, 22, p 12.
- [65] Amiard JC, Geffard A, Amiard-Triquet C, *Journal de Recherche Océanographique*, **1998**, 23, 25.
- [66] Leiniö S, Lehtonen KK, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **2005**, 140, 408.
- [67] Rank J, Lehtonen KK, Strand J, Laursen M, *Aquat Toxicol*, **2007**, 84, 50.
- [68] Abbes A, Chouahda S, Soltani N, *Bulletin de l'INSTM*, **2003**, 8, 123.
- [69] Beldi H, Gimbert F, Maas S, Scheifler R, Soltani N, *Afric J Agric Res*, **2006**, 1(4), 85.
- [70] Amira A, Sifi K, Soltani N, *European Journal of Experimental Biology*, **2011**, 1 (2), 7.
- [71] Pretto A, Loro VL, Morsch VM, Moraes BS, Menezes C, Clasen B, Hoehne L, Dressler V, *Arch Environ Contam Toxicol*, **2010**, 58, 1008.
- [72] Zaidi N, Soltani N, *Annals of Biological Research*, **2010**, 1(4), 210.
- [73] Venkateswara Rao J, Begum G, Pallela R, Usman PK, Nagaswara Rao R, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **2005**, 2 (3), 478.
- [74] Regoli F, Principato G, *Aquatic Toxicology*, **1995**, 31, 143.
- [75] Canty MN, Hagger JA, Moore RTB, Cooper L, Galloway TS, *Mar Pollut Bull*, **2007**, 54, 396.
- [76] Benelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A, *Chem*, **2006**, 62, 510.
- [77] Gaitonde D, Sarkar A, Kaisary S, Silva CD, Dias C, Rao DP, Ray D, Nagarajan R, De Sousa SN, Subhdeep Sarker, Patill D, *Ecotoxicology*, **2006**, 15, 353.
- [78] Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Dwivedi S, Shukla MK, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **2008**, 23, 294.
- [79] Freitas R, Ramos Pinto L, Sampaio M, Costa A, Silva M, Rodrigues AM, Quintino V, Figueira E, *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **2012**, 1. (In press).