



HAL
open science

**Etude écotoxicologique et phylogéographique de la
coque *Cerastoderma glaucum* issue du Golfe de Gabès :
réponse adaptative (in situ et in vivo) au stress
métallique et structure génétique**

Sahar Karray

► **To cite this version:**

Sahar Karray. Etude écotoxicologique et phylogéographique de la coque *Cerastoderma glaucum* issue du Golfe de Gabès : réponse adaptative (in situ et in vivo) au stress métallique et structure génétique. Ecotoxicologie. Le Mans Université; Université de Sfax (Tunisie), 2015. Français. NNT : 2015LEMA1007. tel-01260002

HAL Id: tel-01260002

<https://theses.hal.science/tel-01260002>

Submitted on 21 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat

Sahar KARRAY

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université du Maine
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans
et de la faculté des Sciences de Sfax
sous le label de L'Université de Sfax*

Écoles doctorales : VENAM et École doctorale de Sfax

Discipline : Sciences Biologiques

Unités de recherche : Unité de recherche de Toxicologie marine et environnementale
(ES11ES90), Sfax, Tunisie
Laboratoire Mer, Molécules, Santé (EA 2160), Le Mans, France.
UMR BOREA « Biologie des Organismes et Écosystèmes Aquatiques », Muséum National
d'Histoire Naturelle, Station de Biologie Marine de Concarneau, France.

*Etude écotoxicologique et phylogéographique
de la coque *Cerastoderma glaucum* issue du
golfe de Gabès. Réponse adaptative (in situ et
in vivo) au stress métallique et structure
génétique.*

Soutenue à Sfax le 7 mai 2015

Président	Mme Faiza FAKHFAKH , Professeur, Université de Sfax, Tunisie
Rapporteur	Mr Pascal FAVREL , Professeur, Université de Caen, France
Rapporteur	Mr Lassad NEIFAR , Professeur, Université de Sfax, Tunisie
Co-encadrant	Mme Françoise DENIS , MCU, Muséum National d'histoire naturelle, France
Directeur de Thèse	Mme Amel HAMZA-CHAFFAI , Professeur, Université de Sfax, Tunisie
Co-directeur de Thèse	Mr Benoît CHENAIS , Professeur, Université du Maine, France
Invité	Mme Justine MARCHAND , MCU, Université du Maine, France

Dédicaces

Je ne remercierais jamais assez ceux par qui tout est devenu possible, mes parents, ma principale source de motivation. Merci pour votre soutien et vos encouragements qui m'ont permis d'arriver où j'en suis aujourd'hui.

Que dieu vous préserve et vous accorde santé et bonheur. Avec toute mon estime et tout mon amour, je vous dédie ce mémoire, il est le fruit de vos encouragements....

Un grand merci à mon cher mari, ses encouragements, ses sacrifices et sa compréhension m'ont été précieux pour accomplir ce travail.

Merci à ma chère fille Yasmine qui a supporté mon absence depuis sa naissance. Qu'elle trouve l'expression de mon attachement et mon profond amour.

Merci à ma chère sœur Salima, mon cher frère Housseem, mon beau frère Hichem, ma belle sœur Salma, et sans oublier mes chers neveux Youssef et Zainab.

Un grand merci s'adresse également à mes beaux parents, mes beaux frères, leurs femmes et leurs enfants.

Je ne trouve pas de mots pour définir ce que je ressens pour vous tous si ce n'est que je suis très heureuse lorsqu'on est ensemble.....

*Avec tout mon amour
SAHAR*

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université de Sfax-Tunisie et l'Université du Maine-France, au sein de l'unité de recherche Écotoxicologie Marine et Environnementale (UR0903), Sfax, Tunisie et le Laboratoire Mer, Molécules, Santé (EA 2160), Le Mans, France.

Ce travail s'inscrit dans le cadre du programme Européen GENERA « FP7 PEOPLE-IRSES GENERA » (utilisation des outils de génomique et de protéomique pour le développement de biomarqueurs spécifiques des contaminants pour l'évaluation des risques environnementaux des écosystèmes aquatiques). J'ai eu la grande chance de travailler sur ce projet et ainsi de collaborer au cours de ma thèse, avec des personnalités formidables, tant du point de vue de leur rigueur scientifique que de leurs qualités humaines. Je tiens donc à remercier la directrice du projet Miriam HAMPEL ainsi que tous les collaborateurs....

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr HAMZA-CHAFFAI Amel qui a assuré la direction de ce travail de thèse. Merci pour sa confiance, sa patience, sa disponibilité, son encadrement scientifique et sa motivation communicative tout au long de ce parcours.

Je tiens également à remercier le Pr. Benoît CHENAIS pour avoir co-dirigé ce travail en particulier pour m'avoir dirigé tout au long de ce travail. Egalement pour tous les échanges scientifiques que l'on a pu avoir.

Je remercie également l'ensemble des membres du jury pour avoir pris le temps de lire et juger mon travail, malgré leurs emplois du temps chargés. Merci tout d'abord à Mme Faiza FAKHFAKH qui me fait l'honneur de présider le jury de ma thèse. Je remercie également Mr Pascal FAVREL et Mr Lassad NEIFAR d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et d'avoir consenti à venir évaluer cette thèse.

J'adresse un grand merci à mes co- directrices de thèse Françoise DENIS et Justine MARCHAND. Merci d'avoir accepté de m'encadrer et de me diriger pendant toutes ces années.

Françoise ...Merci, de m'avoir fait partager ton expérience et de m'avoir guidée tout le long. Merci d'avoir toujours fait tout ton possible pour m'aider sur tous les plans que ce soit professionnels ou humains. Merci pour ton soutien et tes conseils depuis le début jusqu'à la fin. Tu m'as accompagnée dans les moments les plus importants de ma vie professionnelle.

Justine ...Merci de m'avoir aidée dans mes débuts en biomol en particulier dans l'art de manipuler ce petit instrument bien utile qu'est la pipette électronique!!! Pour la confiance que tu m'as accordée pour mener ce projet à distance, merci pour tes remarques constructives et les corrections que tu as apportées, aux articles.

Je remercie également le Pr Alain GEFARD de m'avoir accueilli dans son laboratoire de Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques (UMR-I 02) de l'Université de Reims Champagne Ardenne, afin de réaliser les analyses d'éléments traces

métalliques en spectrométrie de flamme et électrothermique. Un grand merci également à Laurence DELAHAUT qui m'a aidée et accompagnée lors de ces différentes analyses.

Je remercie aussi le Pr Emmanuel GUILLON pour m'avoir permis de réaliser les analyses de dosage des métaux en ICP dans l'institut de chimie moléculaire (ICMR) de l'Université de Reims Champagne Ardenne.

Je souhaite remercier aussi le Pr Tarek REBAI directeur du laboratoire d'histologie à la faculté de médecine de Sfax pour m'avoir permis de réaliser la partie histologique dans son laboratoire.

Un énorme merci au Pr Pascal SOURDAINE et au Dr Kristell KELNER pour m'avoir permis de réaliser les photos d'histologie ainsi que les techniques d'analyses d'images au sein de leur laboratoire de biologie de mollusques marins à l'Université de Caen Basse-Normandie.

Je remercie très chaleureusement Emmanuelle TASTARD pour le traitement statistique des données et l'aide qu'elle a apporté à la rédaction des articles.

Un remerciement particulier à Brigitte MOREAU pour son aide précieuse dans la réalisation de plusieurs manips ainsi qu'à mes collègues et amis du laboratoire MMS en particulier Fadou, Stéphane, Hung, Feddi, Sophie, Yan, Vincent, Dorothée...un grand merci pour leur apport scientifique et moral.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent également à mes collègues et amis du laboratoire d'Ecotoxicologie Marine et Environnementale de Sfax en particulier Wafa DAMAK-SMAOUI, Monia MACHREKI-AJMI, Rim LADHAR-CHAABOUNI, Sawssan MEZGHANNI, Rim KHLIFI, Molka FEKI, Fatma TRABELSI, Souhir HADRICH, Marwa LASSOUD et Emna RIGUENE.

Un grand merci aussi au Pr. Med El Hadi KHEBBEB pour m'avoir fourni les coques de la lagune d'Annaba en Algérie et au Pr Carlos SAAVEDRA pour les coques d'Espagne. Une pensée particulière aux pêcheurs qui m'ont aidé dans les différentes collectes.

Je tiens finalement à remercier toutes les personnes formidables que j'ai pu rencontrer grâce à cette thèse et qui en ont rendu le déroulement plus agréable.....

Tables des matières

Chapitre I : Introduction

Chapitre IA : Contexte et objectifs.....	1
Chapitre IB: Synthèse bibliographique.....	3
I. Le modèle biologique <i>Cerastoderma glaucum</i>	3
1. Position systématique.....	3
2. Origine, répartition géographique et préférences écologiques.....	3
3. Morphologie et biologie.....	5
4. Nutrition.....	6
5. Histoire de vie et reproduction.....	6
II. Facteurs influençant la structure génétique chez les organismes marins.....	8
1. Dispersion et barrières.....	8
2. Propriétés des marqueurs génétiques utilisés dans les études phylogéographiques.....	9
III. Evaluation des risques des milieux aquatiques.....	10
1. Sources de contamination des milieux aquatiques.....	11
2. Méthodologie de bio-surveillance ou de bio-monitoring.....	11
3. Bio-indicateur et espèce sentinelle.....	12
4. Biomarqueurs.....	14
5. Niveaux d'études des réponses aux stress environnementaux.....	16
Chapitre IC: Choix stratégique et démarche expérimentale.....	18
I. Choix du modèle biologique.....	18
II. Choix des approches <i>in situ</i> / expérimentale.....	18
1. Approche <i>in situ</i>	19
a. Choix de la Méditerranée occidentale pour étudier la structure génétique de <i>C. glaucum</i>	19
b. Choix du golfe de Gabès et des sites d'études pour la partie écotoxicologie.....	20
c. Choix des marqueurs biologiques.....	24
d. Choix des organes.....	26
2. Approche <i>in vivo</i>	27
a. Choix des contaminants.....	27
b. Choix des concentrations.....	27
c. Choix des marqueurs de contamination.....	28
d. Choix des organes.....	29
Chapitre II: Matériels et méthodes.....	30
A. Techniques de dosage des métaux.....	30

1.	Traitement des échantillons	30
1.1	Echantillons biologiques	30
1.2	Echantillons de sédiment	30
1.3	Echantillons des Effluents.....	30
2.	Techniques analytiques utilisées	30
2.1	Dosage du Cadmium, Cuivre et Nickel par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE) (mode sans flamme).....	30
2.2	Dosage du Zinc par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE) (mode flamme).....	31
2.3	Dosage des sédiments et des effluents par spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES).....	32
B.	Techniques histologiques	34
1.	Fixation de la gonade	34
2.	Inclusion	34
3.	Coupes.....	35
4.	Déparaffinage réhydratation et coloration des tissus.....	36
5.	Le montage	37
6.	Analyse d'image.....	37
7.	Identification des stades reproducteurs et calcul de l'indice de maturité.....	38
C.	Dosages biochimiques.....	38
1.	Dosage des protéines	38
2.	Dosage du glycogène.....	38
3.	Dosage des lipides	39
4.	Dosage du malondialdéhyde	39
5.	Dosage de l'acétylcholinestérase.....	40
D.	Techniques de biologie moléculaire.....	40
I.	Etude phylogéographique.....	40
1.	Extraction de l'ADN génomique	40
2.	Amplification de l'ADN génomique	41
3.	Séquençage	42
4.	Traitement des séquences	42
5.	Construction de réseau de relation entre les séquences.....	42
6.	Analyse statistique	42
7.	Récapitulatifs du principe de la méthode.....	43
II.	Etude écotoxicologique.....	44
1.	Recherche et séquençage des régions codantes d'intérêt	44
2.	Extraction des ARN totaux	44
3.	Transcription inverse (RT).....	45

4. Amplification par PCR classique.....	46
5. Electrophorèse	47
6. Purification des fragments d'intérêt.....	48
7. Clonage et transformation bactérienne	48
8. PCR quantitative en temps réel.....	50
E. Evaluation de l'état de stress des individus : « test de stress-on-stress ».....	52
F. Indice de condition des coques	52
G. Analyse statistique	52
H. Description des expérimentations	53
1. Exposition de <i>C. glaucum</i> aux effluents en laboratoire.....	53
2. Exposition de <i>C. glaucum</i> au Cd en laboratoire.....	54

Chapitre III: Approche en milieu naturel

Chapitre IIIA: Etude de la structure génétique de populations de coque *Cerastoderma glaucum* en méditerranée occidentale.....

56

I. Introduction.....	56
II. Résultats.....	56
1. variabilité intra populationnelle.....	56
1.1 Marqueur mitochondrial COI	56
1.2 Marqueur nucléaire ITS 1	60
2. Variabilité inter populationnelle	63
2.1 Marqueur mitochondrial COI	63
2.2. Marqueur nucléaire ITS1	65
III. Discussion.....	68
1. Diversité génétique	69
2. Flux géniques entre populations	70
3. Population distincte d'Ellouza	72
IV. Conclusion partielle	73

Chapitre III.B: Réponse adaptative des populations naturelles de la coque *Cerastoderma glaucum* dans des sites présentant différents niveaux de pollution.....

74

I. Introduction.....	74
1. Les biomarqueurs étudiés.....	75
1.1 Le malondialdéhyde (MDA).....	75
1.2 Les Acétylcholinestérases (AChE)	75
1.3 Les réserves énergétiques	76
1.4 Le stress-on-stress.....	76
1.5 L'indice de condition	77

1.6 Le sex-ratio	77
1.7 Les Méthallothionéines (MTs).....	77
1.8 Les transporteurs à ATP Binding Cassette (ABC) -B1	77
1.9 Les protéines de choc thermique (HSP70)	78
1.10 Les superoxydes dismutases	78
1.11 La catalase (CAT)	79
1.12 La cytochrome-c-oxydase (COI)	79
II. Résultats.....	80
A. Etude préliminaire.....	80
B. Niveau individuel.....	82
1. Le test de stress-on-stress	82
2. L'indice de condition	82
3. Le sex-ratio.....	83
C. Niveau organe	84
1. Teneur en Cd, Cu, Zn et Ni chez les coques issues des trois sites	84
2. Réserves énergétiques, malondialdéhyde (MDA) et Activité cholinestérase (AChE).....	84
D. Niveau cellulaire : étude du cycle reproducteur.....	87
1. Rappel des travaux antérieurs.....	87
2. Etude du cycle sexuel.....	87
2.1 Description des stades de développement des gonades chez les mâles	87
2.2 Description des stades de développement des gonades chez les Femelles	90
3. Evolution des stades reproductifs.....	92
4. Evolution de l'indice de maturité (IM).....	94
5. Evolution du diamètre ovocytaire	94
E. Niveau Moléculaire.....	95
1. Niveau d'expression des gènes.....	95
2. Analyse en composante principale	98
III. Discussion.....	99
A. Niveau individuel.....	100
B. Niveau organe	102
C. Niveau cellulaire	105
D. Niveau moléculaire	107
IV. Conclusion partielle.....	108

Chapitre IV: Approche en Conditions contrôlées

Chapitre IV.A: Etude de l'impact d'une contamination par les effluents sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque <i>Cerastoderma glaucum</i>	109
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

I. Introduction.....	109
II. Résultats.....	110
1. Effets de l'exposition aux effluents sur l'état physiologique global des coques	110
2. Concentrations en métaux dans les effluents F1 et F2 et dans les tissus des coques.....	111
3. Effets de l'exposition à F1 et à F2 sur l'expression des gènes.....	114
4. Analyse en composante principale.....	117
III. Discussion.....	122
1. Concentration des métaux dans les effluents	123
2. Accumulation des métaux dans les tissus des coques.....	123
3. L'état physiologique global des coques	124
4. Effet de l'exposition aux effluents sur l'expression des gènes	124
IV. Conclusion partielle	127
 Chapitre IV.B: Etude de l'impact d'une contamination par le cadmium sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque <i>Cerastoderma glaucum</i>	
128	
I. Introduction.....	128
II. Résultats.....	129
1. Taux de mortalité, stress-on-stress et indice de condition.....	129
2. Accumulation du Cd dans les tissus des coques	131
3. Effet de l'exposition au Cd sur l'expression des différents gènes	132
4. Analyse en composante principale.....	135
III. Discussion.....	138
IV. Conclusion partielle	144
 Chapitre V: Conclusion générale et perspectives	
I. Récapitulatifs des principaux résultats	145
II. Perspectives de recherche	147
 Références bibliographiques.....	
149	

Liste des figures

Figure 1 Photographie de <i>Cerastoderma glaucum</i>	3
Figure 2 Diagramme schématique de l'ADN ribosomique nucléaire chez les eucaryotes. Les gènes codant les sous unités ribosomiques 18S, 5.8S et 28S sont séparés par des espaceurs internes transcrits « Internal transcribed spacers » 1 (ITS1) et 2 (ITS2) d'après Liang et al. (2006).	10
Figure 3 Schéma de la place des biomarqueurs dans les méthodologies d'évaluation de la contamination de l'environnement par les polluants toxiques et dans celles des risques écotoxicologiques qui en résultent dans les populations et les communautés naturelles d'après Lagadic et al. (1998).....	15
Figure 4 Représentation des différents niveaux de l'organisation biologique pouvant être affectés par les polluants. Ce schéma illustre aussi l'intérêt écologique et mécanistique des différents niveaux dans la recherche. Modifié d'après Snape et al. (2004).	17
Figure 5 Carte de la Méditerranée occidentale et des sites de prélèvement pour l'étude de la structure génétique de la coque <i>C. glaucum</i>	20
Figure 6 Localisation des sites échantillonnés dans la région du golfe de Gabès.....	23
Figure 7 Photographie d'un spectrophotomètre d'absorption atomique électrothermique (SAAE) (mode sans flamme).	31
Figure 8 Photographie d'un spectrophotomètre d'absorption atomique électrothermique (SAAE) (mode flamme).	32
Figure 9 Photographie d'un ICP-AES ThermoScientifici CAP 6000 series ICP Spectrophotometer	33
Figure 10 Photographie du Technicon (Shandon, Sitaldel).....	35
Figure 11 Photographie du microtome mécanique (type HM 315).....	36
Figure 12 Principe de la méthode utilisée depuis l'extraction de l'ADN jusqu'au traitement des séquences pour les deux marqueurs COI et ITS1	43
Figure 13 Collecte et exposition des coques aux effluents.....	54
Figure 14 Collecte et exposition des coques au Cd.	55
Figure 15 Relation entre la diversité nucléotidique et la latitude	58
Figure 16 Distribution des mésappariements pour chaque population de <i>C. glaucum</i> . (Voir le tableau 1 pour les abréviations).	59
Figure 17 Relation entre la diversité nucléotidique et la latitude	61

Figure 18 Distribution des mésappariements pour chaque population de <i>C. glaucum</i> . (Voir le tableau 1 pour les abréviations).....	62
Figure 19 Réseau de relation entre les séquences de COI montrant les relations entre les haplotypes de <i>C. glaucum</i> issues de différentes populations (voir le tableau 1 pour les abréviations).....	64
Figure 20 Distribution des mésappariements pour le marqueur mitochondrial COI de l'ensemble des populations de <i>C. glaucum</i>	64
Figure 21 Méthode de cadrage multidimensionnelle (MDS) pour le marqueur mitochondrial COI basée sur la matrice de distances génétiques FST. (Voir le tableau 1 pour les abréviations).....	65
Figure 22 Réseau de relation entre les séquences ITS1 montrant les relations entre les haplotypes de <i>C. glaucum</i> issues de différentes populations (voir le tableau 1 pour les abréviations).....	66
Figure 23 Distribution des mésappariements de l'ensemble des populations de <i>C. glaucum</i> ..	67
Figure 24 Méthode de cadrage multidimensionnelle (MDS) pour le marqueur nucléaire ITS1 basée sur la matrice de distances génétiques FST. (Voir le tableau 2 pour les abréviations)...	68
Figure 25 Patron général du courant marin autour de la méditerranée. Extrait de Millot et Taupier Letage (2005).	72
Figure 26 Concentrations moyennes en Pb (A) et Cd (B) affectées des intervalles de confiance 95% <i>in toto</i> (n=15) des coques issus des six sites. E : Ellouza ; SM : Sidi Mansour ; G : Gargour ; N : Nakta ; M : Mahrès et K : Kerkanah. Les résultats sont exprimés en µg/g de poids frais. Les moyennes marquées par des lettres différentes sont statistiquement différentes (p<0.05).	81
Figure 27 Expériences de stress-on-stress sur des coques issues des trois sites (Ellouza (E) ligne bleue, Sidi Mansour (SM) ligne verte et Gargour (G) ligne beige). La figure donne la variation du pourcentage des survivants en fonction du temps d'exposition à l'air libre.	82
Figure 28 Evolution de l'indice de condition(IC) de coques issues des trois sites Ellouza (E), Sidi Mansour (SM) et Gargour (G) pour la période allant d'octobre à décembre. Les valeurs représentent la moyenne ± EC pour n=15. (*) Différence significative (p<0,05).....	83
Figure 29 Répartition du sex-ratio des coques issues des trois sites Ellouza (E), Sidi Mansour (SM) et Gargour (G). (n=60) M : mâles, F : femelles.	83
Figure 30 Concentration en Cd, Cu, Zn et Ni (moyenne ± IC) (n=20) chez les coques issues des trois sites Ellouza (E), Sidi Mansour (SM) et Gargour (G).(*) Différences significatives inter-sites (p<0,05).	84
Figure 31 Variation de la concentration moyenne en glycogène (A), lipides (B) protéines (C), MDA (D) et de l'activité cholinestérase (E) (n=15) affectées des intervalles de confiance (95%) chez les coques issues des trois sites Ellouza (E), Sidi Mansour (SM) et Gargour (G). (*) Différences significatives inter-sites (p<0,05).....	86

- Figure 32** Déroulement de la gamétogenèse chez *C. glaucum* sur les trois sites A : Ellouza, B : Sidi Mansour et C : Gargour. Stade 2 : développement, stade 3 : gamétogenèse ; stade 4 : Maturité ; stade 5 : ponte ; stade 6 : passé..... 93
- Figure 33** Evolution de l'indice de maturité sur les trois sites : Ellouza (E), Sidi Mansour (SM) et Gargour (G)..... 94
- Figure 34** Evolution du diamètre ovocytaire chez *C. glaucum* sur les trois sites : Ellouza (E), Sidi Mansour (SM) et Gargour (G). 95
- Figure 35** . Profil d'expression relative des gènes ABCB1, MT, CuZnSOD, MnSOD et HSP70 sur les trois sites Ellouza, Sidi Mansour et Gargour. Les différences des niveaux d'expression (échelle logarithmique) sont exprimées par rapport aux individus du site de référence Ellouza. 97
- Figure 36** Profil d'expression relative des gènes CAT et COI sur les trois sites Ellouza, Sidi Mansour et Gargour. Les différences des niveaux d'expression (échelle logarithmique) sont exprimées par rapport aux individus du site de référence Ellouza. 98
- Figure 37** (A) Analyse en composante principale de l'expression relative des gènes (ABCB1, MT, MnSOD, CuZnSOD, CAT, HSP70 et COI), de l'indice de condition (IC) et des teneurs en métaux (Cd, Cu, Zn et Ni). (B) Projection des individus selon les données quantitatives présentées dans (A). [Ni], [Zn], [Cu], [Cd], concentrations des métaux dans les coques..... 99
- Figure 38** . Evolution de la température sur les trois sites..... 107
- Figure 39** Protocole et résultats du test de stress-on-stress. A) Les conditions expérimentales: la longueur de la barre hachurée indique le temps d'exposition aux effluents. La flèche indique la suite de survie sous anoxie après exposition. B) Résultats: LT50 (en jours) des coques soumises à l'anoxie après exposition aux effluents F1 et F2 et à chaque temps d'exposition. 111
- Figure 40** Bioaccumulation du Ni, Zn, et Cu [$\mu\text{g/g}$ (PS)] chez les coques témoins et exposées à F1 et à F2. Les données sont exprimées en moyenne \pm ET (n = 4); PS: poids sec. 113
- Figure 41** Bioaccumulation du Cd [$\mu\text{g/g}$ (PS)] chez les coques témoins et exposées à F1 et à F2. Les données sont exprimées en moyenne \pm ET (n = 4); PS: poids sec 114
- Figure 42** Profils d'expression des gènes (A) MT, (B) ABCB1, (C) HSP70 et (D) COI. Les différences de niveaux d'expression (échelle logarithmique) sont exprimées par rapport aux contrôles au temps T0. Les différences significatives par rapport aux contrôles sont représentées par des astérisques (p <0,05, test de Kolmogorov-Smirnov). 116
- Figure 43** Les profils d'expression des gènes (A) CAT, (B) MnSOD et (C) CuZnSOD. Les différences de niveaux d'expression (échelle logarithmique) sont exprimées par rapport aux contrôles au temps T0. Les différences significatives par rapport aux contrôles sont représentées par des astérisques (p <0,05, test de Kolmogorov-Smirnov..... 117
- Figure 44** Analyse en composantes principales (ACP) de l'expression des gènes, la

bioaccumulation des métaux (Ni, Zn, Cu et Cd) et l'IC. (A) ACP effectuée sur les individus contrôles et exposés à l'effluent F1; (B) ACP effectuée sur les individus contrôles et exposés à l'effluent F2; IC, indice de condition; [Ni], [Zn], [Cu], [Cd], la bioaccumulation des métaux dans les tissus des coques..... 119

Figure 45 (A) Projections des individus selon les données quantitatives présentées dans la Figure 44-A (exposition à l'effluent F1); (B) Projections des individus selon les données quantitatives présentées dans la Figure 44-B (exposition à l'effluent F2). 122

Figure 46 Protocole et résultats du test de stress-on-stress. A) Les conditions expérimentales: la longueur de la barre hachurée indique le temps d'exposition au CdCl₂. La flèche indique la suite de survie sous anoxie après exposition. B) Résultats: LT50 (en jours) des coques soumises à l'anoxie après exposition à 50µg/L et à 5mg/L de CdCl₂ et à chaque temps d'exposition..... 131

Figure 47 Bioaccumulation du Cd [µg/g (PS)] chez les coques témoins et exposées à 50µg/L et à 5mg/L. Les données sont exprimées en moyenne ± ET (n = 5); PS: poids sec..... 132

Figure 48 Profils d'expression des gènes CuZnSOD (A), CAT (B), MT (C) et HSP70 (D). Les différences de niveau d'expression (échelle logarithmique) sont exprimées par rapport aux contrôles au temps T0. Les différences significatives par rapport aux contrôles sont représentées par des astérisques (p <0,05, test de Kolmogorov-Smirnov). 134

Figure 49 Profils d'expression des gènes COI (A) MnSOD (B) et ABCB1(C). Les différences de niveau d'expression (échelle logarithmique) sont exprimées par rapport aux contrôles au temps T0. Les différences significatives par rapport aux contrôles sont représentées par des astérisques (p <0,05, test de Kolmogorov-Smirnov)..... 135

Figure 50 Analyse en composantes principales (ACP) de l'expression des gènes, la bioaccumulation du Cd et l'IC. (A) ACP effectuée sur les coques contrôles et exposées à 50µg/L; (B) ACP effectuée sur les individus contrôles et exposés à 5mg/L; (C) Projections des individus selon les données quantitatives présentées en (B) (exposition à la concentration de 50µg/L) (B) ACP effectuée sur les individus contrôles et exposés à 5mg/L; (D) Projections des individus selon les données quantitatives présentées en (B) (exposition à la concentration de 5mg/L); IC, indice de condition; [Cd], bioaccumulation du Cd dans les tissus des coques; ●, contrôles ▲, exposées à 50 µg/L; +, exposées à 5 mg/L. 138

Liste des tableaux

Tableau 1 Codes et coordonnées géographiques des sites échantillonnés.....	20
Tableau 2 Codes et coordonnées géographiques des sites échantillonnés	23
Tableau 3 Synthèse des résultats pour les paramètres caractéristiques de la méthode d'analyse par ICP-AES.....	33
Tableau 4 Etapes de déshydratation, d'éclaircissement et d'inclusion.	35
Tableau 5 Réhydratation et coloration des tissus	37
Tableau 6 Liste des oligonucléotides et des températures d'hybridation utilisés pour les réactions de PCR.	41
Tableau 7 Amorces utilisées pour la caractérisation de l'ADNc des différents gènes ; T (°C), température de fusion	47
Tableau 8 N° d'accession dans les banques des données et longueurs de différentes séquences	47
Tableau 9 Amorces spécifiques utilisées pour la qRT PCR	52
Tableau 10 Polymorphisme de l'AND mitochondrial du gène COI et le test de neutralité; N- nombre d'individus, N _H - nombre d'haplotypes, S- nombre de sites polymorphes, H _d - indice de diversité haplotypique, π - indice de diversité nucléotidique, K- moyenne des différences nucléotidiques, D Tajima, Fu and Li's D* and F*, n.s.- non significative (voir le tableau 1 pour les abréviations)	57
Tableau 11 Diversité génétique de l'ADN mitochondrial COI pour chaque population de <i>C. glaucum</i> . N- nombre d'individus, N _H - nombre d'haplotypes, S- nombre de sites polymorphes (voir le tableau. 1 pour les abréviations des noms des sites).....	58
Tableau 12 Polymorphisme de l'ADN nucléaire du gène ITS1 et le test de neutralité; N- nombre d'individus, N _H - nombre d'haplotypes, S- nombre de sites polymorphes, H _d - indice de diversité haplotypique, π - indice de diversité nucléotidique, K- moyenne des différences nucléotidiques, D Tajima, Fu and Li's D* and F*, n.s.- non significative (voir le tableau 1 pour les abréviations).	60
Tableau 13 .Indices de diversité génétique de l'ADN nucléaire ITS1 pour chaque population de <i>C. glaucum</i>	61
Tableau 14 Analyse moléculaire de la variance (AMOVA) pour le marqueur mitochondrial COI aux niveaux intra et inter populationnel au sein des populations de <i>C. glaucum</i>	64
Tableau 15 F _{st} par paires de population obtenues à partir des données mitochondriales (les	

valeurs en gras sont significatives) (Voir le tableau.1 pour les abréviations).	65
Tableau 16 Analyse moléculaire de la variance (AMOVA) aux niveaux intra et inter populationnel au sein des populations de <i>C .glaucum</i>	67
Tableau 17 Fst par paires de population obtenues à partir des données nucléaires. (Les valeurs en gras sont significatives) (Voir le tableau.1 pour les abréviations).	67
Tableau 18 Composition en métaux des sédiments issus des trois sites Ellouza, Sidi Mansour et Gargour et valeurs de seuil toxiques établies par Long et al. 1955. Les résultats sont exprimés en mg/kg de sédiment sec.	81
Tableau 19 Composition des effluents F1 et F2 en métaux. Les normes tunisiennes et françaises sont indiquées sur les deux dernières lignes. Les résultats sont exprimés en mg/L d'effluent.	112
Tableau 20 Influence du traitement et du temps d'exposition sur l'expression des différents gènes par rapport aux contrôles.....	115
Tableau 21 Matrice de corrélation entre la bioaccumulation des métaux, l'expression des différents gènes, et l'indice de condition des coques exposées à l'effluent F1 et des contrôles.	120
Tableau 22 Matrice de corrélation entre la bioaccumulation des métaux, l'expression des différents gènes et l'indice de condition des coques exposées à l'effluent F2 et des contrôles.	121
Tableau 23 Influence du traitement et du temps d'exposition sur l'expression des différents gènes par rapport aux contrôles.....	133
Tableau 24 Matrice de corrélation entre la bioaccumulation du Cd, les expressions relatives des différent gènes et l'IC des coques exposés à 50 µg/L de Cd et les contrôles.	137
Tableau 25 Matrice de corrélation entre la bioaccumulation du Cd, les expressions relatives des différent gènes et l'IC des coques exposés à 5mg/L Cd et les contrôles	137

Liste des Abréviations

A : Adénine

AChE : Acétylcholinestérase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

Amp : Ampéciline

BSA : Albumine sérique bovine

CTAB : Cétyl triméthyl ammonium bromide

C : Cytosine

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

G: Guanine

HCl : Acide chlorhydrique

TAE : Tris acétate EDTA

Tm : Température de fusion

Tris : Trishydroxyméthyl aminométhane ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol, Sa formule chimique est $C_4H_{11}NO_3$

T : Thymine

OMS: organisation mondiale de la santé

X-Gal : 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranoside

NaCl : Chlorure de sodium

X-Gal : 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranoside

pb : Paire de base

PSU : Pratical Salinity Unit

NaCl : Chlorure de sodium

UV : Ultra violet

LB : Luria Broth

LT50 : Temps léthal pour 50% d'individus

MDA: Malonedialdéhyde

mg: Milligramme

RT : Transcription inverse

ROS : espèces réactives de l'oxygène

SAA : Spectrophotométrie d'absorption atomique

TBA : Acide thiobarbiturique

Liste des Abréviations

TBE : Tris-Borate-Edta Buffer

TEP : 1,1,3,3- tétraéthoxypropane

TNB : 5-thio-2- nitrobenzoate

Chapitre I

Introduction

Chapitre IA

Contexte et objectifs

Espèce de très large répartition géographique, la coque *Cerastoderma glaucum* est fréquemment rencontrée le long de la côte Nord-Est Atlantique, en Méditerranée, en mer du Nord, en mer Baltique, en mer Noire, en mer Caspienne et en mer d’Aral (Høpner Petersen et Russell 1973). Il y a même une évidence de la pénétration de cette espèce en mer Rouge (Brock 1978). Originaire de Méditerranée (Tarnowska 2010), cette espèce s’est propagée sur l’ensemble des littoraux géographiquement proches. En effet, les premiers fossiles du genre *Cerastoderma* viennent de l’Oligocène (il y a 33.9-23.0 millions d’années) (Keen 1969). *Cerastoderma glaucum* a évolué indépendamment en Méditerranée quand cette Mer a été séparée de l’Atlantique, il y a environ 4 millions d’années, entre le Miocène et le Pliocène (Rygg 1970). Des fossiles trouvés le long du littoral Libyen et Tunisien suggèrent que des bivalves morphologiquement indistincts de *C. glaucum* étaient présents dans des lagunes sur l’emplacement de la Méditerranée actuelle pendant le Pliocène (Gaillard et Testud 1980 ; Wołowicz 1991). A cause de la séparation de l’Atlantique, la Méditerranée s’est divisée en plusieurs lagunes avec des salinités différentes (la crise de salinité mesinienne) (CIESM 2008). *C. glaucum* avec sa capacité à supporter des conditions environnementales extrêmes y compris la salinité, a survécu dans ces conditions difficiles. En effet, des études ont montré que cette espèce est capable de tolérer des salinités de 5 PSU (Practical Salinity Unit) jusqu’à 84 PSU (Rygg 1970 ; Labourg et Lasserre 1980) ainsi que des variations de températures allant de 0°C jusqu’à plus de 45°C (Zaouali 1974). De plus, les travaux de Machreki-Ajmi et Hamza-Chaffai (2006) ont validé cette espèce comme organisme bio indicateur de pollution capable d’accumuler de fortes concentrations de métaux lourds qui excèdent les normes fixées par l’OMS. Toutes ces caractéristiques (large répartition et capacité à supporter des conditions environnementales extrêmes) font de ce bivalve un modèle biologique très intéressant à étudier d’un point de vue phylogéographique et écotoxicologique. Ainsi les objectifs de ces travaux de thèse étaient :

- D’étudier la structure génétique de la métapopulation en Méditerranée occidentale. Cette approche permettra d’évaluer les capacités de dispersion de cette espèce dans le bassin de Méditerranée occidentale et de quantifier le rôle de cette dispersion dans les processus de maintien de la biodiversité génétique intra spécifique, cette biodiversité étant le garant de l’adaptabilité des populations faces aux stress environnementaux.
- De comparer les caractéristiques de populations de cette espèce aux histoires de vie différentes et dans des environnements *a priori* bien contrastés afin de comprendre comment elles composent avec les stress présents. En parallèle, des études expérimentales en laboratoire ont été réalisées afin d’identifier les mécanismes qui

sont impliqués dans le succès ou l'échec du maintien des populations de *C. glaucum*.

La complémentarité de ces approches (*in situ* / expérimentale) permet d'avoir une vision globale de la problématique de ce travail à la fois au niveau écologique et mécanistique. Ainsi, les réponses adaptatives des organismes ont été analysées à différents niveaux d'intégration biologique allant de la population (structure génétique) jusqu'au niveau moléculaire (expression des gènes).

Afin de présenter l'étude menée en ce sens, ce manuscrit s'articule en quatre chapitres majeurs :

- Le premier chapitre vise à introduire les objectifs des travaux de thèse avec tout d'abord, une description du contexte et les buts de nos études, suivie d'une présentation du modèle biologique, d'une synthèse bibliographique sur les facteurs influençant la structure génétique chez les organismes marins et d'une évaluation des risques de contamination des milieux aquatiques. Dans la dernière partie de ce chapitre, une justification des choix stratégiques et de la démarche expérimentale est proposée.
- Le deuxième chapitre est consacré à l'approche menée *in situ*. Un premier sous chapitre concerne l'étude de la structure génétique de la coque *C. glaucum* en méditerranée occidentale. Dans un deuxième sous chapitre, la réponse adaptative des populations naturelles de la coque *C. glaucum* a été étudiée à différents niveaux de l'organisation biologique et dans des environnements bien contrastés.
- Le troisième chapitre concerne l'approche *in vivo* de la réponse biologique aux contaminants. Un premier sous chapitre est consacré à l'étude de l'impact d'une contamination par des effluents industriels sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque *C. glaucum*. Le deuxième sous chapitre est consacré à l'étude de l'impact d'une contamination par le cadmium sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque *C. glaucum*.
- Enfin, le dernier chapitre du document (Chapitre IV) présente une synthèse générale et les perspectives de recherche issues de ce travail.

Chapitre IB

Synthèse bibliographique

I. Le modèle biologique *Cerastoderma glaucum*

1. Position systématique

Cerastoderma glaucum (Figure.1) est un mollusque bivalve appartenant à la sous-classe des Pélécy-podes. Il fait partie de l'ordre des Eulamellibranches comprenant la famille des Cardidae à laquelle appartient le genre *Cerastoderma*.

Un point de vue sur la taxonomie et la diversité du genre *Cerastoderma* était établi par Scarlato et Starobogatov (1972). Ces auteurs ont défini 4 espèces largement réparties en Méditerranée, colonisant des profondeurs différentes et ayant des préférences d'habitats différents : *C.glaucum*, *C. lamarcki*, *C. clodiense* et *C. unbonatum*. Actuellement, tous ces noms sont synonymes de *C.glaucum* qui englobe toutes les populations de *Cerastoderma* dans les bassins Ponto-caspien et Méditerranéen (CLEMAM 2009).



Figure 1 Photographie de *Cerastoderma glaucum*

2. Origine, répartition géographique et préférences écologiques

Les premiers fossiles de *Cerastoderma glaucum* datent de l'Oligocène (33,9-23,0 millions d'années) (Keen 1969). *C. glaucum* a évolué avec son espèce sœur *C. edule* dans la Mer Méditerranée quand cette dernière a été séparée de l'Atlantique il y a environ 4 millions d'années entre le Miocène et le Pliocène (Rygg 1970). En effet, des fossiles trouvés sur les côtes Libyennes et Tunisiennes suggèrent que des bivalves morphologiquement indistincts de *C. glaucum* étaient présents dans des lagunes sur l'emplacement de la Méditerranée actuelle pendant le Pliocène (Gaillard et Testud 1980 ; Wołowicz 1991). Suite à son isolement de l'Atlantique, la Méditerranée s'est divisée en plusieurs lagunes avec des salinités différentes (la crise de salinité mesinienne) (CIESM 2008). *C. glaucum*, contrairement à une large part de

la faune marine méditerranéenne, a survécu à des conditions difficiles, puis, lorsque la connexion entre la Méditerranée et l'Atlantique a été rétablie, au début du Pliocène, (Ruggieri 1967) la séparation spécifique des 2 espèces de coques *C. glaucum* et *C. edule* empêchait toute hybridation.

Concernant sa répartition géographique, *C. glaucum* est établie dans les lagunes du littoral Méditerranéen. Elle est aussi présente sur le littoral Atlantique, celui de la Manche (Bowden et Heppell 1968), dans les régions de la mer du Nord (Eisma 1965), en mer Baltique, en Suède (Tulkki 1961) et en Norvège (Rygg 1970). Son aire de répartition a également atteint la mer d'Aral, la mer Noire et la mer Caspienne (Høpner Petersen et Russell 1973). Cette espèce a aussi été observée en Mer Rouge (Brock 1978).

C. glaucum habite dans les bassins isolés ou semi isolés comme les lagunes, les estuaires, les lacs et les baies (Kingston 1974). L'intolérance à l'exondation provoqué par les marées a longtemps été considéré comme le principal facteur abiotique limitant l'extension de la coque (Russell 1971, 1972). Néanmoins, son identification dans des zones à marée a infirmé cette hypothèse. Il semble établi maintenant que la qualité du sédiment joue un rôle beaucoup plus important que l'influence directe des marées. *C. glaucum* se développe préférentiellement dans des bassins avec une eau relativement stagnante et est considérée comme une espèce pionnière (Zaouali 1979). Une étude détaillée de la structure de la population *C. glaucum* a mis en évidence une répartition différentielle des cohortes jeunes (0,5 à 10 mm) dans les herbiers et âgées (10 à 37 mm) au niveau du sédiment. La migration des juvéniles vers le sédiment s'accompagne d'une augmentation de la croissance (Labourg et Lasserre 1980).

Cette espèce est donc euryhaline et eurytherme, les températures et les salinités extrêmes ne constituant donc pas réellement une barrière à sa dispersion. Labourg et Lasserre (1980) ont rapporté que cette espèce tolère des salinités allant de 5 PSU à 84 PSU. Zaouali (1974) a observé que ce bivalve tolère aussi des températures allant de 0°C à 45°C.

Une étude de la distribution de *C. glaucum* en Tunisie a été réalisée par Derbali et al. (2012) et a montré un stock relativement important de cette espèce au le sud de la Tunisie. En effet, la biomasse totale du cardium dans cette zone a été estimée à environ 4736 tonnes, soit plus de 1982 millions d'individus. La biomasse féconde et l'abondance féconde représentent respectivement 90,9% et 69,6% du stock total de l'espèce dans cette région. Par ailleurs, *C. glaucum* occupe la deuxième place après la clovisse en terme de la biomasse totale et elle est considérée parmi les espèces de coquillages la plus abondante dans cette région (Derbali et al. 2012). De plus, ces mêmes auteurs ont observé que l'espèce était quasi-absente aussi bien

dans la frange marine côtière qu'au niveau des zones du large mais très abondante dans la zone Estran.

3. Morphologie et biologie

Les coques sont des animaux à corps mou (mollusques) entouré d'un manteau qui délimite la cavité palléale dans laquelle se situent deux paires de branchies lamelleuses, d'où le nom lamellibranches de ce groupe. La tête est atrophiée et le pied développé en forme de hache d'où le nom Pélécy-podes aussi employé pour dénommer les bivalves. Chez *C. glaucum*, la coquille possède deux valves symétriques articulées autour d'une charnière et maintenues par un muscle adducteur.

La coquille de *C. glaucum* présente une taille variable, une forme ovale à quadratique souvent étirée vers l'arrière, elle est de couleur blanchâtre à gris jaunâtre plus ou moins teinté de brun violacé à olivâtre. La taille commune varie de 3 à 4 cm, avec une taille maximale enregistrée de 5,55 cm (Poutier 1987).

Le manteau est constitué de deux lobes et renferme la cavité palléale. Son rôle est multiple, outre la sécrétion des valves, le manteau assure une fonction sensorielle et initie la fermeture des valves en réponse à des conditions défavorables du milieu environnant. Il peut aussi contrôler le débit d'eau entrant. Il a aussi un rôle dans la respiration de l'animal et le stockage des réserves sous forme de glycogène et de lipides.

Les deux siphons de *C. glaucum* sont courts, bien visibles, un siphon inspireur proche du pied et un siphon expirateur proche du crochet de la coquille. Ces siphons permettent la communication de la cavité palléale avec le milieu extérieur et favorisent l'entrée et la sortie de l'eau.

Les branchies sont constituées de deux paires longitudinales de rangées de filaments et elles sont soudées au manteau à leur base. Comme chez tous les bivalves, elles jouent un rôle important dans l'alimentation et la respiration de l'organisme. Les cils présents sur les branchies sont à l'origine de la circulation d'eau par les valves. Les branchies filtrent et capturent les particules présentes dans la colonne d'eau mais également l'oxygène dissous. Elles effectuent, aussi, un tri des particules non nutritives qui ont pénétré dans la cavité palléale et qui sont rejetées sous forme de pseudofèces. Les particules nutritives sont enrobées de mucus et transportées à la bouche pour être ingérées (Ward et al. 1997).

La masse viscérale renferme les organes de la digestion, de l'excrétion et de la reproduction. Dans la partie antérieure du tube digestif, à proximité de la zone antérieure des branchies, deux paires de palpes labiaux permettent l'orientation des aliments vers la bouche. Un

œsophage cilié débouche sur un estomac contenant un stylet cristallin et dans lequel s'ouvrent des conduits provenant de la glande digestive. L'intestin circonvolué fait suite à l'estomac. **L'appareil circulatoire** est de type lacunaire. L'hémolymphe n'est pas canalisée à proximité des organes, mais elle circule dans des espaces libres dans les tissus conjonctifs (Grassé 1960).

Le système nerveux est formé de plusieurs paires de ganglions nerveux cérébroïdes, viscéraux et pédaux (Grassé 1960).

L'appareil reproducteur est constitué d'une gonade qui varie de taille en fonction des saisons. Les organes reproducteurs comprennent des systèmes de tubules très ramifiés de part et d'autre de la masse viscérale. Ce sont des glandes acineuses : dans chacune d'elles, les courts canaux des acini se rejoignent pour constituer des conduits qui finissent par s'unir en un seul conduit évacuateur, le gonoducte (Grassé 1960). Pendant la phase de repos sexuel, la gonade est à peine visible, elle se développe en revanche considérablement au printemps et en été dans un tissu conjonctif enveloppant la masse digestive.

4. Nutrition

Les coques sont des filtres d'eau de mer et se nourrissent des particules retenues. On les appelle donc des suspensivores détritivores actifs (Barnes 1980). Sara (2007) a indiqué que dans les bassins méditerranéens, la source organique dominante pour le régime alimentaire de cette espèce provient des détruits de l'herbier *Cymodocea nodosa*, des particules de l'algue *Ulva lactuca* et la microflore du sable. Les études sur les contenus stomacaux de *C. glaucum* ont montré que son régime alimentaire est composé principalement de diatomées centriques et pennées (Höpner et Peterson 1958). De plus il a été démontré que la suppression brutale de toutes les moules et coques d'un écosystème conduit à l'augmentation de la concentration des diatomées (Beukema et Cadée 1996), ce qui indique que ces dernières sont une source de nourriture importante des bivalves.

5. Histoire de vie et reproduction

La coque atteint, dans la plupart des cas, sa maturité sexuelle à l'âge de deux ans avec une taille qui varie entre 15 et 17 mm (Derbali et al. 2012). Parfois, les mâles atteignent leur maturité sexuelle avant les femelles et pondent pendant leur première année. L'histoire de vie et le cycle reproducteur de *C. glaucum* varient en fonction de la localisation des populations. Les populations du nord ont un cycle reproducteur monocyclique avec une gamétogenèse qui débute en septembre/octobre et une ponte entre mai et juillet (Rygg 1970 ; Boyden 1971), tandis que les populations méditerranéennes pondent jusqu'à 3 fois par an (Ivell 1979). Par

ailleurs, le déroulement général de la gamétogenèse chez *C.glaucum* a été décrit par Zaouali (1974 et 1980), Machreki–Ajmi (2009) et Derbali et al. (2009) dans la région méditerranéenne du golfe de Gabès. Les résultats obtenus par ces trois auteurs s'accordent pour indiquer le caractère étalé du cycle sexuel chez cette espèce ainsi que la présence de trois périodes de ponte qui n'étaient pas synchrones dans les trois études. Les conditions environnementales liées à la position géographique ont aussi une grande influence sur la période de ponte, en effet, les populations provenant des lagunes isolées pondent habituellement plus tôt que celles provenant des bassins largement ouverts sur la mer. Selon Barnes (1980), ce phénomène peut être dû à l'augmentation de la température qui est plus élevée dans les bassins isolés (lagunes) que dans ceux qui sont ouverts sur la mer. En effet il a été démontré que la température est parmi les facteurs abiotiques les plus importants qui influencent les processus de reproduction chez les bivalves, en particulier *C. glaucum* (Grassé 1960; Lubet et Choquet 1971 ; Zaouali 1980 ; Derbali et al. 2009). Les coques *C. glaucum* synthétisent leurs gamètes à chaque fois qu'un seuil de température dite « température critique de ponte » est atteint (Grassé 1960).

Chez la coque, comme chez la plupart des bivalves, certains facteurs environnementaux autres que la température peuvent, aussi, avoir des effets remarquables sur les différentes étapes spécifiques du cycle de reproduction. C'est ainsi qu'une salinité qui est toujours importante dans les eaux côtières de la Tunisie favorise l'allongement dans le temps du cycle sexuel chez *C. glaucum* (Zaouali 1974 ; 1980 ; Machreki-Ajmi, 2009 ; Derbali et al. 2009). Alors qu'une bonne nutrition est nécessaire pour mener à bien le déroulement du cycle sexuel, la composition même du plancton peut conditionner la maturation des gamètes et l'allongement de la durée de ponte (Trotta et Cordisco 1998).

Concernant le sex-ratio, Boyden (1971) suggère la présence d'une égalité du nombre des mâles et des femelles des populations de cette espèce. Derbali et al. (2009) a montré une prédominance des mâles chez les coques de petites tailles (< à 16 mm) et une prédominance des femelles chez les coques de tailles plus importantes (> à 24 mm). Alors que Kingston (1974) a trouvé que les mâles sont significativement plus nombreux que les femelles. Ce phénomène peut être expliqué par l'effort de reproduction lors de la maturation et l'émission des gamètes chez les femelles de cette espèce qui conduit à une augmentation de la mortalité. Ce phénomène a également été observé chez *Chlamys islandica* sp. (Brokordt et Guderley 2004) et *Mytilus trossulus* (Wołowicz et al. 2006).

C. glaucum possède un stade larvaire planctonique qui dure une semaine. Cette durée peut varier selon la localisation géographique des populations de ce bivalve. La larve se développe

correctement quand la salinité excède les 5 PSU. Pour la température, la fenêtre de température optimale nécessaire pour le développement de la larve de *C.glaucum* est située entre 15°C et 31°C (Kingston 1974).

II. Facteurs influençant la structure génétique chez les organismes marins

1. Dispersion et barrières

La capacité de dispersion et de mobilité d'un organisme ainsi que son environnement physique jouent un rôle majeur dans sa distribution ainsi que dans le niveau de connectivité entre les populations (Edwards et al. 2008). Bien que de longues distances de dispersion soient peu observées chez les animaux terrestres (Kinlan et al. 2005), les larves planctoniques de plusieurs organismes marins sont l'objet d'une dispersion sur de grandes distances. En effet la durée de cette phase planctonique est un facteur déterminant dans la dispersion des organismes marins. Elle peut durer quelques heures comme elle peut être aussi longue qu'un an ou plus pour les langoustes par exemple (Ovenden et al. 2009). Chez la coque *C. edule*, elle est par exemple de cinq semaines alors qu'elle n'est que d'environ une semaine chez *C. glaucum*. Cette courte durée observée chez *C.glaucum* est considérée comme une adaptation visant à retenir les larves dans une lagune natale (Pearson 2003). Cependant cette durée peut varier chez une même espèce selon la localisation de la population (Boyden 1971 ; Barnes 1980). Ainsi comprendre le transport des larves pélagiques est crucial pour la meilleure compréhension de la migration et des flux de gènes entre les populations (Gaines et Bertness 1992 ; Grosberg et Levitan 1992). Indépendamment de la durée et de la performance du stade larvaire, diverses barrières géographiques et hydrologiques peuvent entraver la dispersion. La colonisation de nouvelles zones pourrait également être entravée par d'autres contraintes abiotiques telles que la température, la salinité, le type de sédiment et la quantité de lumière ou le pH. Tous ces facteurs constituent une barrière quand ils sont au-delà de la limite de tolérance de l'espèce (Palumbi 1994). Les courants marins constituent le principal mode de transport des espèces avec des stades larvaires planctoniques et donc peuvent aussi influencer la direction de dispersion en raison des conditions physiques, du gradient ou simplement la force du mouvement de l'eau (Gaylord et Gaines, 2000). Cependant, la distribution des espèces ne dépend pas uniquement des facteurs abiotiques mais aussi de l'interaction avec les autres espèces.

2. Propriétés des marqueurs génétiques utilisés dans les études phylogéographiques

Il existe un nombre croissant de marqueurs génétiques disponibles (Feral 2002 ; Ray 2007) offrant différents degrés de résolution qui peuvent être utilisés pour détecter les différents niveaux de divergence évolutive. Leur utilisation englobe les études généalogiques, la structure génétique des populations ainsi que les études phylogénétiques et historiques. Tous les marqueurs génétiques ont leurs propres avantages et inconvénients. L'électrophorèse des allozymes a été le premier type de marqueur utilisé pour tirer des conclusions sur les niveaux de diversité génétiques des populations (Hubby et Lewontin 1966). Plus tard, des méthodes utilisant l'ADN mitochondrial (ADN_{mt}) et l'ADN nucléaire (ADN_n) ont été appliquées pour estimer la généalogie des gènes. L'ADN mitochondrial a été largement utilisé pour construire des phylogénies et déterminer les motifs phylogéographiques. En effet, cet ADN est une petite molécule circulaire (14-39Kb). Pour la majorité des animaux, elle est composée des régions suivantes : la région de contrôle, 2 gènes codant pour l'ARN_r, 22 gènes codant pour l'ARN_t et 13 codant pour les protéines (les sous unités I, II et III de la cytochrome-c oxydase, les sous unités 6 et 8 de l'ATPase, les sous unités cytochrome-b et 7 du système NADH réductase) (Wolstenholme 1992). Le génome mitochondrial ne comporte que des gènes sans introns et ne fait pas l'objet de recombinaison entre les différentes copies présentes dans une mitochondrie. Bien que très majoritairement transmis de façon uniparentale, une transmission biparentale a pu être mise en évidence pour certains bivalves comme *Mytilus sp.* (Zouros et al. 1992, 1994) ainsi que pour les mammifères (Gyllensten et al. 1991). La taille effective de la population des gènes mitochondriaux est quatre fois moins importante que celle des loci nucléaires. Par conséquent, en moyenne quatre fois plus de génomes nucléaires sont transférés par une migration individuelle. La vitesse d'évolution de l'ADN mitochondrial est de 5 à 10 fois plus élevée que celle de l'ADN nucléaire chez les mammifères (Wolstenholme 1992). C'est pourquoi l'ADN mitochondrial est un marqueur très utile pour les études phylogéniques, phylogéographiques (Crozier 1990) et au niveau intraspécifique (Kolbe et al. 2004 ; Voisin et al. 2005). Afin de comprendre les relations phylogéographiques entre populations ou espèces, on étudie le polymorphisme des séquences de l'ADN mitochondrial. Cette étude est réalisée par l'analyse des haplotypes qui diffèrent par des substitutions d'un ou de plusieurs nucléotides.

Un certain nombre de marqueurs sont aussi disponibles pour détecter le polymorphisme de l'ADN nucléaire. Les microsatellites sont les marqueurs nucléaires les plus utilisés pour

détecter le polymorphisme de cet ADN au niveau intra-spécifique (Bercquet 2011 ; Tarnowska 2010 ; Oyieyi 2010). Ces microsatellites sont des séquences répétées en tandem qui se trouvent dispersés dans le génome nucléaire. Elles sont très polymorphes en raison d'un taux élevé de mutations. Elles sont très utilisées pour des études de cartographie génétique et de génétique des populations mais présentent plusieurs facteurs limitant liés à l'homoplasie due au taux de mutation élevé, à la nécessité de développer des amorces spécifiques à chaque espèce et à la mise au point des conditions d'amplification.

Le fragment ITS ou « Internal Transcribed Spacer » a aussi été utilisé comme marqueur nucléaire pour l'analyse de la structure génétique des populations, l'identification des espèces et plus généralement pour les études de phylogénie (Shen et al. 2012 ; Callejón et al. 2012 ; Tatonova et al. 2012). Il s'agit de séquences non codantes et non impliquées dans la formation du ribosome situées dans le locus codant les ARN ribosomiques (Liang et al. 2006) (Figure 2). Une cassette ribosomale dans le génome eucaryote nucléaire (Figure 2) comprend les gènes 18S, 5.8S et 28S qui sont séparés par les régions intercalaires transcrites (Internal Transcribed Spacer : ITS1 et ITS2).

Les régions ITS1 et ITS2 sont beaucoup moins conservées que 18S, 5.8S et 28S car la pression sélective qui s'exerce sur ces parties non codantes (ITS1 et ITS2) est moindre (Shen et al. 2012).

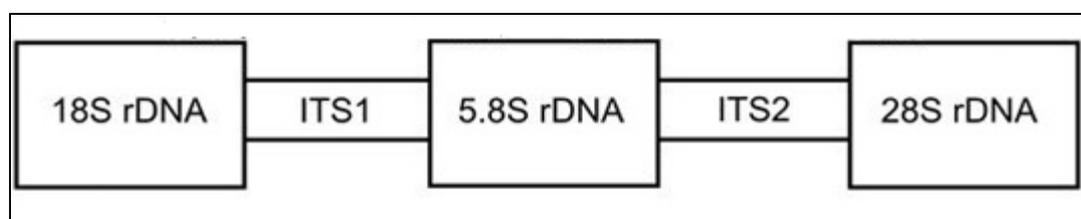


Figure 2 Diagramme schématisé de l'ADN ribosomique nucléaire chez les eucaryotes. Les gènes codant les sous unités ribosomiques 18S, 5.8S et 28S sont séparés par des espaceurs internes transcrits « Internal transcribed spacers » 1 (ITS1) et 2 (ITS2) d'après Liang et al. (2006).

III. Evaluation des risques des milieux aquatiques

Plusieurs études ont mis l'accent, depuis quelques décennies, sur l'évaluation de l'impact des contaminants sur les écosystèmes et sur les risques, pour les êtres vivants de vivre en contact avec des environnements pollués. Ces études se sont développées afin de mettre en place des outils permettant une bonne évaluation de l'état écologique des milieux. Ces études passent notamment par la recherche des sources de contamination des milieux aquatiques, les méthodologies de bio-surveillance (bio-monitoring) et l'utilisation de bio-indicateurs ou d'espèces sentinelles qui servent de support pour la mesure des biomarqueurs. Ces derniers

refléteront les degrés d'atteinte de l'environnement.

1. Sources de contamination des milieux aquatiques

L'anthropisation croissante du siècle dernier a conduit à l'émission, dans l'environnement aquatique, d'un grand nombre de contaminants de nature et d'origine diverses (e.g. urbaine, industrielle, agricole). Parmi ces contaminants, les effluents sont continuellement évacués par les stations d'épuration municipales et industrielles et ont progressivement affecté différents écosystèmes (Jadeja et al. 2007). Ces effluents représentent donc un réel danger pour les écosystèmes aquatiques du fait qu'ils contiennent de nombreux contaminants tel que des métaux, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), ou des produits pharmaceutiques (Gagné et al. 2008). D'une manière générale deux grands groupes de contaminants peuvent affecter les milieux aquatiques : les composés organiques qui sont représentés par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB) et les pesticides ; et les composés inorganiques qui regroupent les métaux et leurs dérivés méthylés (méthylmercure par exemple) et les polluants atmosphériques (ozone et chlorofluorocarbone) (Pelletier et al. 2004).

Notre étude s'intéressera particulièrement aux contaminants inorganiques représentés par les métaux et en particulier le cadmium. Ces derniers sont naturellement présents dans la croûte terrestre. Ils ne sont ni créés ni détruits par les activités humaines. Ils ne sont donc pas sujets à la biodégradation mais ils peuvent subir des transformations réversibles dans l'environnement naturel (par exemple le changement de la spéciation des métaux). Plusieurs métaux sont essentiels à la vie tel que le cuivre (Cu), le cobalt (Co), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le nickel (Ni) et le zinc (Zn) et leur présence dans le milieu biologique est essentielle. La bioaccumulation des métaux essentiels est donc un processus naturel, exigé par tous les organismes vivants afin de satisfaire à leurs besoins métaboliques. Par contre les métaux non essentiels n'ont aucun rôle biologique actuellement connu. C'est le cas du mercure (Hg), du plomb (Pb), du cadmium (Cd) et de l'argent (Ag). Plusieurs organismes ont développé des mécanismes efficaces pour contrôler leur concentration interne en métaux essentiels et pour maintenir celle-ci dans une gamme relativement restreinte (contrôle homéostatique). Ces mécanismes de contrôle homéostatique peuvent également jouer un rôle dans la détoxification de métaux non essentiels (Pelletier et al. 2004).

2. Méthodologie de bio-surveillance ou de bio-monitoring

Différentes approches de bio-surveillance peuvent être utilisées afin d'analyser les effets des contaminants sur les organismes aquatiques. Chacune de ces approches apportera différents

degrés d'information écotoxicologiques. **Les études *in situ*** sont effectuées en milieu naturel. Ces études représentent l'outil le plus intégrateur des conditions environnementales et permettent ainsi d'aboutir à des résultats pertinents sur l'état de contamination chimique du milieu environnant. Ces études présentent l'avantage d'une **représentativité** élevée et ce d'autant plus qu'elles se rapprochent des conditions physico-chimiques et biotiques propres aux écosystèmes naturels. Cependant avec la complexité des structures écologiques ainsi que l'intervention des facteurs relatifs aux modalités et aux mécanismes de la contamination, il est souvent difficile d'interpréter les données recueillies lors de ces études et de proposer des hypothèses explicatives. En plus, dans des conditions *in situ*, la multitude des composés toxiques contenus dans les rejets ne permet pas de déterminer avec exactitude lequel d'entre eux induit les effets toxiques. On distingue deux types de méthodes *in situ* : i) directe sur des organismes collectés directement sur le site, on parle dans ce cas de **bio-surveillance passive** ; ii) indirecte sur des organismes transférés sur le site, on parle dans ce cas de **biosurveillance active**. **Les études expérimentales** sont effectuées en laboratoire en conditions contrôlées et ont donc une **réplicabilité** élevée. Les paramètres expérimentaux étant peu nombreux et faciles à normaliser. Ces études permettent de prendre en compte les interactions entre les facteurs biotiques et abiotiques dans l'étude des effets des contaminants. Ces études permettent également de palier en partie certaines difficultés rencontrées dans les études *in situ*. En effet, en contrôlant des facteurs confondants, les bioessais de toxicité apparaissent comme des outils pertinents pour tester les mécanismes de toxicité ainsi que la biodisponibilité des contaminants grâce à son potentiel analytique puissant. Cependant, un modèle trop simplifié s'éloignant des conditions prévalant dans le milieu ne reflète pas fidèlement les phénomènes naturels. On peut généralement distinguer deux approches, ***in vivo*** et ***in vitro***. **Les techniques *in vivo*** offrent l'avantage de pouvoir travailler sur du matériel biologique vivant et constituent un bon moyen de réaliser une étude à long terme. Cependant **les techniques *in vitro*** offrent l'avantage de pouvoir tester individuellement, ou en mélange, les produits potentiellement toxiques. Ainsi, le couplage de ces méthodologies (*in situ*, *in vivo*, *in vitro*) constitue l'approche la plus rigoureuse qui permet d'avoir une vision globale sur les effets des contaminants sur les organismes aquatiques.

3. Bio-indicateur et espèce sentinelle

Un bio-indicateur est un organisme (ou une partie d'un organisme ou encore une communauté d'individus) qui peuvent nous renseigner sur la qualité de l'environnement (ou partie de l'environnement) (Li et al. 2010). On parle d'espèce sentinelle si les organismes sont déjà

présents dans l'écosystème (surveillance passive). La surveillance active correspond par contre à l'introduction standardisée d'organismes dans un écosystème par encagement (caging) (Hamza-Chaffai et al. 2000 ; Al Kadissi 2012). D'après Lagadic et al. (1998), un bio-indicateur peut aussi être un organisme qui par sa disparition ou par sa présence et/ou son abondance, renseigne sur l'état de santé d'un milieu. Nous pouvons ainsi distinguer des espèces «pollu-sensibles» (bioindicateurs négatifs) et des espèces «pollu-résistantes» ou «pollu-tolérantes» (bioindicateurs positifs). Une des premières problématiques sur laquelle les toxicologues se sont interrogés se rapporte aux caractéristiques que devrait posséder un bio-indicateur idéal. Ces caractéristiques devraient être les suivantes d'après Ramade (2007) :

- tous les individus d'une espèce bio-indicatrice devraient présenter une corrélation identique et simple entre leur teneur en substance polluante et la concentration moyenne de cette dernière dans le biotope ou dans l'alimentation quelles que soient la localisation et les conditions environnementales ;
- l'espèce devrait être capable d'accumuler le polluant sans être tuée ni même sans que sa reproduction ne soit perturbée par les niveaux maximum des polluants observés dans l'environnement ;
- l'espèce devrait être sédentaire afin d'être certain que les concentrations trouvées soient bien en rapport avec la contamination du site géographique où elle a été prélevée ;
- l'espèce devrait être abondante dans l'ensemble de l'aire étudiée et si possible avoir une distribution biogéographique afin de favoriser la comparaison entre zones distinctes.
- les espèces à forte longévité sont préférables parce qu'elles permettent un échantillonnage sur plusieurs classes d'âges si nécessaire ;
- l'espèce devrait être de taille suffisante pour fournir des tissus en quantité nécessaire pour analyse. Cette caractéristique s'avère encore plus importante pour la dissection quand les études sont faites sur l'accumulation dans des organes spécifiques ;
- l'espèce devrait être facile à échantillonner et l'animal assez résistant pour être amené en laboratoire afin de réaliser par exemple des études de décontamination.

Les facteurs contrôlant la fiabilité de ces bio-indicateurs peuvent être regroupés en deux catégories. La première correspond aux facteurs intrinsèques, propres aux caractéristiques de

l'espèce bio-indicatrice telle que le taux d'accumulation et d'excrétion et l'état éco-physiologique des individus. La seconde correspond aux facteurs extrinsèques environnementaux tels que la température, le pH des eaux et la salinité.

4. Biomarqueurs

L'utilisation des biomarqueurs représente une méthodologie qui s'est initialement développée à des fins de *biomonitoring*. Elle a connu, au cours des quinze dernières années, un important développement dans l'évaluation de la contamination et de l'effet des polluants sur les populations et les communautés. Les biomarqueurs sont des variables biologiques permettant à la fois de caractériser l'état physiologique des individus dans un environnement donné et de détecter, de façon précoce, tout dérèglement pouvant avoir des répercussions à plus long terme sur les écosystèmes (populations et communautés). Plusieurs définitions concernant les biomarqueurs ont été énoncées au cours de ces dernières années (Schlenk 1999). Nous retiendrons la suivante: « un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, physiologique ou comportemental qui révèle une exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant » (Lagadic et al. 1998). Les biomarqueurs sont mesurés sur des espèces capables d'accumuler les polluants (bio-indicateurs) et vont permettre de réaliser des études d'écotoxicité des substances chimiques (chemical testing) au laboratoire et de *biomonitoring in situ*. Les biomarqueurs peuvent être subdivisés en trois classes selon Van der Oost et al. 2003.

Les biomarqueurs d'exposition permettent la détection et la mesure d'une substance exogène ou de son métabolite ou encore du produit d'une interaction entre un agent xénobiotique et une molécule ou une cellule cible dans un compartiment intérieur d'un organisme. Ces biomarqueurs indiquent que le contaminant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme.

Les biomarqueurs d'effet sont des altérations biochimiques, physiologiques, comportementales ou autres au sein d'un organisme dont la réponse, en fonction de son intensité, peut être assimilée à un trouble ou une maladie. L'utilisation des biomarqueurs d'effet permet de montrer que le xénobiotique est entré dans l'organisme et, qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, a exercé un effet toxique sur une cible critique. Ils sont utilisés pour évaluer les effets des xénobiotiques sur les individus, les populations ou les écosystèmes.

Les biomarqueurs de susceptibilité / sensibilité sont des indicateurs de la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre au stress induit par l'exposition à un xénobiotique. Ils

ont pour objet de rendre compte de différences inter-individuelles dans la réponse à une exposition toxique. Cette sensibilité individuelle peut résulter de polymorphisme des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques ou dans la réparation des lésions de l'ADN. L'usage des biomarqueurs s'intègre dans les diverses méthodologies utilisées dans l'étude de l'impact écotoxicologique des polluants (Figure 3). Les biomarqueurs d'exposition s'intègrent dans le *monitoring* des pollutions de l'environnement dans la mesure où ils témoignent de la contamination de l'environnement par la présence des polluants dans l'organisme. Il en est de même pour les biomarqueurs d'effets qui permettent à la fois de participer au *monitoring* des conséquences de la pollution mais contribuent aussi à l'évaluation des effets des polluants, donc des conséquences écologiques des pollutions et en définitive de l'état des écosystèmes. Enfin, l'usage des biomarqueurs de sensibilité aux effets contribue, ainsi que les précédents, à l'évaluation de la réponse des populations et des communautés aux polluants.

Événements écotoxicologiques

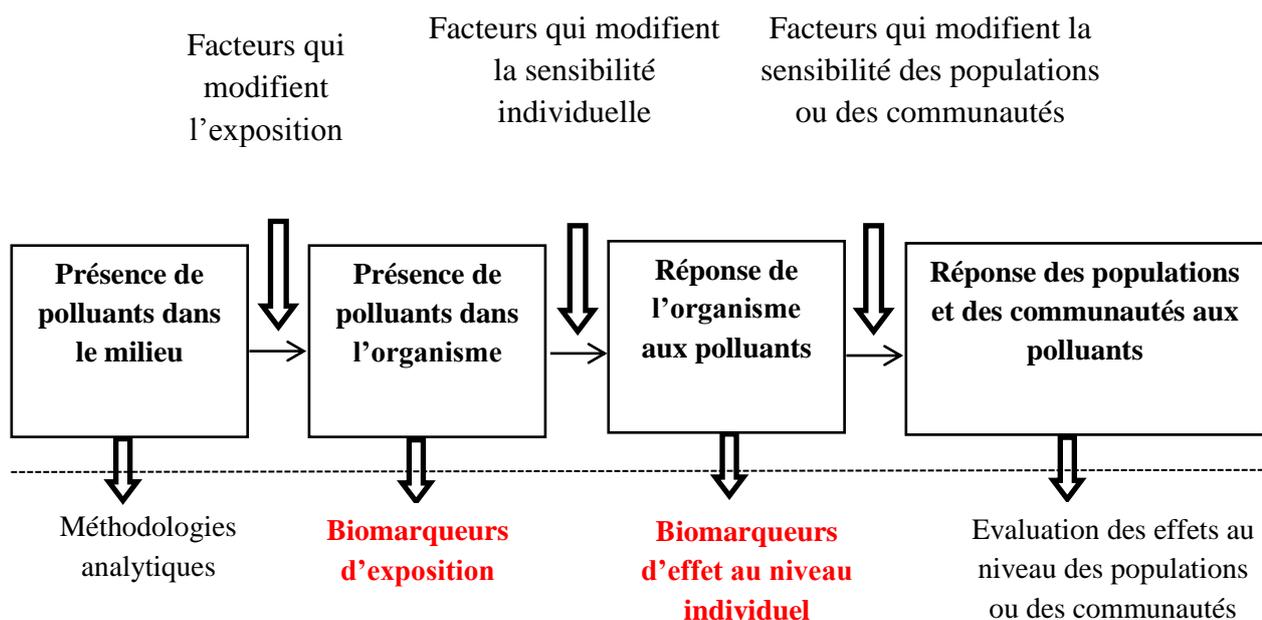


Figure 3 Schéma de la place des biomarqueurs dans les méthodologies d'évaluation de la contamination de l'environnement par les polluants toxiques et dans celles des risques écotoxicologiques qui en résultent dans les populations et les communautés naturelles d'après Lagadic et al. (1998).

En général un biomarqueur est dit pertinent s'il est capable de nous renseigner sur la biodisponibilité d'un polluant et s'il est capable de détecter les réponses biologiques précoces. Dans ce sens Van der Oost et al. (2003) et Hamza-Chaffai (2014) ont établi six critères majeurs pour évaluer la robustesse et la performance d'un biomarqueur :

- la mesure d'un biomarqueur doit se faire sous assurance qualité, avoir un coût peu élevé et être facile à réaliser ;
- la réponse du biomarqueur doit être sensible à l'exposition au contaminant et/ou à ses effets pour servir comme paramètre précoce d'alerte ;
- les valeurs de base du biomarqueur doivent être bien définies pour distinguer la variabilité naturelle (bruit) et le stress induit par le contaminant (signal) ;
- les effets des facteurs confondants sur la réponse de ces biomarqueurs doivent être bien établis ;
- les mécanismes soulignant les relations entre réponse du biomarqueur et exposition au polluant (dose et temps) doivent être établis ;
- la pertinence écologique de la réponse du biomarqueur, c'est-à-dire les relations entre sa réponse et l'impact (à long terme) sur l'organisme, doit être établie.

5. Niveaux d'études des réponses aux stress environnementaux

Les réponses adaptatives des organismes aux stress environnementaux peuvent avoir lieu à différents niveaux de l'organisation biologique tels que le niveau moléculaire et cellulaire, le niveau individuel et populationnel et finalement les niveaux d'intégration supérieurs : communautés, peuplements et écosystèmes. L'ensemble de ces réponses forme la réponse intégrée aux facteurs de stress. Si un contaminant exerce un effet toxique sur un organisme, les niveaux moléculaires et cellulaires sont les premiers à être affectés. Au-delà d'un certain seuil dans la dose du contaminant ou dans la durée d'exposition, des effets physiologiques de l'organisme peuvent être détectables. Si un grand nombre d'individus sont affectés par ces modifications physiologiques, les effets des toxiques peuvent être décelables au sein des populations et perturber les performances écologiques telles que le taux de croissance, l'expansion, l'efficacité d'utilisation des ressources ou l'adaptabilité. La disparition de certaines espèces clés d'un écosystème peut donc avoir lieu, ce qui peut se répercuter au niveau des communautés. Ainsi, la structure et le fonctionnement d'un écosystème dans son ensemble peuvent être modifiés (Moore et al. 2004).

Cependant, les effets à des niveaux hiérarchiques élevés (population, communauté, écosystème, santé humaine) sont souvent complexes et difficiles à détecter de façon précoce (Moore et al. 2004) et ces effets sont toujours précédés de changements à des niveaux hiérarchiques de l'organisation biologique inférieurs. Ainsi, des signaux de détresse peuvent être détectés aux niveaux moléculaire et cellulaire, de façon beaucoup plus précoce, puis un lien peut être effectué entre ces signaux et les conséquences possibles aux niveaux

d'organisation supérieurs (Figure 4) (Moore et al. 2004).

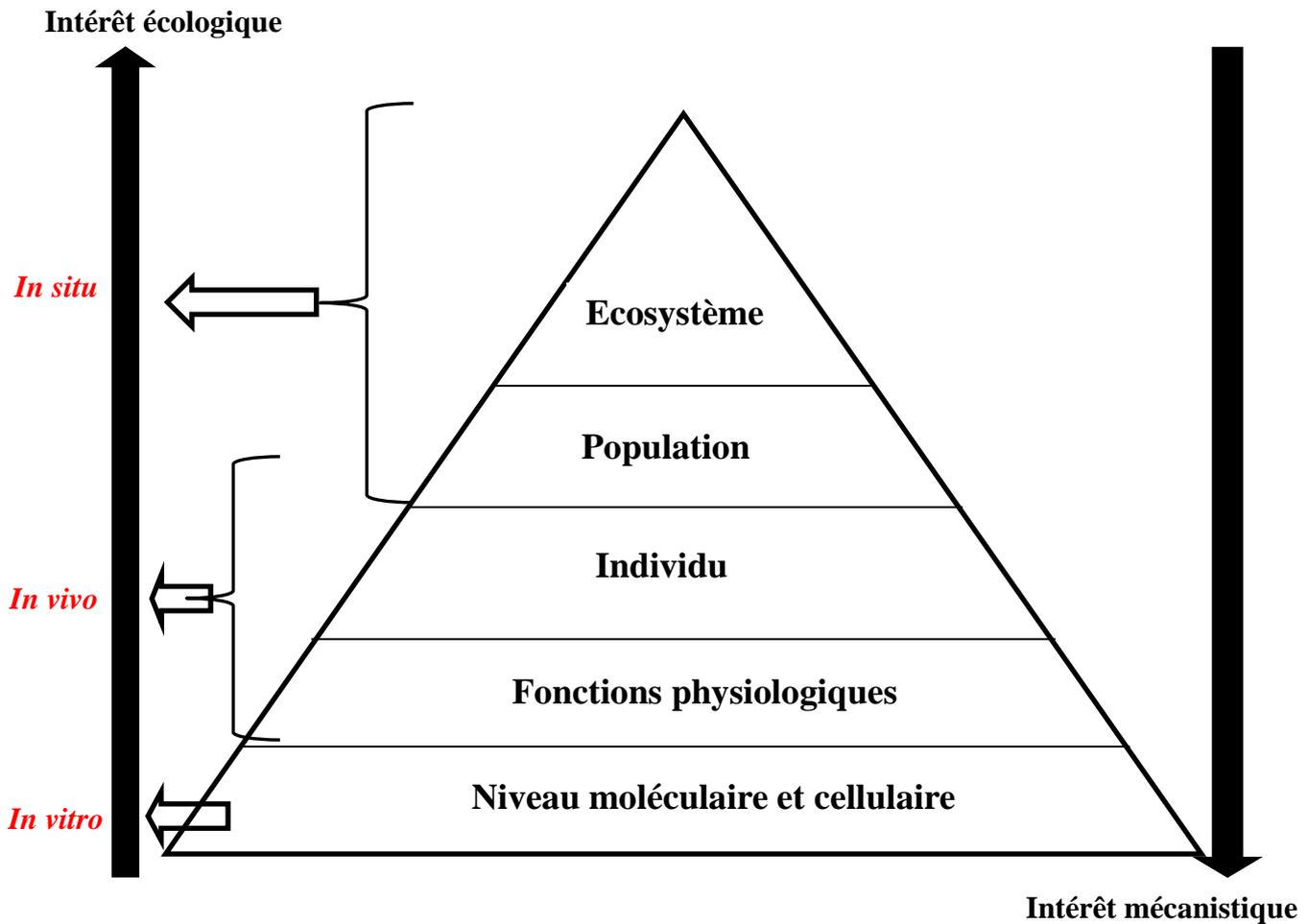


Figure 4 Représentation des différents niveaux de l'organisation biologique pouvant être affectés par les polluants. Ce schéma illustre aussi l'intérêt écologique et mécanistique des différents niveaux dans la recherche. Modifié d'après Snape et al. (2004).

Chapitre IC

Choix stratégiques et démarche expérimentale

Ce chapitre présente les principaux choix ayant guidé l'élaboration de ce travail de recherche.

I. Choix du modèle biologique

Notre choix du bivalve *C. glaucum* s'est basé sur plusieurs caractéristiques faisant de ce bivalve un modèle très intéressant à la fois pour étudier sa structure génétique ainsi que pour des études de bio-surveillance ou de *biomonitoring*. Ces caractéristiques se résument dans :

- sa très large répartition géographique ;
- son caractère filtreur ;
- son abondance ;
- sa facilité de collecte en milieu naturel ;
- son caractère sédentaire et benthique ;
- sa tolérance pour des environnements extrêmes et pollués ;
- sa présence dans le sédiment superficiel ;
- sa validation comme organisme bio-indicateur de pollution ;
- sa convenance pour les études sur le terrain et en laboratoire.

II. Choix des approches *in situ* / expérimentale

L'approche *in situ* représente l'outil le plus intégrateur des conditions environnementales qui permet d'aboutir à des résultats pertinents sur l'état de contamination du milieu environnant. Dans notre étude, la réponse adaptative de *C. glaucum* a été analysée en milieu naturel à différents niveaux de l'organisation biologique : **le niveau populationnel** par l'étude de sa structure génétique en Méditerranée occidentale, **le niveau individuel** par l'étude de certains paramètres physiologiques tels que la capacité à supporter l'anoxie (test de stress on stress), l'indice de condition et l'étude du sex-ratio, **le niveau organe** par les tests de bioaccumulation des métaux, **le niveau cellulaire** par l'étude histologique du cycle reproducteur et du déroulement de la gamétogenèse et **le niveau moléculaire** par l'étude de l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse à différents types de stress. A la lumière des résultats obtenus pour l'étude *in situ*, des études expérimentales ont été réalisées afin d'élucider les mécanismes qui peuvent expliquer l'échec ou le succès du maintien des populations de *C. glaucum*. Deux expérimentations ont été réalisées : la première en utilisant un mélange de contaminants (les effluents) provenant d'une industrie chimique de transformation des phosphates bruts et la seconde en utilisant un contaminant pur, le cadmium. Dans cette approche expérimentale, la réponse de *C. glaucum* a été analysée au niveau **individuel** par le test de stress on stress, au niveau **organe** par les tests de bioaccumulation des métaux lourds

et au niveau **moléculaire** par l'étude de l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse à différents types de stress. L'utilisation couplée de ces approches *in situ* et expérimentale permet d'avoir une vision globale sur la problématique de la thèse à la fois au niveau écologique et mécanistique (Figure 4).

1. Approche *in situ*

a. Choix de la Méditerranée occidentale pour étudier la structure génétique de *C. glaucum*

La mer Méditerranée offre un environnement très intéressant pour étudier la dispersion et la structure génétique de la coque *C. glaucum*. En effet, Tarnowska (2010) a démontré que la Méditerranée peut être considérée comme l'aire la répartition d'origine de *C. glaucum* à partir de laquelle l'espèce s'est propagée à d'autres mers en Europe et dans d'autres régions. De plus, les travaux de Nikula et Vainola 2003 ont démontré la présence d'une rupture phylogéographique en Méditerranée orientale séparant les populations des mers Caspienne et Egée des populations des mers Méditerranée et Baltique ainsi que de l'Océan Atlantique. Dans ce sens, notre objectif de départ était d'étudier la structure génétique de *C. glaucum* entre les bassins occidental et oriental de la Méditerranée afin de vérifier la notion de rupture phylogéographique au nord de la Tunisie. Cependant, pour des raisons politiques, il s'est avéré très difficile de collecter des échantillons dans le bassin oriental de la Méditerranée. De plus, des collègues libyens ont pu vérifier que cette espèce est absente de plusieurs régions en Libye et qu'elle n'existait peut être qu'au niveau de la frontière Tuniso-libyenne. Nous nous sommes donc orientés vers la Méditerranée occidentale où il était beaucoup plus facile de collecter nos échantillons de *C. glaucum*. Les échantillons de *C. glaucum* ont été prélevés sur le littoral méditerranéen occidental : trois sites au sud de la Tunisie (Ellouza, Sidi Mansour et Gargour), deux sur le littoral nord de la Tunisie (Bizerte et la Baie de Tunis), un site en Algérie dans la lagune d'Annaba et deux en Espagne (Ebro delta et Mar Menor) (figure. 5 et Tableau.1). Sur ces huit populations, une trentaine d'individus en moyenne ont été prélevés par site.



Figure 5 Carte de la Méditerranée occidentale et des sites de prélèvement pour l'étude de la structure génétique de la coque *C. glaucum*.

Tableau 1 Codes et coordonnées géographiques des sites échantillonnés

Code	Nom du site	Coordonnées géographiques
G	Gargour (Tunisie)	33°31' N, 10°42' E
SM	Sidi Mansour (Tunisie)	34°46' N, 10°49' E
E	Ellouza (Tunisie)	35°1' N, 11°22' E
T	Baie de Tunis (Tunisie)	36°54' N, 10°19' E
B	Bizerte (Tunis)	37°16' N, 9°53' E
An	Annaba (Algérie)	36°54' N, 7°46' E
MM	Mar Menor (Espagne)	37°45' N, 0°46' E
ED	Ebro Delta (Espagne)	40°40' N, 0°50' E

b. Choix du golfe de Gabès et des sites d'études pour la partie écotoxicologie

Le golfe de Gabès représente une des zones les plus productives de la Méditerranée occidentale. Il s'agit d'une zone qui borde les eaux de l'Est Tunisien (Zone d'Est – Golfe de Hammamet), de l'Italie (canal de Sicile), de Malte et de la Libye (figure 6). Cette zone occupe

donc un endroit privilégié au centre de la méditerranée. Il est caractérisé par des conditions climatiques, océanographiques et géomorphologiques uniques. Le bassin du golfe est peu profond, atteignant seulement 50 m sur 110 km au large des côtes. Ce modèle bathymétrique particulier rend le golfe très sensible aux conditions atmosphériques. En effet, le cycle annuel de la température est très marqué (de 13°C à 29°C). De plus, l'amplitude de la marée du golfe est également distincte avec des marées atteignant 2 m de hauteur (la plus haute en méditerranée). Le littoral du golfe est souvent caractérisé par des côtes sableuses, sablo-vaseuses ou même marécageuses. Ainsi, par ses conditions géomorphologiques et climatiques très favorables, le golfe de Gabès constitue l'une des zones les plus productives de la Méditerranée. En effet, cette zone couvre plus de 42% de la production halieutique nationale (Hattab et al. 2013). La flore est représentée par une abondance d'herbiers de phanérogames marins (*Posidoniaoceanica*, *Cymodoseanodosa*). Ces herbiers constituent une nurserie pour d'innombrables espèces en leur servant d'abri, de nourriture ou de lieu de ponte. Ils contribuent également à l'oxygénation de l'eau de mer, à la stabilité des fonds meubles et des rivages et à l'enrichissement de sédiment en matières organiques (Ketata et al. 2007). Cependant, plusieurs études ont montré que cette zone est en cours d'épuisement à cause de la surexploitation de certaines espèces et de l'activité socio-économique importante que connaît la région (urbanisme, agriculture, pêche, industrie, tourisme) en relation avec une croissance démographique notable et l'installation de grandes agglomérations industrielles (Sfax, Skhira, Gannouch, Gabès, Djerba et Zarzis) dont les rejets rarement traités sont déversés directement dans la plaine littorale. Plusieurs études faites dans cette région ont montré que la coque *C. glaucum* est parmi les espèces les plus abondantes de la région, mais ne présente malheureusement pas de valeur commerciale locale (Chaabouni-Laadhar 2009a ; Machreki-Ajmi 2009 ; Derbali et al. 2009 ; 2012). De plus, les travaux de Machreki-Ajmi (2009) ont permis de valider *C. glaucum* comme une espèce bio-indicatrice de pollution dans cette région. Tous ces résultats nous ont amené à choisir la région du golfe de Gabès pour étudier les réponses adaptatives de *C. glaucum* au stress naturel de la région à différents niveaux de l'organisation biologique. Notre objectif, pour cette partie, étant donc d'étudier sa réponse dans trois sites appartenant au golfe de Gabès et qui diffèrent par leur degré de contamination. Notre choix des sites d'études s'est basé sur trois critères principaux :

- Facilité d'accès
- Localisation par rapport aux rejets industriels et urbains
- Abondance de l'espèce *C. glaucum* et facilité de son échantillonnage

Dans l'étude préliminaire qui consiste à comparer l'état de contamination des différents sites du golfe de Gabès, nous avons choisi six sites plus au moins éloignés des sources de contamination. Après cette partie préliminaire, nous avons sélectionné trois sites en se basant sur un dosage du Cd et du Pb *in toto* sur des coques issues des six sites. Parmi les trois sites retenus, un sera considéré comme référence, un deuxième comme moyennement contaminé et un troisième comme fortement contaminé. Ces trois sites seront ainsi retenus pour la suite de l'étude écotoxicologique.

- **Site Ellouza**

Situé à 45 km au nord de la ville de Sfax (Figure 6 et Tableau 2), ce site semble être éloigné de toute source de contamination urbaine ou industrielle. Des études récentes ont montré également que ce site contenait de très faibles teneurs en métaux (Barhoumi et al. 2009 ; Kessabi et al. 2010).

- **Site Sidi Mansour**

Situé à 12 Km au nord de la ville de Sfax (Figure 6 et Tableau2), la frange littorale est soumise à une urbanisation assez dense. C'est une zone de pêche active mais peu productive en comparaison avec les régions situées vers le sud. Le sédiment superficiel est fortement contaminé par le plomb (Pb), le cadmium (Cd) et le chrome (Cr) (Illou 1999).

- **Site Kerkennah (Station Sidi Youssef)**

Situé à 20 km au large de la ville de Sfax (Figure 6 et Tableau 2), il est éloigné de tous les types de rejet. La frange littorale est marquée par un sédiment vaseux, mobile et par une richesse floristique et faunistique. Cet endroit représente une zone de pêche active.

- **Site Gargour Souissi**

Situé à 15 km au sud de la ville de Sfax (Figure 6 et Tableau 2), il est affecté par une activité industrielle intense et par des effluents qui contiennent de fortes concentrations en métaux (Hamza-Chaffai et al. 2003). La richesse de ce site en sels nutritifs et surtout en phosphate apporté par les rejets en phosphogypse amène à une production phytoplanctonique massive caractéristique de cette région (Hamza-Chaffai et al. 2003).

- **Site Mahrès**

Mahrès est une ville côtière située à 30 kilomètres au sud de Sfax (Figure 6 et Tableau 2). Cette ville est connue pour la culture de l'olivier, l'extraction de l'huile d'olive et la pêche. Ainsi, la plus grande oliveraie d'Afrique se situe au sein de la délégation de Mahrès. Ce site est éloigné de la zone industrielle et est très riche en *C. glaucum* (Ladhar Chaabouni 2008).

- **Site Nakta**

Situé à 24 km au sud de la ville de Sfax (Figure 6 et Tableau 2), c'est une côte sableuse avec présence de dunes bordières. Ce site est très sollicité durant la période estivale par la population de la région de Sfax. De ce fait, un réseau de surveillance assuré par le service d'hygiène de Sfax (ministère de la santé) a été instauré pour suivre la qualité des eaux de baignade dans cette zone (Serbaji 2000).



Figure 6 Localisation des sites échantillonnés dans la région du golfe de Gabès

Tableau 2 Codes et coordonnées géographiques des sites échantillonnés

Code	Nom du site	Coordonnées géographiques
E	Ellouza	35°1' N, 11°22' E
SM	Sidi Mansour	34°46' N, 10°49' E
G	Gargour (Bayadha)	33°31' N, 10°42' E
K	Kerkennah (Sidi Youssef)	34° 37' N, 11°02' E
N	Nakta	34°34' N, 10°35' E
M	Mahrès	34°31' N, 10°24' E

c. Choix des marqueurs biologiques

✓ Pour l'étude de la structure génétique de *Cerastoderma glaucum*

L'étude de la structure génétique des populations nécessite en général une combinaison de marqueurs moléculaires mitochondriaux et nucléaires (Bercquet 2011 ; Plouiez 2009 ; Tarnowska 2010 ; Nikula et Vainola 2003 ; Oyieyi 2010). En effet, chacun de ces deux types de marqueurs présente ses propres avantages indispensables pour l'étude de la structure génétique des populations. En plus les incongruences révélées dans la littérature entre les résultats des marqueurs mitochondriaux et nucléaires dans l'étude de la structure génétique des populations (Tarnowska 2010 ; Nikula et Vainola 2003) rend cette combinaison indispensable. Le génome mitochondrial présente une grande conservation entre taxons, ce qui facilite la comparaison des fragments homologues. De plus, ce génome se transmet généralement de façon uni-parentale. Ce génome est ainsi plus sensible à la dérive génétique et révèle d'autant mieux les événements démographiques surtout pour les populations. Enfin, sa vitesse d'évolution élevée permet d'étudier les relations interspécifiques entre espèces proches mais surtout intra-spécifique (Bercquet 2011). Comme marqueur mitochondrial, nous avons utilisé pour cette étude un fragment du gène codant la première sous-unité de la Cytochrome-c Oxydase (COI). Notre choix de ce gène se justifie par plusieurs raisons :

- Comme tout marqueur mitochondrial, ce marqueur est suffisamment variable pour étudier la structure génétique des populations ;
- Il a été retenu dans la cadre du consortium international « Barcode of Life » comme marqueur d'identification spécifique ;
- Ce gène ne comporte pas d'introns, ce qui limite les problèmes d'alignement des séquences ;
- Comme tout gène mitochondrial, ce gène est présent en plusieurs copies rendant son amplification plus facile ;
- Comme tout marqueur mitochondrial, ce gène est à transmission uni parentale et ne fait pas l'objet de recombinaison entre les différentes copies présentes dans une mitochondrie.

Un certain nombre de marqueurs sont aussi disponibles pour détecter le polymorphisme de l'ADN nucléaire. Parmi ces marqueurs, le marqueur Internal Transcribed Spacer 1 «ITS1» a été choisi comme marqueur nucléaire dans ce travail. Ce choix se justifie par les caractéristiques suivantes :

- Ce marqueur correspond à des régions non codantes présentant un taux élevé de polymorphisme (Bachy 2012) ;
- La présence des régions flanquantes conservées (18S et 5.8S) aux deux extrémités 5' et 3' facilite la définition des amorces qui permettent l'amplification des régions ITS1 ;
- Des variations des régions ITS1 inter- et intra-spécifique et inter- et intra-individuelle ont été détectés chez plusieurs animaux (Shen et al. 2012) ;
- Ce marqueur a été démontré adéquat pour l'étude de la structure génétique des populations dans plusieurs études (Callejón et al. 2012 ; Tatonova et al. 2012).

✓ **Pour l'étude de la réponse adaptative de *C. glaucum* en milieu naturel**

Les marqueurs biologiques utilisés pour cette étude concernent les différents niveaux de l'organisation biologique. L'échelle moléculaire représentée par la détermination de l'expression des gènes au niveau ARN, peut refléter une réponse relativement précoce. De plus, l'étude de la transcription des gènes de réponse au stress peut permettre de mieux comprendre le mode d'action des toxiques et les cibles cellulaires d'un contaminant. Cependant, le génome de *C. glaucum* est loin d'être complètement séquencé. Durant cette étude nous avons réussi à séquencer en partie certains gènes de *C. glaucum* impliqués dans différentes voies métaboliques telles que la détoxification des métaux et des xénobiotiques (métallothionéine, MT ; transporteurs à ATP Binding Cassette, ABCB1), la défense contre le stress oxydant (superoxyde dismutases, MnSOD et CuZnSOD ; catalase, CAT) et le stress général (protéines de choc thermique, HSP70). Pour les altérations mitochondriales, la séquence de la cytochrome-c oxydase (COI) était déjà présente dans les banques de données (HQ432846). La réponse transcriptionnelle de ces différents gènes a été analysée par PCR quantitative sur des coques prélevées en milieu naturel sur trois sites appartenant au golfe de Gabès et qui diffèrent par leurs degrés de contamination.

Les niveaux cellulaires et tissulaires sont aussi très importants à étudier puisque le dysfonctionnement cellulaire peut conduire à des altérations aux niveaux supérieurs de l'organisation biologique (ex : tissu, organe, individu, physiologie, comportement). Dans ce sens, l'étude du cycle reproducteur de *C. glaucum* a été analysé par histologie qualitative en milieu naturel sur trois sites qui diffèrent par leur degrés de contamination.

Au niveau organe, les biomarqueurs des réserves énergétiques (glycogène, lipide et protéines), le malondialdéhyde (MDA) et l'acétylcholineestérase (AChE) ont été analysés dans différents organes de la coque *C. glaucum* prélevés sur les sites-cibles. Le niveau individuel permet par

la suite, d'obtenir des informations plus globales sur le statut physiologique de l'individu soumis à un stress. Trois paramètres physiologiques ont été analysés au niveau individuel : le test de stress on stress, le sex-ratio et l'indice de condition.

L'analyse simultanée de ces différents biomarqueurs pris aux différentes échelles de complexité (de la molécule à la population) permet d'établir des liens entre chaque niveau de cette complexité, le but final étant donc de décrire les conséquences écologiques des réponses en milieu naturel aux plus faibles niveaux de l'organisation.

d. Choix des organes

Pour étudier la structure génétique des populations de *C. glaucum*, nous avons travaillé sur le muscle du pied. Le choix de cet organe se justifie par plusieurs travaux étudiant la structure génétique de *C. glaucum* et utilisant le pied comme organe pour l'extraction d'ADN (Tarnowska et al. 2010 ; Tarnowska et al. 2012 ; Nikula et Vainola 2003 ; Ladhar Chaabouni 2009).

Pour l'étude préliminaire qui consiste à sélectionner trois sites à partir de six sites sur la région du golfe de Gabès, le dosage des métaux a été effectué *in toto* chez 20 coques issues des différents sites. Les trois sites Ellouza, Sidi Mansour et Gargour ont été retenue comme site de référence, moyennement contaminé et contaminée respectivement. 30 échantillons de coques prélevés à partir de chaque site (Ellouza, Sidi Mansour et Gargour) ont servi à l'étude de l'expression des gènes sur les branchies et le dosage des métaux (Cd, Cu, Zn et Ni) sur le reste des tissus. Ce travail par individu a pour but de permettre une analyse en composante principale. Le choix des branchies comme organe pour l'étude de l'expression génique se justifie par le fait qu'elles constituent les principaux sites d'échanges avec l'environnement chez les organismes aquatiques. De plus, cet organes a été largement utilisé pour étudier l'expression des gènes chez de nombreux invertébrés marins et les résultats obtenus ont montré une grande capacité à synthétiser les protéines (Al Kaddissi et al. 2012 ; Marigomez et al. 2002 ; Navarro et al. 2011 ; Paul-Pont et al. 2010).

Pour la partie histologique, l'objectif était d'étudier le cycle reproducteur de *C. glaucum* dans trois sites différents par leur niveau de contamination. Nous avons donc utilisé les gonades comme organe cible. 15 gonades ont donc été utilisées pour cette étude et 4 prélèvements bimensuels ont été effectués à la même période (Octobre-Décembre 2010) sur les trois sites retenus. Cette étude a permis de surveiller les paramètres suivants : les stades reproducteurs, le déroulement de la gamétogenèse, l'indice de condition et l'indice de maturité. Dans la littérature, l'étude du cycle reproducteur a été toujours accompagnée par l'étude de la gestion

des réserves énergétiques (Mathieu et Lubet 1993 ; Lemaire et al. 2006 ; Dridi et al. 2007). Nous avons donc décidé au cours de ce travail de mesurer les réserves énergétiques (glycogène, lipide et protéines) en parallèle avec le déroulement du cycle reproducteur dans la gonade. Un total de 20 échantillons a été utilisé pour l'étude biochimique. La glande digestive a servi au dosage du MDA, les branchies au dosage de l'acétylcholinestérase, la gonade au dosage des réserves énergétiques (glycogène, lipides et protéines). Pour l'acétylcholinestérase, nous avons choisi d'en mesurer l'activité dans les branchies en se basant sur les travaux de Bocquené et al. (1997), qui ont démontré que le maximum d'activité de cette enzyme a été enregistré dans les branchies des moules. Nous avons choisi de mesurer les malondialdéhydes dans les glandes digestives en se basant sur des travaux sur les moules (Garrigues et al. 2002) et sur des coques (Marcheki Ajmi 2009), démontrant l'importance de la glande digestive comme organe de stockage de la MDA.

2. Approche *in vivo*

a. Choix des contaminants

Le but de notre programme de recherche est d'évaluer la toxicité de deux contaminants. Un mélange de contaminants (les effluents industriels) et un contaminant pur (le cadmium). Nous avons choisi les effluents afin d'être le plus proche possible du milieu naturel. En effet, les effluents industriels sont généralement déversés en milieu naturel avec ou sans traitement préalable et vont entrer en contact avec les organismes aquatiques. En procédant à une expérimentation avec les effluents, la toxicité de ce contaminant peut donc être évaluée au plus proche du milieu naturel. Le choix du cadmium se justifie par le fait qu'il soit un contaminant environnemental majeur à l'échelle mondiale (Al Kaddissi 2012 ; Véronique 2005) et dans la région du golfe de Gabès où la collecte des échantillons de coques a été réalisée (Hamza- Chaffai et al. 1996 ; 2000 ; 2003 ; Smaoui Damak et al. 2003). De plus, plusieurs études ont montré que le cadmium pose de sérieux problèmes écologiques surtout par sa rémanence et sa toxicité élevée (Al Kaddissi et al. 2012 ; Chora et al. 2009). Le fait d'évaluer cette toxicité dans des conditions contrôlées est donc d'un grand intérêt pour la santé des organismes marins et par conséquent celle des êtres humains.

b. Choix des concentrations

Dans l'expérience de contamination par le Cd, nous avons choisi deux concentrations, une faible (50µg/l) et une forte concentration (5 mg /l) pendant 1 à 18 jours. La concentration de 50µg/l est loin d'être environnementale. Elle est, en effet, 100 fois plus importante que celle rencontrée dans l'environnement marin tunisien où la collecte de nos coques a été effectuée

(Barhoumi et al, 2009). Notre choix sur cette concentration se justifie par le fait qu'elle a été déjà testée chez *C. glaucum* (Ladhar-Chaabouni et al. 2008). Ces derniers travaux ont montré qu'à cette concentration, le taux maximum de la protéine type métallothionéine est synthétisé chez la coque après 15 jours d'exposition. De plus, cette concentration a été largement utilisée dans des conditions contrôlées chez plusieurs organismes marins : les crustacés (Al Kaddissi 2012), la palourde *Ruditapes decussatus* (Chora et al. 2009 ; Serafim et Bebiano 2007), les gastéropodes (Latire et al. 2012) et le bivalve Antarctique *Laternula elliptica* (Choi et al. 2007). Le choix de notre deuxième concentration 5mg/L se justifie par le fait qu'on a voulu tester la réponse (surtout au niveau moléculaire) de la coque à une forte contamination par le cadmium. De plus, dans les pays en voie de développement, il est possible de trouver des zones très polluées où la concentration en Cd peut atteindre 1mg/l (Belabed et al. 1994). Il a été aussi démontré au cours de ce travail que la concentration de certains effluents en cadmium tels que les effluents déversés par la SIAPE (société industrielle tunisienne de transformation des phosphates bruts) peut contenir des teneurs en Cd de l'ordre de 1mg/L. Toutes ces données nous ont amenées à tester cette concentration chez ce bivalve, chose qui à notre connaissance n'a pas été décrite chez d'autres bivalves mais plutôt chez des gastéropodes (Latire et al. 2012), des poissons (Atli et Canli 2007 ; 2010 ; 2013) et des crustacés (Al Kaddissi 2012 ; Gao et al. 2012). Pour la deuxième expérimentation par les effluents, la même concentration de 1% a été utilisée pour les deux effluents F1 et F2. Cette concentration a été utilisée suite à des travaux antérieurs (comm pers) qui ont démontré que c'est une concentration qui permet de maintenir les coques dans des conditions contrôlées optimales de vie.

c. Choix des marqueurs de contamination

Les marqueurs biologiques utilisés pour cette étude concernent, à nouveau, les trois niveaux de l'organisation biologique : moléculaire, individuel et organe. Au niveau moléculaire, les gènes étudiés sont les mêmes que ceux utilisés dans la partie *in situ* et concernent différents types de réponse au stress. La réponse transcriptionnelle de ces différents gènes a été analysée sur des coques exposées au cadmium et aux effluents industriels. Par leur fonction, ces gènes sont parmi les premiers candidats à réagir en réponse au stress et des modifications importantes dans leur expression suite à un stress ont été rapportées chez plusieurs invertébrés (Achard-Joris et al. 2006 ; Al Kaddissi et al. 2012 ; Ivanina et al. 2008a ; Ivanina et al. 2008b ; Navarro et al. 2011). Ainsi l'analyse de leur expression à l'échelle moléculaire permet d'avoir une réponse précoce sur les effets que peut avoir chaque contaminant. Au niveau individuel,

le test de «stress on stress» et l'indice de condition ont été utilisés. Ces deux paramètres permettent de suivre l'état physiologique de l'animal tout au long des expérimentations et de détecter toute perturbation à cette échelle. Au niveau organe, le dosage de bioaccumulation des métaux a été effectué afin de compléter les réponses aux niveaux moléculaires et individuels.

d. Choix des organes

Deux parties majeures ont été utilisées pour cette étude, les branchies et le reste de l'animal (muscle adducteur, glande digestive, manteau et siphons). Les branchies ont été utilisées pour étudier la réponse transcriptionnelle des différents gènes alors que le reste de l'animal a été utilisé pour les tests de bioaccumulation des métaux lourds. Notre choix des branchies pour étudier l'expression des gènes se justifie par le fait qu'elles constituent les principaux sites d'échange chez les organismes aquatiques. De plus, ces organes sont en contact direct avec l'eau donc dans le cas d'une contamination par voie directe comme notre cas, ces tissus seront les premiers à subir les effets de cette contamination. Les autres organes de la coque (muscle adducteur, glande digestive, manteau et siphons) ont servi au dosage des métaux lourds. Ce choix d'analyser la bioaccumulation des métaux lourds sur le reste de l'animal se justifie par les travaux de Machreki-Ajmi et al. 2006, qui ont démontré une accumulation importante de certains métaux dans ces organes chez *C. glaucum*. De plus, afin de mettre en évidence la variabilité inter-individuelle chez les coques exposées aux mêmes conditions, nous avons choisi de travailler par individu. Ce type d'étude nous permet entre autres de pouvoir faire une analyse en composantes principales (ACP). Cette analyse a pour objectif de mettre en évidence des relations de corrélations entre les différentes variables (expression des différents gènes, bioaccumulation et indice de condition).

Chapitre II

Matériels et méthodes

A. Techniques de dosage des métaux

1. Traitement des échantillons

1.1 Echantillons biologiques

Dans ce travail, à part l'étude préliminaire où les résultats de dosage des métaux sont exprimés en poids frais, toutes les autres analyses de concentrations métalliques dans les échantillons biologiques sont exprimées en fonction du poids sec puisque travailler avec des échantillons secs permet de s'affranchir des problèmes des teneurs en eau variables d'un individu à un autre. Afin de détruire et solubiliser respectivement les constituants organiques et minéraux de l'échantillon, nous avons choisi la minéralisation par attaque acide. Les échantillons sont minéralisés dans l'acide nitrique à 65%. Le rapport entre la masse d'échantillon et le volume d'acide doit être de l'ordre de 100 mg pour 2 ml d'acide. Les échantillons et l'acide sont mis dans des tubes en verre correctement lavés (HCl 10%) et placés dans des blocs chauffants 2 h à une température de 65°C puis le chauffage a été poursuivi à 90°C jusqu'à ce que la solution devienne claire et que les vapeurs nitreuses rousses disparaissent. Les minéralisats sont ensuite récupérés dans des tubes gradués et complétés jusqu'au volume désiré avec de l'eau désionisée.

1.2 Echantillons de sédiment

Pour les sédiments, des échantillons de 0,5 g (lyophilisés) sont placés dans des tubes en verre préalablement lavés à l'acide et subissent une minéralisation à l'aide de 5 ml d'acide nitrique (HNO₃) et 3 ml d'acide chlorhydrique (HCl). Le résidu sec est repris dans 10 ml d'acide chlorhydrique (Geffard 2001).

1.3 Echantillons des Effluents

Pour les effluents, des échantillons de 5 ml de chaque effluent (F1 et F2) sont placés dans des tubes en verre préalablement lavés à l'acide et subissent une minéralisation à l'aide de 2 ml d'acide nitrique concentrée (65%).

2. Techniques analytiques utilisées

2.1 Dosage du Cadmium, Cuivre et Nickel par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE) (mode sans flamme).

Le dosage du Cd, Cu et Ni dans les échantillons a été effectué par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique (Spectr AA Zeeman 220; équipée d'un correcteur de bruit de fond à effet Zeeman – Figure 7) qui présente des limites de quantification de 0,1, 0,3 et 0,24 µg.L⁻¹ respectivement pour le Cd, le Cu et le Ni. Le principe de ce dosage repose sur une mesure de l'échantillon ramené à l'état d'atomes libres (atomisation). L'échantillon

liquide est aspiré par un passeur automatique et introduit dans l'appareil puis porté à une température de 3273°K pour que les éléments présents se retrouvent sous forme ionisée. L'atomisation est réalisée sous atmosphère inerte dans un dispositif d'atomisation électrothermique sans flamme appelé « four graphite ». Le four est balayé par un flux d'argon (gaz inerte) qui protège les éléments de l'oxydation. Une lampe à cathode creuse émet un rayonnement spécifique de l'élément étudié (228 nm pour le Cd, 324 pour le Cu et 232 pour le Ni) qui traverse le tube graphite dans lequel la solution est déposée. Des échantillons certifiés (TORT-2, NRC211 CNRC) ont été analysés afin de contrôler et valider la qualité des dosages. Les résultats obtenus étaient de l'ordre de $25,6 \pm 0,7$, 110 ± 2 , $2,4 \pm 0,1$ et 190 ± 8 mg/kg pour le Cd, le Cu et le Ni comparé à des valeurs certifiées de l'ordre de $26,7 \pm 0,6$, 106 ± 10 et $2,5 \pm 0,2$ pour le Cd, le Cu et le Ni respectivement. Comme une contamination par un métal aurait pu survenir lors de la préparation des échantillons, nous avons analysé des blancs représentatifs des réactifs et de la procédure de préparation.

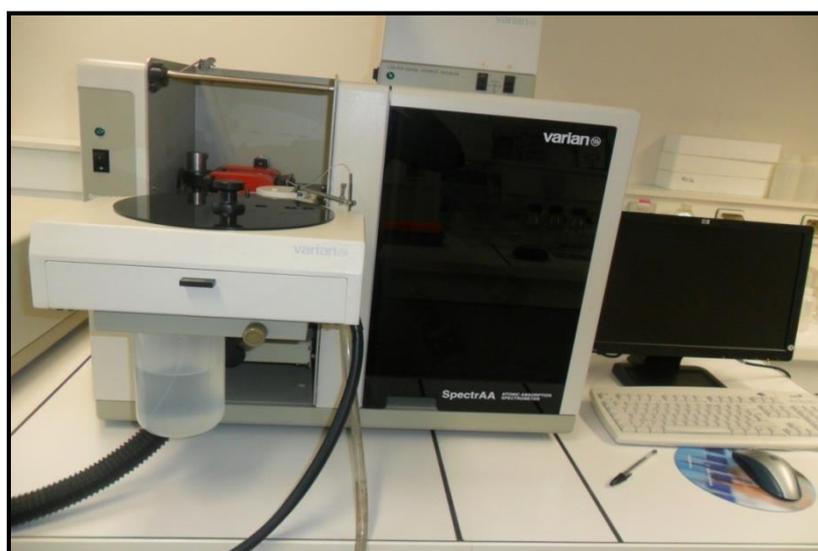


Figure 7 Photographie d'un spectrophotomètre d'absorption atomique électrothermique (SAAE) (mode sans flamme).

2.2 Dosage du Zinc par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE) (mode flamme).

Le zinc est analysé par spectrométrie d'absorption atomique (AASE) mode flamme (Varian AA 240 FS FastsequentialAtomicspectrophotometer– Figure 8). Le principe est le même que pour le dosage spectrophotométrique mode sans flamme. La seule différence est dans le dispositif d'atomisation qui est dans ce cas une flamme air acétylène au lieu d'un four en graphite. La correction du bruit de fond spectral pour la longueur d'onde spécifique du zinc est de l'ordre de 213,9 nm et s'opère grâce à une lampe au deutérium. La limite de détection

du zinc est de l'ordre de $10\mu\text{g/L}$. Des échantillons certifiés (TORT-2, NRC211 CNRC) ont été analysés afin de contrôler et valider la qualité des dosages. Les résultats obtenus pour le Zn étaient de l'ordre de $190 \pm 8 \text{ mg/kg}$ contre des valeurs certifiées de l'ordre de $180 \pm 6 \text{ mg/kg}$.



Figure 8 Photographie d'un spectrophotomètre d'absorption atomique électrothermique (SAAE) (mode flamme).

2.3 Dosage des sédiments et des effluents par spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES)

La spectrométrie d'émission atomique est une méthode photométrique utilisant un plasma (gaz) maintenu à une température de l'ordre de 8000°K (Figure 9). A cette température, les atomes de l'échantillon sont excités et émettent des radiations électromagnétiques (photons) caractéristiques. Selon le modèle de Bohr, les électrons constituent autour du noyau un nuage électronique, réparti en couches et sous-couches, dont le nombre est défini pour chaque atome. A chacune de ces sous-couches est associé un niveau d'énergie. En règle générale, plus la sous-couche est éloignée du noyau, plus son niveau d'énergie est élevé. Lorsqu'un atome reçoit de l'énergie suite à une collision avec une autre particule ou à l'absorption d'un rayonnement, il va absorber cette énergie, ce processus correspond à l'excitation. Cette excitation se traduit par un déplacement d'électron vers les sous-couches d'énergie supérieure. Pour retrouver un état stable, l'électron aura tendance à retrouver le niveau de départ. Ce phénomène se traduit par l'émission de photons de longueur d'onde caractéristique de chaque élément (spectre de raies d'émission). Ainsi l'élément va pouvoir être quantifié en fonction du nombre de photons puisqu'il est proportionnel au nombre d'atomes de l'élément considéré. Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet un dosage multi-éléments. Pour cette étude, sept éléments métalliques ont été utilisés (Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb et Zn). A part le Pb

pour lequel une seule raie d'émission a été utilisée, deux raies ont été utilisées pour tous les autres éléments métalliques (Tableau 3). Après filtration, les minéralisats de sédiment et des effluents sont introduits dans l'ICP-AES (Thermo Scientifici CAP 6000 series ICP spectrophotometer) sous forme liquide. Ils sont pris en charge par une pompe puis transformés en aérosol par un flux d'argon dans un nébuliseur. Ils sont ensuite transportés dans le plasma d'argon par un injecteur où ils subissent différentes étapes d'atomisation et d'ionisation conduisant à une excitation des atomes et des ions. Une gamme d'étalonnage a été effectuée au préalable pour chaque élément à partir des solutions mères (Tableau 3).



Figure 9 Photographie d'un ICP-AES ThermoScientifici CAP 6000 series ICP Spectrophotometer

Tableau 3 Synthèse des résultats pour les paramètres caractéristiques de la méthode d'analyse par ICP-AES.

Elément	Limite de détection ($\mu\text{g/L}$)	Limite de quantification ($\mu\text{g/L}$)	Concentration de la solution mère (mg/L)
Cd	0,082	0,275	10
Cr	0,215	0,717	50
Cu	0,238	0,457	10
Mn	0,041	0,130	10
Ni	0,190	0,643	50
Pb	0,552	1,840	100
Zn	0,056	0,187	10

B. Techniques histologiques

1. Fixation de la gonade

Le but essentiel de la fixation est d'empêcher l'autolyse des tissus et de les maintenir dans un état le plus proche possible du vivant. Le mélange fixateur utilisé au cours de ce travail est le liquide de Bouin. Ce liquide renferme de l'acide picrique, de l'acide acétique et du formol (la durée de fixation est de 48h). L'acide picrique précipite les protéines et dépolymérise les acides nucléiques. L'acide acétique est un bon fixateur des chromosomes, il détruit le chondriome, gonfle les tissus mais ne les durcit pas. Le formol est un réducteur qui ne précipite pas les protéines mais fixe les lipides complexes. C'est un fixateur universel qui prépare très bien les tissus et pénètre assez bien pour que les pièces puissent être relativement épaisses.

2. Inclusion

L'inclusion est l'imprégnation des tissus par un milieu plastique qui doit être le plus neutre possible chimiquement. C'est la paraffine liquide qui est généralement utilisée. L'intérêt de la paraffine est d'être chimiquement neutre, soluble dans de nombreux solvants et facile à couper au rasoir. La paraffine n'est pas miscible à l'eau, les pièces fixées doivent donc subir une étape de déshydratation qui correspond au passage des gonades dans des bains successifs d'alcool de concentration croissantes. L'alcool étant non miscible à la paraffine, une étape d'éclaircissement est alors nécessaire. Cette étape correspond à l'utilisation d'un agent intermédiaire qui est à la fois soluble dans l'alcool et dans la paraffine. Dans ce travail nous avons utilisé le toluène comme agent éclaircissant. Les étapes de déshydratation et d'éclaircissement sont effectuées dans un automate nommé « Technicon » (Shandon, Sitadel) (Figure 10) et sont décrites dans le Tableau 4. Le passage dans le liquide intermédiaire (toluène) est ensuite suivi par une étape d'inclusion puis de mise en bloc.



Figure 10 Photographie du Technicon (Shandon, Sitaldel)

Tableau 4 Etapes de déshydratation, d'éclaircissement et d'inclusion.

Réactif	Durée d'immersion
Formol	2h30
Alcool 70 °	1h30
Alcool 80°	1h30
Alcool 95°	1h30
Alcool 95°	1h30
Alcool 100°	2h
Alcool 100°	1h30
Toluène	1h30
Toluène	2h
Paraffine	2h30
Paraffine	2h
Inclusion en bloc	

3. Coupes

Les échantillons inclus sont débités en série de coupes de 3 μm d'épaisseur au moyen d'un microtome type HM 315 (Figure 11). Les rubans ainsi obtenus sont directement récupérés sur des lames de verres immergées d'albumine liquide. Les références de chaque échantillon sont notées en haut de la lame avec la pointe d'un diamant. Ensuite, les lames sont posées sur une plaque chauffante pour être étalés sans formation de plis. Ces lames seront par la suite placées dos à dos dans des paniers en verre et mises à l'étuve à 37°C pendant une nuit. Cette étape

permet d'éliminer l'excès de paraffine et de coller les coupes sur les lames.



Figure 11 Photographie du microtome mécanique (type HM 315)

4. Déparaffinage réhydratation et coloration des tissus

Le déparaffinage consiste à éliminer le milieu d'inclusion. Il s'effectue après passage des paniers, contenant les lames en verre, dans deux bains de toluène de 60 mn chacun. La réhydratation consiste à faire passer les lames dans des bains d'éthanol de concentration décroissante (100°, 95°, 70°) d'une durée de 3 à 5 mn. Ces lames seront ensuite imprégnées dans un bain d'eau distillée (3 à 5 mn) permettant ainsi l'hydratation des tissus. Les coupes sont ensuite colorées dans des bains successifs de colorants : l'Hématoxyline pour la coloration des noyaux, l'Eosine pour la coloration des cytoplasmes et des tissus musculaires, l'acide phosphomolybdique pour éliminer l'excès d'Eosine et enfin le vert lumière pour la coloration des cellules vésiculaires, des membranes cellulaires et de certains organes comme l'estomac ou les intestins (Tableau 5).

Tableau 5 Réhydratation et coloration des tissus

<i>Réactif</i>	<i>Durée d'immersion (minutes)</i>
Toluène	60
Toluène	60
Éthanol 100°	5
Éthanol 100°	5
Éthanol 95°	5
Éthanol 70°	5
Eau distillée	5
Hématoxyline de Groat	1
Eau courante	passage
Eau distillée	passage
Éosine	8
Acide phosphomolybdique	1 minute maximum
Vert lumière	1
Éthanol 100°	1
Éthanol 100°	1
Toluène	5

5. Le montage

L'étape de montage est nécessaire à la protection des coupes colorées qui ne supportent pas le dessèchement. Il faut donc interposer entre lame et lamelle un milieu de montage qui doit répondre à certaines exigences :

- Etre transparent pour satisfaire les conditions d'observation ;
- Assurer une meilleure conservation des préparations ;
- Assurer l'adhérence de la lamelle sur la lame.

Répondant à ces exigences, le Pertex est utilisé comme milieu de montage pour cette étude. Une étape de séchage à l'étuve à une température de 54°C est enfin réalisée pendant une nuit.

6. Analyse d'image

Pour les femelles et afin de mieux décrire la croissance des ovocytes durant le déroulement du cycle reproducteur, les diamètres de 100 ovocytes choisis au hasard ont été mesurés pour chaque femelle dont la gonade était au début, au cours ou en fin de développement. Les mesures ont été réalisées avec un microscope optique muni d'une caméra et du logiciel de traitement d'images (Nikon Eclipse 80i couplé à une caméra Nikon DXM1200-C).

Pour les mâles, seule une analyse qualitative basée sur l'observation et l'interprétation des coupes histologiques est réalisée.

Les photographies ont été prises pour présenter l'évolution morphologique des gonades mâles et femelles.

7. Identification des stades reproducteurs et calcul de l'indice de maturité

Une fois les différents stades de développement identifiés, la maturation sexuelle saisonnière est représentée pour chaque mois en termes de pourcentage relatif de chaque stade. Un indice de maturité (IM) est aussi calculé pour chaque mois. Cet indice est égal à la somme des différents coefficients attribués à chaque stade de développement, pondéré par le pourcentage d'individus pour chaque stade. Des numéros de 1 à 6 ont été attribués pour les mâles et les femelles. L'indice de maturité (IM) est ainsi déterminé pour chaque mois selon la formule suivante :

$$IM = 1a_1 + 2a_2 + 3a_3 + \dots + n a_n$$

$a_1, a_2, a_3, \dots, a_n$ représentent les pourcentages d'individus pour chaque stade (Smaoui-Damak, 2005).

C. Dosages biochimiques

1. Dosage des protéines

La méthode de Bradford (1976) est une méthode d'analyse spectroscopique utilisée pour mesurer la concentration des protéines en solution. C'est un dosage colorimétrique basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (complexification) avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. Dans un premier temps, une courbe d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) à 200 µg/mL. Une série de solutions filles de concentrations variables entre 0 à 15 µg/mL est préparée à partir de cette solution mère. Dans un deuxième temps les échantillons sont homogénéisés dans un tampon phosphate Na₂HPO₄ (0,1M, PH=7) puis centrifugés pendant 60 mn, à 25.000g et à 4°C. Les concentrations en protéines totales ont été déterminées dans les surnageants. Un volume de 10µL de surnageant est mélangé à 200 µL du réactif Bradford (Biorad) et 800 µL d'eau distillée, ce qui donne un mélange de coloration bleue, mesurable par un spectrophotomètre (Jenway 6305 UV/VIS) à 595 nm. Un blanc représentatif des réactifs et de la procédure de préparation est dosé en même temps que les échantillons.

2. Dosage du glycogène

Il s'agit d'un dosage colorimétrique dont le principe est basé sur la formation d'une coloration

verte, stable et absorbante à 630 nm. Cette coloration verte est obtenue dans un milieu acétique, à chaud et en présence du réactif ortho-toluidine (Sasaki et al. 1972). Les échantillons sont tout d'abord broyés à froid en présence d'acide trichloracétique (TCA 20%). Le broyat est ensuite centrifugé (8000 g ; 5mn) à température ambiante, puis le surnageant contenant le glycogène est extrait et précipité par de l'alcool 95° à chaud. Ensuite, après une deuxième centrifugation (5000 g, 5min) à température ambiante, le culot de glycogène récupéré est dissous dans 2,5 ml d'eau distillée et hydrolysé en glucose en présence d'acide chlorhydrique (30%) dans un bain marie bouillant pendant une heure. Le glucose ainsi libéré est dosé par la méthode colorimétrique décrite par Sasaki et al. (1972).

3. Dosage des lipides

La méthode utilisée est celle de Frings et al. (1972). C'est une méthode colorimétrique basée sur la formation d'un complexe chromogène de couleur rose absorbant à 540 nm après réaction des lipides avec la vanilline. La réaction se développe en milieu acide en présence d'acides sulfurique et phosphorique. Dans un premier temps, une courbe d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution mère d'huile d'olive à 10 mg/mL. Une série de solutions filles de concentration variable entre 1 à 10 mg / mL est préparée à partir de cette solution mère. Dans un deuxième temps, les tissus ont été homogénéisés à froid dans le tampon phosphate Na_2HPO_4 (0,1M, PH=7). Un volume de 0,2 μL d'homogénat inconnu, de standard ou d'eau déionisée (blanc) est mélangé à 200 μL d'acide sulfurique concentré. Après incubation du mélange dans un bain-marie bouillant (10 mn), 10 ml de réactif de phosphovanilline ont été ajoutés. Les absorbances ont été mesurées à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway 6305 UV/VIS), après incubation à 37°C (15 mn). Les concentrations en lipides des échantillons ont été déterminées à partir de la courbe d'étalonnage.

4. Dosage du malondialdéhyde

Le MDA est dosé par une méthode colorimétrique en présence de l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection des molécules de MDA présentes dans les échantillons biologiques se base sur la réaction au cours de laquelle deux molécules de TBA réagissent avec une molécule de MDA ce qui entraîne la formation d'un chromogène rouge dont l'absorption maximale est comprise entre 312 et 535 nm (Sunderman et al. 1985). L'intensité de la coloration rouge augmente avec la concentration en MDA. Il faut noter que le complexe MDA-TBA n'est stable que pendant 3 heures à l'abri de la lumière et à température ambiante (Bouaziz 2002). Le protocole de dosage commence par une homogénéisation des glandes digestives à froid dans du KCl 150 mM à raison de 1g de tissu dans 10 ml de KCl (chlorure de potassium). Les

broyats des glandes digestives sont ensuite immédiatement congelés à -20°C afin d'éviter la dégradation du MDA. Une gamme d'étalonnage a été établie à partir d'une solution mère de TEP (1,1,3,3-Tetraéthoxypropane, 8,26 mM).

5. Dosage de l'acétylcholinestérase

La méthode utilisée est dérivée de celle d'Ellman (Ellman et al. 1961), adaptée au lecteur de microplaques par Bocquené et Galgani (1998). L'acétylcholinestérase contenue dans les tissus va réagir avec l'acétylthiocholine (ASCh) en libérant l'acide acétique et la thiocholine (Sch). Cette dernière réagit à son tour avec le DTNB (5-5'-Dithio-Bisnitrobenzoate) en donnant du TNB produit de couleur jaune qui absorbe à 412 nm et dont la concentration est proportionnelle à la quantité d'enzymes présentes dans le milieu. La réaction peut se schématiser ainsi :



Le mélange réactionnel est incubé pendant deux minutes à 25°C et l'hydrolyse du substrat est appréciée à l'aide d'un lecteur en microplaque à une longueur d'onde de 412 nm et à un intervalle de temps de 25 mn contre une solution blanche (sans échantillon). Les résultats sont exprimés en nmol/mn/mg de protéines. L'activité est donnée par la formule suivante :

$$\text{Activité (nmol/mn/mg de protéines)} = \frac{\text{DO/ mn} \times 1000 \times \text{V}_{\text{cyt}}}{\epsilon \times \text{V} \times \text{P}}$$

DO/mn : variation de densité optique par minute

V_{cyt} : volume de cytosol

V : volume de l'échantillon en ml

P : mg de protéines par ml de la fraction à doser

ϵ : coefficient d'extinction molaire de l'acétylcholinestérase égale à 13,6 mmol/ mn E.

D. Techniques de biologie moléculaire

I. Etude phylogéographique

1. Extraction de l'ADN génomique

Les échantillons ont été conservés dans l'éthanol 95° jusqu'à extraction de l'ADN. Cette extraction a été réalisée selon le protocole de Winnepenninckx et al. (1993). 10 à 20 mg de tissu musculaire prélevé au niveau du pied de l'animal sont placées dans 600 μl de solution d'extraction ((Tris HCl 100mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 1.4 M, CTAB 2%, b mercaptoethanol 0.2%). A l'homogénéat sont ajoutés 20 μl de protéinase K pour hydrolyser les protéines. Après une heure de chauffage à 50°C , 600 μl de chloroforme-Isoamyl sont ajoutés au mélange afin de provoquer une émulsion séparant les protéines de l'ADN. Après

centrifugation (15000g, 10 min), 2 phases se forment. La phase supérieure contenant l'ADN total est récupérée. L'ADN est précipité par addition de 30µl d'acétate de sodium et de 1.3 ml d'éthanol absolu. L'ADN est ensuite culoté par centrifugation (15000 g, 10 min), lavé à l'éthanol 70, séché et repris dans 50µl d'eau ultra pure. La concentration en ADN est ensuite évaluée par spectrophotométrie à 260 nm et 280 nm (Ulrospec 2100 pro UV/visible spectrophotometer). Le rapport des valeurs d'absorbance 260/280 nm permet d'estimer la pureté de l'extrait. Un ratio compris entre 1,8 et 2 dénote un extrait d'ADN de bonne qualité, sans contamination par des protéines ou par les produits utilisés pour l'extraction. Les ADN extraits sont ensuite dilués à une concentration de 100ng/µl pour l'amplification par PCR et le séquençage.

2. Amplification de l'ADN génomique

Les marqueurs génomiques ont été amplifiés par PCR à partir des ADN extraits suivant le protocole du kit illustra™ Ready-To-Go PCR Beads Amplification Kits (GE Healthcare). L'amplification a été réalisée à partir de 100 ng d'ADN matrice. Les étapes d'amplification comportent une dénaturation de 3 min à 94°C, d'une hybridation de 1 min à une température variable suivant les amorces utilisées (Tableau 6) et d'une élongation de 1 min à 72°C. Trente cycles d'amplification sont effectués par PCR. Pour chaque échantillon extrait, le marqueur mitochondrial COI et le marqueur nucléaire ITS1 ont été amplifiés.

A l'issue de la PCR, l'obtention d'un fragment unique grâce à la spécificité du couple d'amorces a été vérifiée par migration de 5 µL de produits d'amplification par électrophorèse sur un gel d'agarose 1%. Le marqueur de taille 100 pb DNA Ladder (Promega) a été utilisé pour évaluer la longueur du ou des fragments amplifiés par rapport à la longueur attendue.

Tableau 6 Liste des oligonucléotides et des températures d'hybridation utilisés pour les réactions de PCR.

Nom de l'amorce	Séquence (5' 3')	T° d'hybridation en °C	
		Calculée	Utilisée
Amorces spécifiques du gène ITS1 (Denis et al. 2009)			
ITS1a	cacaccgcccgtcgtacta	62	52°C
ITS1b	tcgaccacgagccgagtgat	58	52
Amorces spécifiques du gène COI (Folmer et al. 1994)			
COI a	ggtcaacaaatcataaagatattgg	66	40
COI b	taaacttcagggtgaccaaaaatca	66	40

3. Séquençage

Le séquençage a été effectué à partir du produit PCR non purifié selon les recommandations de la société « Beckman Coulter Genomics ». Les produits PCR sont expédiés et les résultats sont obtenus par internet. Le séquençage effectué par cette société repose sur le principe de Sanger.

4. Traitement des séquences

- **Alignement et correction des séquences liées aux erreurs du séquenceur**

Dans un premier temps, une observation de l'intensité des pics des chromatogrammes est effectuée afin de vérifier l'adéquation de chaque chromatogramme avec la séquence. Les séquences dont les chromatogrammes présentaient un bruit de fond élevé n'ont pas été retenues afin de limiter les erreurs potentielles. Une correspondance entre les bases inscrites par le séquenceur et les pics des chromatogrammes est vérifiée par lecture. Dans un second temps, une vérification qui consiste à réaliser un « blast » (basic local alignment search tool) d'une séquence obtenue (« query séquence ») dans la base de données **Genbank** (Nucleic Acid Research 2008) est réalisée afin de vérifier si la séquence correspond bien au marqueur attendu et pour éliminer tout risque d'analyse de produits issus de contamination. Enfin, les séquences ont été alignées via **Clustal W** (Thompson et al. 1994) sous **Bioedit version 6.0.6** (Hall 1999) et l'alignement a été vérifié visuellement.

5. Construction de réseau de relation entre les séquences

Des réseaux de relation entre les séquences de chacun des marqueurs sont construits en utilisant le logiciel **Median joining Network 4.5.0.0** (Bandelt et al. 1999). Ce logiciel permet de construire des réseaux d'haplotypes basés sur un algorithme appelé *median-joining* (Cassens et al. 2003) et d'explorer graphiquement l'existence de possibles associations entre haplotypes et distribution géographique. Ces réseaux dessinent les relations évolutives (basées sur les événements mutationnels) entre les différents haplotypes observés sur l'ensemble du jeu de données.

6. Analyse statistique

Le nombre de sites polymorphes S , la diversité haplotypique H_d (Nei 1987), la diversité nucléotidique π (Nei 1987; Nei et Miller 1990) et K (nombre moyen de différences nucléotidiques) sont calculés en utilisant le programme **DNASP V.5.10** (Librado et Rozas 2009). Les statistiques de D Tajima (1989) et D^* et F^* de Fu et Li (1993), visant à tester l'hypothèse de la neutralité, qui suppose l'absence de sélection naturelle et de changements démographiques (une taille effective stable de la population) sont aussi calculées par le même logiciel. Les valeurs de différenciation génétique (F_{ST}) ont été calculées par paires entre

populations en utilisant le programme **ARLEQUIN V3.5** (Excoffier et Lischer 2010). Pour tester l'existence de corrélation entre les valeurs de différenciation génétique F_{ST} et les distances géographiques, le test de **Mantel** (Mantel 1967) a été utilisé avec le logiciel **ARLEQUIN v.3.5**. (Excoffier et Lischer 2010). Ce test repose sur la détermination de la corrélation entre deux matrices ou plus et permet de produire un coefficient de corrélation r de Pearson qui permet de déduire la présence ou non d'une corrélation entre les matrices étudiées. Deux matrices de distances géographiques ont été construites : la première sur la base du patron général du courant marin et la deuxième en suivant le littoral en tenant compte des distances entre les localités sur la carte. Nous avons, par la suite, examiné la structure génétique inter et intra populationnelle par une analyse de la variance moléculaire (**AMOVA**) (Excoffier et al. 1992) avec le logiciel **ARLEQUIN v.3.5**. (Excoffier et Lischer 2010). Une distribution du nombre de différences entre séquences prises deux à deux (mismatch distribution) a été réalisée au sein de chaque population et pour l'ensemble des populations de *C. glaucum* en utilisant le logiciel **DNASP V.5.10** (Librado et Rozas 2009).

7. Récapitulatifs du principe de la méthode

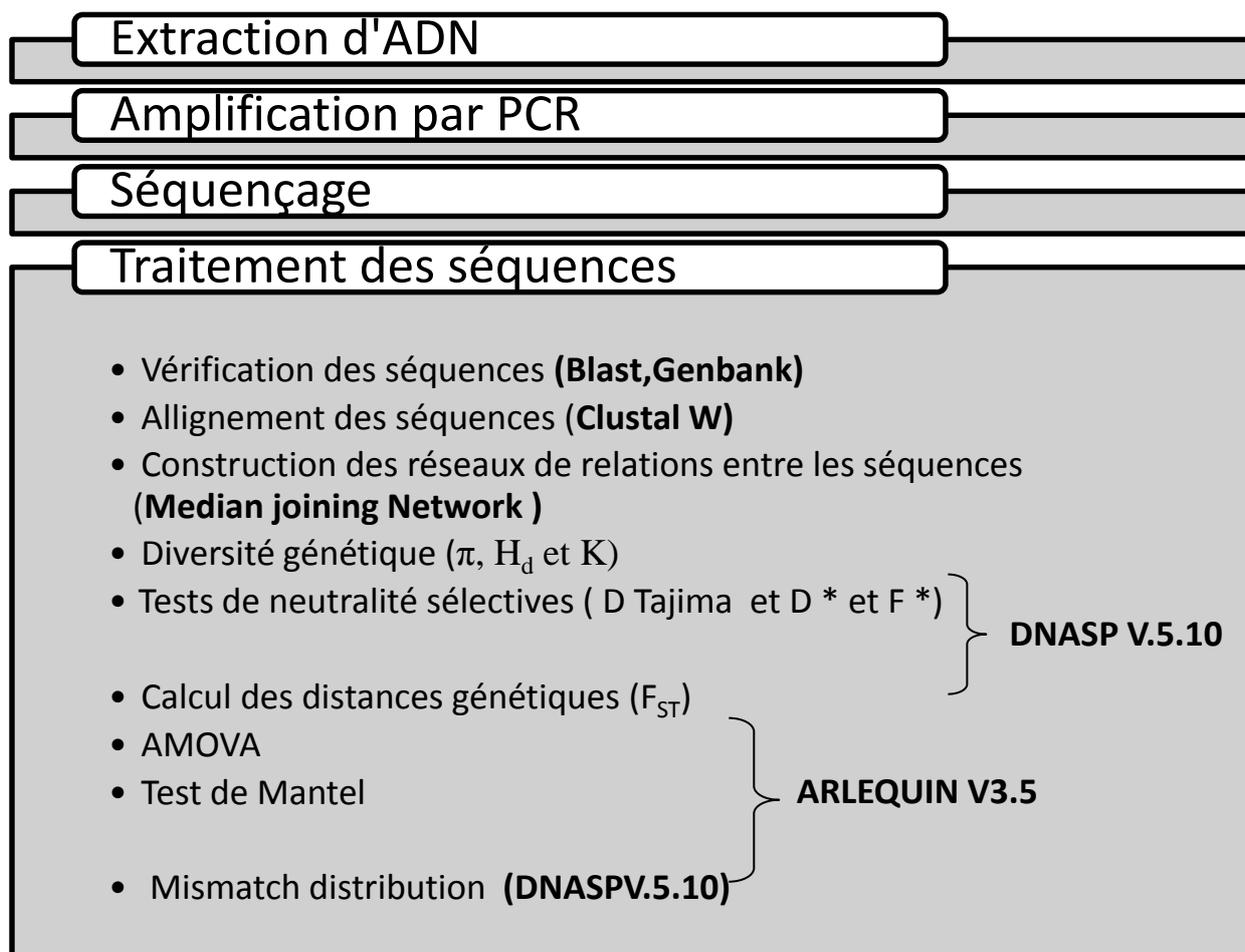


Figure 12 Principe de la méthode utilisée depuis l'extraction de l'ADN jusqu'au traitement des séquences pour les deux marqueurs COI et ITS1

II. Etude écotoxicologique

Les analyses réalisées pour cette partie ont pour but d'étudier l'effet des différences des niveaux de contamination des sites sur l'expression de certains gènes d'intérêt par PCR quantitative. Une des conditions préalables et indispensables à l'étude du niveau d'expression des gènes par PCR quantitative est la connaissance d'au moins une partie de la séquence codante du gène étudié. Le génome de *C. glaucum* demeure à l'heure actuelle très peu connu et un travail important de recherche et de séquençage des gènes d'intérêt a donc été mené au cours de ce travail.

1. Recherche et séquençage des régions codantes d'intérêt

Pour l'amplification des trois gènes de ménage (β -actine, α -tubuline, β -tubuline) et des six gènes cibles (MT, HSP70, CAT, CuZnSOD, MnSOD et ABCB1), des amorces dégénérées ont été conçues sur la base des nucléotides conservés dans ces mêmes gènes pour *Cerastoderma edule* (travaux non publiés du laboratoire MMS, Tableau 15). La séquence de COI étant déjà présente dans les banques des données (HQ432846). Pour les séquences non identifiées chez la coque *C. edule*, Facteur d'élongation 1 α (EF1), glutathion peroxydase (GPx), protéines de choc thermique 90 (HSP 90) et cytochromes P450 (CYP), il a été nécessaire de rechercher les séquences codantes d'intérêt dans la banque de données GENBANK (*via* Pubmed-NCBI) chez des espèces de mollusques pour lesquelles cette séquence est connue. Les différentes séquences rapatriées sont alors alignées à l'aide du logiciel « CustalW » qui permet de mettre en évidence les régions codantes du gène les plus conservées entre les espèces. Des couples d'amorces sont alors déterminés dans ces régions « conservées » et synthétisés (Eurofins). La première étape pour séquencer les gènes consistait à extraire les ARN totaux (cf. 2) des tissus et de les rétro-transcrire en ADNc (ADN simple brin) (cf. 3). Une amplification de ces derniers par PCR classique (cf. 4) a été ensuite réalisée, suivie d'une étape de vérification de la taille des fragments amplifiés en effectuant une électrophorèse en gel d'agarose (cf. 5). Cette étape a permis de comparer la taille de ces fragments à celle attendue. Les fragments présentant la taille attendue ont alors été purifiés (cf. 6) puis clonés (cf. 7) et enfin séquencés par l'entreprise « Beckman Coulter Genomics ».

2. Extraction des ARN totaux

Les Branchies de chaque échantillon ont été disséquées, conservées dans du « RNA Later » et stockées à -20°C pour l'extraction de l'ARN. Environ 100 mg de tissu de branchies sont homogénéisés dans 1 ml d'une solution de Tri-Reagent (Invitrogen). Cette solution est composée de phénol et de thiocyanate de guanidium qui dénaturent les acides nucléiques,

dissocient les protéines et possèdent également une activité inhibitrice sur les ribonucléases (RNases) endogènes. Après une courte incubation de 5 mn à température ambiante, permettant de dissocier les complexes nucléoprotéiques, 200 µl de chloroforme est ajouté. Les tubes sont alors agités vigoureusement et incubés pendant 15 min à température ambiante. Cette étape permet de séparer par solubilisation différentielle les acides nucléiques (les ARN sont insolubles dans le phénol) des protéines et lipides. Après centrifugation, le mélange est séparé en une phase inférieure rouge, la phase phénol chloroforme, une interphase et une phase aqueuse supérieure incolore. L'ARN reste exclusivement dans la phase aqueuse, c'est donc cette phase qui est prélevée puis précipitée avec de l'isopropanol. Le précipité d'ARN, souvent invisible avant centrifugation, forme un culot au fond du tube. Le culot d'ARN est lavé à l'éthanol 75% puis dissous dans l'eau DEPC (eau traitée au diéthylpyrocarbonate, un inhibiteur des RNases). Les volumes d'eau DEPC ajoutés aux échantillons sont fonction de la taille des culots récupérés (de 25 à 100 µL).

La concentration en ARN est déterminée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 260 nm au moyen d'un spectrophotomètre (Ultrospec 2100 pro UV/visible spectrophotometer). Une unité d'absorbance correspond à 40 µg d'ARN/ml. D'autre part la qualité de l'ARN extrait est vérifiée par deux méthodes : i) le calcul du rapport de l'absorbance à 260nm/280nm et ii) en utilisant une micro-électrophorèse capillaire sur l'appareil Experion® (BIORAD) équipé du logiciel Experion™ software V3.0. L'analyse de l'électrophorégramme permet de visualiser les 2 pics correspondant aux ARN ribosomiaux 18S et 28S. La qualité des ARN est attestée sous forme de score, sur une échelle de 1 à 10, nommé coefficient RQI (RNA Quality Indicator), basé sur l'aspect des pics des ARN ribosomiaux 18S et 28S et la valeur du rapport des intensités des pics 28S/18S. Tous les ARN préparés au cours de ce travail avaient un RQI supérieur à 9 traduisant l'excellente qualité des ARN extraits.

3. Transcription inverse (RT)

La transcription inverse a pour objectif de transformer les ARN en ADN complémentaires (ADNc), plus stables et indispensables pour effectuer les étapes de PCR ultérieures. Les ARN totaux (3 µg) sont dans un premier temps dénaturés 5 min à 70°C en présence d'une amorce dTRace (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'). Cette étape permet d'éliminer les structures secondaires des ARN. Par la suite, on ajoute le tampon de réaction, des dNTP, un inhibiteur de RNases (RNasin, Promega) et de la transcriptase inverse (MMLV-RT, Promega). Le milieu réactionnel est alors incubé 90 minutes à 42°C, étape au cours de laquelle l'amorce dTRace vient s'hybrider au niveau de la queue polyA des ARN

messagers puis ces ARN messagers utilisés comme matrice pour la synthèse de l'ADNc monocaténaire grâce à la transcriptase inverse. La réaction est ensuite arrêtée par une incubation de 5 min à 70°C (inhibition de l'enzyme).

4. Amplification par PCR classique

La PCR classique permet d'amplifier facilement et de manière importante un fragment d'ADN d'intérêt, même présent en très faible quantité dans l'échantillon. Cette technique fait appel à l'enzyme *Taq* polymérase. Cette ADN polymérase va permettre de synthétiser de façon fidèle un brin complémentaire à partir d'une matrice ADN présente dans l'échantillon, et ce, de manière importante puisque cette enzyme est capable de polymériser plus de 1000 pb par minute. Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide de la *GoTaqDNA* polymérase (Promega) en respectant les recommandations du fournisseur. Brièvement, 1 µL d'ADNc sont mises en présence d'un mélange contenant :

- 2 µL de chaque amorce à 100 µM
- 2 µL de dNTP à 2mM
- 1,5 µL de MgCl₂ à 25 mM (cofacteur de la *Taq* polymérase)
- 5 µL de tampon de réaction 5X
- 0,12 µL de *GoTaq* polymérase (Promega)
- 11,38 µL d'eau purifiée exempte de nucléases

Ce mélange est placé dans un thermocycleur (Eppendorf) qui va réaliser les cycles de PCR décrits ci-dessous :

- La dénaturation de l'ADN : séparation des deux brins complémentaires par une élévation de la température à 94°C pendant 30 secondes à 1 minute.
- L'hybridation des amorces au niveau des régions spécifiques encadrant le segment à amplifier. La durée de cette étape est de 30 s et la température est définie au cas par cas car elle dépend du T_m (température de fusion) du couple d'amorces utilisé (Tableaux 7 et 8).
- L'élongation : synthèse du brin complémentaire par la *Taq* polymérase pendant 30 secondes à 72°C.

Ce cycle est réitéré 40 fois, et en fin de réaction une étape de 10 min à 72°C va permettre à l'enzyme de finaliser les élongations des brins d'ADNc. Les amplicons ainsi obtenus par PCR sont ensuite visualisés par électrophorèse.

Tableau 7 Amorces utilisées pour la caractérisation de l'ADNc des différents gènes ; T (°C), température de fusion

Gènes	Amorcessens (5'-3')	Amorces anti sens (5'-3')	T (°C)
Facteur d'élongation 1a	GGTKTTGGACAAACTGAAG	TGGCACYGTTCCAATACCTCC	60
β Actine	CCGAAGCGTGGTTACTCATTCA	CGGGAAGCTCGTAGCTCTTCT	60
α Tubuline	TTCAAGGTCGGCATCAACTACC	TATGCACACACGGCTCTCTGG	63
β Tubuline	TGACCGTGGCCTGTATGTTC	CATTCGACGAAGTAGCTGCTGTT	62
MT	TCGAATCTCAACAACCATCCAG	CCACCGACAAGTACTGGGCTCG	62
ABCB1	TGAACTTGGCATGGCTGAGAT	TCTGTTTCTGTCCCCCACTC	60
HSP70	AAAATCAGTGAAGAAGACAAGAAA ACC	ATTCAAATTCTTCCTTCTCTGCAGAT	59
CAT	TATGAAYGGMTAYGGWAGYCACAC	CAAAGGGRTTCCAHCAGAA	61
MnSOD	TAATCACTCTGTCTTTTGGACGG	TACTCTTAATCGACCACTCACTGG	60
CuZnSOD	TGGTCCAGATGGAAAAGCTGAAA	CCACCCTCATGAACCACAACCTGT	60

Tableau 8 N° d'accèsion dans les banques des données et longueurs de différentes séquences utilisées pour la caractérisation de l'ADNc des différents gènes.

Gènes	N° d'accèsion	Longueur (bp)
Facteur d'élongation 1a	HF947020	616
β Actine	HF947015	154
α Tubuline	HF947013	83
β Tubuline	HF947014	106
MT	HF947022	322
ABCB1	HF947016	237
HSP70	HF947019	100
CAT	HF947021	260
MnSOD	HF947018	196
CuZnSOD	HF947017	102

5. Electrophorèse

La migration électrophorétique sur gel d'agarose a pour objectif de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur masse moléculaire (exprimé en paires de bases) grâce à l'application d'un champ électrique. En effet, les séquences nucléotidiques étant chargées négativement à pH neutre, celles-ci vont être attirées par le pôle positif et vont être séparées par taille en passant entre les molécules d'agarose : les plus petites séquences se glissant plus facilement vont migrer plus rapidement et plus loin que les séquences les plus longues. Les produits de PCR sont déposés dans un gel d'agarose (1%) auquel a été ajouté du BET (Bromure d'ethidium), puis soumis à une migration sous 120 volts pendant 1 heure. Le BET

s'intercale entre les bases nucléotidiques et, sous éclairage ultraviolet (UV), permet de révéler les fragments d'ADN devenus fluorescents. La révélation est réalisée à l'aide d'un analyseur couplé à une table UV.

6. Purification des fragments d'intérêt

Les bandes sont découpées à l'aide d'un scalpel stérile puis conservées dans un microtube à -20°C jusqu'à extraction. La purification de l'ADN issu de la bande est réalisée à l'aide du kit QIAEXII Agarose Gel Extraction (Qiagen). Une solution jaune appelée « QX1 Buffer » et des billes de silice sont dans un premier temps rajoutées au microtube contenant la bande extraite et le tout est incubé à 60°C afin de dissoudre l'agarose. La solution « QX1 Buffer » est un tampon coloré qui permet de contrôler le pH optimal lors de l'accrochage de l'ADN aux billes de silice. Une centrifugation est ensuite réalisée afin de culotter les billes de silice auxquelles sont accrochés les fragments d'ADN. Deux lavages successifs dans un tampon d'éthanol (« Buffer PE ») sont effectués puis le culot est séché sous vide. Le culot est enfin repris dans l'eau ultra pure MilliQ permettant le décrochage de l'ADN des billes de silice. Le tout est centrifugé et le surnageant contenant les fragments d'ADN purifiés est récupéré.

7. Clonage et transformation bactérienne

Le principe du clonage bactérien est d'isoler un fragment d'ADN en l'insérant dans un vecteur capable de se multiplier dans les bactéries, ici un plasmide. L'insertion dans le vecteur est réalisée à l'aide d'enzymes de restriction qui permettent la linéarisation du vecteur (le site de restriction doit être unique dans le vecteur).

a. Ligation des fragments à un vecteur de clonage

Le plasmide (pGEMT, "pGEM®-T easy vector systems", Promega) de 3018 pb, a été utilisé en raison de sa capacité à conférer aux bactéries transformées la résistance à l'antibiotique ampicilline (Amp) et pour la présence du gène codant la protéine β -galactosidase (LacZ) dont l'utilité est décrite plus loin. Le pGEMT initialement linéaire, présente à chaque extrémité une base azotée T libre, complémentaire à la base azotée A libre ajoutée à chaque extrémité 3' du fragment amplifié par la Taq polymérase pendant la réaction de PCR. Les liaisons phosphodiester entre le fragment à cloner, appelé insert, et le vecteur sont créées à l'aide d'une enzyme particulière, la ligase (réaction de ligation). On utilise généralement la T4 DNA ligase issue du bactériophage T4. Brièvement, 1 μ L de plasmide (50 ng.mL⁻¹) sont mélangés avec 3 μ L de fragment purifié, 1 μ L de ligase (3 U. μ L⁻¹) et 5 μ L de tampon 2X. Le mélange réactionnel est incubé une nuit à 4°C. Le clonage ne présentant pas une efficacité de 100%, le

mélange de ligation obtenu va donc à la fois contenir des plasmides ayant intégré le fragment d'intérêt avec succès ainsi que des plasmides sans insert.

b. Transformation bactérienne

La transformation bactérienne consiste à mettre le mélange de ligation en présence de bactéries de façon à ce que le vecteur potentiellement avec l'insert pénètre dans la bactérie pour s'y multiplier. Les bactéries *Escherichia coli* thermo-compétentes « DH5 α » sont capables d'incorporer des vecteurs par choc thermique. 10 μ L de produits de ligation sont ajoutés à 100 μ L de bactéries compétentes. L'ensemble est incubé dans la glace pendant 30 minutes afin de permettre aux plasmides de s'agglutiner à la paroi des bactéries. Les bactéries subissent ensuite un choc thermique à 42°C pendant 1min 30, étape au cours de laquelle les membranes bactériennes sont temporairement perméables et au cours de laquelle les plasmides pourront pénétrer à l'intérieur des bactéries. Les bactéries sont ensuite immédiatement replacées dans la glace pendant plusieurs minutes afin de rendre imperméables leurs parois. Les bactéries sont alors placées dans un milieu de culture contenant du glucose et du magnésium afin de restaurer l'intégrité de leur paroi et permettre leur croissance. Ce mélange est alors incubé à 37°C pendant 1 heure sous agitation afin de permettre la multiplication des bactéries. Une fraction de cette solution bactérienne est ensuite étalée sur des boîtes de pétri solides contenant le milieu de culture LB (Luria-Bertani) auquel de l'agar a été ajouté.

La ligation et la transformation bactérienne ne sont pas efficaces à 100%, c'est à dire que des vecteurs peuvent ne pas posséder d'insert après ligation et des bactéries peuvent ne pas avoir reçu de vecteurs après transformation. Il faut donc pouvoir distinguer ces différents types bactériens. Cette distinction, appelée sélection, va être obtenue à l'aide de gènes particuliers apportés par le vecteur. Le vecteur pGEMT possède un gène de résistance à un antibiotique, l'ampicilline, qui va permettre de distinguer les bactéries qui ont reçu le vecteur (devenues résistantes à l'ampicilline) des bactéries qui n'ont pas reçu le vecteur et qui sont naturellement sensibles à cet antibiotique.

Sur le milieu solide contenant de l'antibiotique, seules les bactéries ayant incorporé le pGEMT vont donc parvenir à croître et former une colonie. Par ailleurs, le site d'insertion de l'insert est situé à l'intérieur du gène de la β -galactosidase. L'insertion va donc couper ce gène qui ne fonctionnera plus. Il est donc possible de distinguer les vecteurs qui ont inséré un fragment d'ADN de ceux qui n'ont rien inséré mais se sont re-circularisés à l'aide de la ligase, simplement en testant le fonctionnement de la β -galactosidase. Ceci est réalisé en ajoutant au

milieu de culture des bactéries un substrat de l'enzyme (Xgal) qui, lorsque celle-ci fonctionne, est transformé en un produit qui colore les colonies bactériennes en bleu. Dès lors les colonies ayant incorporé un plasmide sans insert seront colorées en bleu, au contraire des colonies ayant incorporé un plasmide avec insert qui resteront blanchâtres.

Après une nuit d'incubation à 37°C, un minimum de 10 colonies blanchâtres sont isolées et repiquées dans 10 tubes remplis avec 3 mL de milieu LB-Amp liquide. Ces tubes sont eux-même incubés une nuit à 37°C sous agitation. La vérification de la présence de l'insert dans le plasmide incorporé par bactéries sélectionnées se fait par une étape de PCR à l'aide d'amorces universelles présentes sur le plasmide (T7 et Sp6) puis par révélation du produit de PCR sur gel d'électrophorèse en fonction de la taille attendue. Une fois les bandes présentant les bonnes tailles repérées, les produits PCR sont envoyés à une entreprise privée chargée du séquençage du fragment d'intérêt (Beckman Coulter Genomics).

8. PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative permet la détection et la quantification des produits amplifiés en temps réel en cours de réaction grâce à l'utilisation du SYBR Green. Ce dernier est un fluorochrome qui possède la propriété de s'intercaler entre les bases d'une séquence nucléotidique double brin et d'émettre de la fluorescence dans cette condition. L'intensité de la lumière émise par ce fluorochrome est directement proportionnelle au nombre de copies du fragment amplifié.

Pour cette étude, les PCR quantitatives ont été réalisées à l'aide du thermocycleur (ABI Prism 7300, AppliedBiosystem). Ce thermocycleur est équipé d'un fluorimètre qui mesure la fluorescence émise par chaque échantillon à l'issue de chaque étape d'élongation. Les amorces complémentaires à la région étudiée ont été définies à l'aide du logiciel « Primer Express version 3® » (Tableau 9). Les réactions de PCR quantitative sont réalisées dans un volume final de 10µl contenant :

- 4,86µL d'ADNc dilué
- 5µL de « SYBER green »
- 0,1µM de chaque amorce sens et anti-sens.

Le programme commence par une étape préalable d'activation de l'enzyme de 20 sec à 95°C, suivie de la répétition de 40 cycles d'amplification (3 sec à 95°C, 20 sec à 60°C et 30 sec à 72°C).

L'absence de produits de PCR non spécifiques et de dimères d'amorces a été vérifiée par l'examen de la courbe de fusion générée à la fin de la réaction. Cette courbe est obtenue par le suivi de la fluorescence du SYBR Green durant le chauffage progressif allant de 60 à 95°C. Les T_m ont été déterminés par analyse de la perte de la fluorescence lorsque les deux brins se

séparent. Le cycle seuil (Ct ou « threshold cycle ») est déterminé par le logiciel Step One Plus version 2.1. Il correspond à l'intersection de la ligne de bruit de fond avec la courbe de fluorescence. L'efficacité de la réaction a été également calculée pour chaque gène en utilisant la méthode de pente du Ct. Cette méthode se base sur la réalisation d'une gamme de dilution sur un pool d'échantillon d'ADNc. La valeur du Ct est déterminée pour chaque dilution. La droite représentant le Ct en fonction du logarithme de la concentration est tracée et l'efficacité de la réaction de la PCR est exprimée en utilisant la pente de cette courbe selon la formule suivante : $E = 10^{(-1/\text{pente})}$.

En plus des gènes étudiés, un contrôle endogène a été systématiquement amplifié. Dans notre cas, les gènes de références choisis sont la β -actine, l' α -tubuline, la β -tubuline et le facteur d'élongation 1a. Parmi ces gènes de références, les plus stables ont été sélectionnés à l'aide du logiciel « Bestkeeper » (Pfaffl et al. 2004). Ce logiciel utilise des corrélations par paires et calcule une moyenne géométrique pour sélectionner les gènes les plus stables. Typiquement, trois à cinq gènes de références sont nécessaires pour une normalisation optimale de l'expression des gènes cibles (Derveaux et al. 2010).

Le calcul de l'expression relative (RE) est basé sur la méthode comparative des Ct (Livak et Schmittgen 2001), le calibrateur pour la partir *in situ* est la moyenne des échantillons du site de référence Ellouza (E_0) et pour les expérimentations est la moyenne des échantillons contrôles pris au temps 0 (T_0). L'expression relative est alors exprimé ainsi (Pfaffl et al. 2004) :

$$RE = ((E_{TG})^{\Delta Ct_{TG}}) / ((E_{HKG})^{\Delta Ct_{HKG}}) \text{ avec } \Delta Ct = Ct_{E_0} - Ct_{\text{sample}} \text{ (milieu naturel)}$$

$$RE = ((E_{TG})^{\Delta Ct_{TG}}) / ((E_{HKG})^{\Delta Ct_{HKG}}) \text{ avec } \Delta Ct = Ct_{T_0} - Ct_{\text{sample}} \text{ (expérimentations)}$$

Avec :

E_{TG} : Efficacité du gène cible.

E_{HKG} : Efficacité du gène de référence.

Tableau 9 Amorces spécifiques utilisées pour la qRT PCR

Gènes	Amorces sens (5'-3')	Amorces anti sens (5'-3')	Longueur (bp)
Facteur d'élongation 1a	GGATGGCACGGAGACAACAT	TGGTCTTTCCAGAAGCGTTTC	100
β Actine	CGAAGCGTGGTTACTCATTAC	GCCATTTCTGCTCGAAGTC	106
α Tubuline	TTCAAGGTCGGCATCAACTACC	ATGCACACACGGCTCTCTGG	83
β Tubuline	TGACCGTGGCCTGTATGTT	CATTTCGACGAAGTAGCTGCTGTT	100
MT	GAAATGTAGCTGTTCCGGATCAT	CCTCGACCATGCAAGGTTAAC	115
ABCB1	AACATCGCTACGGAGACAAC	CTGGCAGACTGGCAATAAACTG	100
HSP70	AAAATCAGTGAAGAAGACAAGAAAACC	ATTCAAATTCTTCTTCTCTGCAGAT	100
CAT	TCCATCTGAACTTCTCTGCCTCTT	TGTACAACGCCATTGAGAAAGG	80
CO1	CTTGGCTATTTTTGCGCTACATC	CCATCGTTGTCTCTGTCTGCATA	101
MnSOD	CGGTTCTCAGTCCGAATGGA	GTAAGCTCCGCCTTCATTGGA	100
CuZnSOD	CCAGATGGAAAAGCTGAAATTAACA	CAGAAGCGCTCTCCTGTCAGA	66

E. Evaluation de l'état de stress des individus : « test de stress-on-stress »

Les coques ont été prélevées de chaque site pour la partie *in situ* et pour chaque condition et temps d'exposition pour les expérimentations, puis soumises à l'anoxie par exposition à l'air libre à 15°C. La mortalité a été évaluée d'une manière journalière selon la méthode de Viarengo et al. (1995), ce qui nous a permis de déterminer la LT50.

F. Indice de condition des coques

L'indice de condition a été calculé d'une manière individuelle sur chaque coque selon la méthode de Lobel et al. (1991).

IC= (masse des tissus mous sans l'eau palléale/masse totale)* 100

La masse totale comprend la coquille, les tissus mous et l'eau palléale.

G. Analyse statistique

Pour la partie *in situ*, les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du programme SPSS (version13). Pour faire une comparaison des moyennes, une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) a été réalisée. La distribution normale a été vérifiée par la fonction P-Plot. Enfin, le test de Tuckey été utilisé pour distinguer les différences significatives entre les différentes moyennes. Pour toutes les données, le test a été considéré comme significatif pour une valeur de $p < 0,05$. Une analyse en composante principale a été réalisée. La méthode de Pearson a été utilisée pour mettre en évidence des corrélations entre l'indice de condition, les

métaux et l'expression des gènes. Pour les expérimentations, les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel statistique R version 2.14.1. Dans l'expérience de stress-on-stress, l'influence de la concentration en métal et du temps d'exposition sur la capacité de survie à l'anoxie a été analysée en utilisant la fonction SURVREG. Pour tester les différences significatives entre les niveaux d'expression génique, des tests de Kolmogorov-Smirnov ont été utilisés ($p < 0,05$). Après normalisation des données par la fonction $\log(x + 1)$, transformation et stabilisation de leurs variances par la transformation en racine carrée, les influences de l'exposition aux deux contaminants (effluents et Cd) et du temps d'exposition sur l'expression génique, la bioaccumulation des métaux, et l'IC ont été évaluées par des tests indépendants d'ANOVA. Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée sur l'expression des gènes, la bioaccumulation des métaux et l'IC pour chaque condition d'exposition. Des corrélations entre toutes ces variables ont été testées statistiquement par le test de Pearson.

H. Description des expérimentations

1. Exposition de *C. glaucum* aux effluents en laboratoire.

Les coques ont été collectées au niveau du site de référence Ellouza. Après une période d'acclimatation de 24 heures, les coques ont été distribuées dans trois bacs en polyéthylène (de 30x30x20cm) contenant chacun une couche de sédiments autoclavés et 6 litres d'eau de mer aérée. Le premier bac contient de l'eau de mer à partir du site de référence Ellouza (témoins), le second et le troisième bac contiennent respectivement les effluents F1 et F2 dilués dans l'eau de mer provenant du site Ellouza à la concentration de 1% (concentration sub-létale définie par une première série d'expériences de toxicité non rapportée ici). Les deux effluents F1 et F2 ont été collectés à la sortie de la SIAPE. 70 à 85 coques ont été mises dans chaque bac (Figure 13). Pendant une durée de l'expérience de 6 jours, des prélèvements réguliers ont été effectués aux temps 0, 0,5, 1, 3, 5 et 6 jours pour effectuer différentes analyses. L'eau de mer et les effluents ont été renouvelés deux fois au cours de l'expérimentation et aucune mortalité n'a été enregistrée dans les trois groupes de coques.

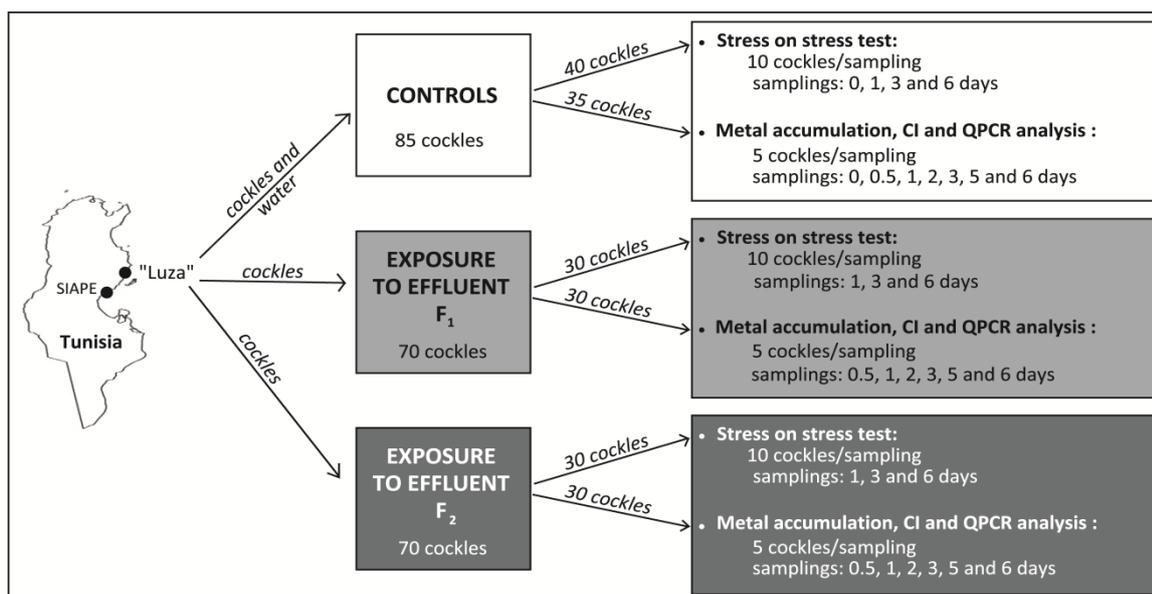


Figure 13 Collecte et exposition des coques aux effluents.

2. Exposition de *C. glaucum* au Cd en laboratoire.

Les coques ont été collectées au niveau du site de référence « Ellouza ». Après une période d'acclimatation de 24 heures, les coques ont été distribuées dans trois bacs en polyéthylène (de 30x30x20cm) contenant chacun une couche de sédiments autoclavés et 6 litres d'eau de mer aérée. Le premier bac contient de l'eau de mer à partir du site de référence Ellouza (témoins) sans Cd, le second contient de l'eau de mer plus du Cd à la concentration de 50µg/L (faible concentration) et le troisième contient de l'eau de mer avec du Cd à la concentration de 5mg/L (forte concentration). La plus faible concentration (50µg/L) est 100 fois plus élevée que la concentration en Cd retrouvée dans le milieu naturel (Barhoumi et al, 2009) alors que la forte concentration (5mg/L) est 10000 fois plus élevée que cette dernière. De plus, la plus forte concentration (5mg/L) peut exister dans certains sites pollués (Belabed et al, 1994). 80 à 90 coques ont été mises dans chaque bac (Figure. 14). Le temps d'exposition varie entre 12 heures et 18 jours. L'eau de mer et le CdCl₂ ont été renouvelés deux fois par semaine.

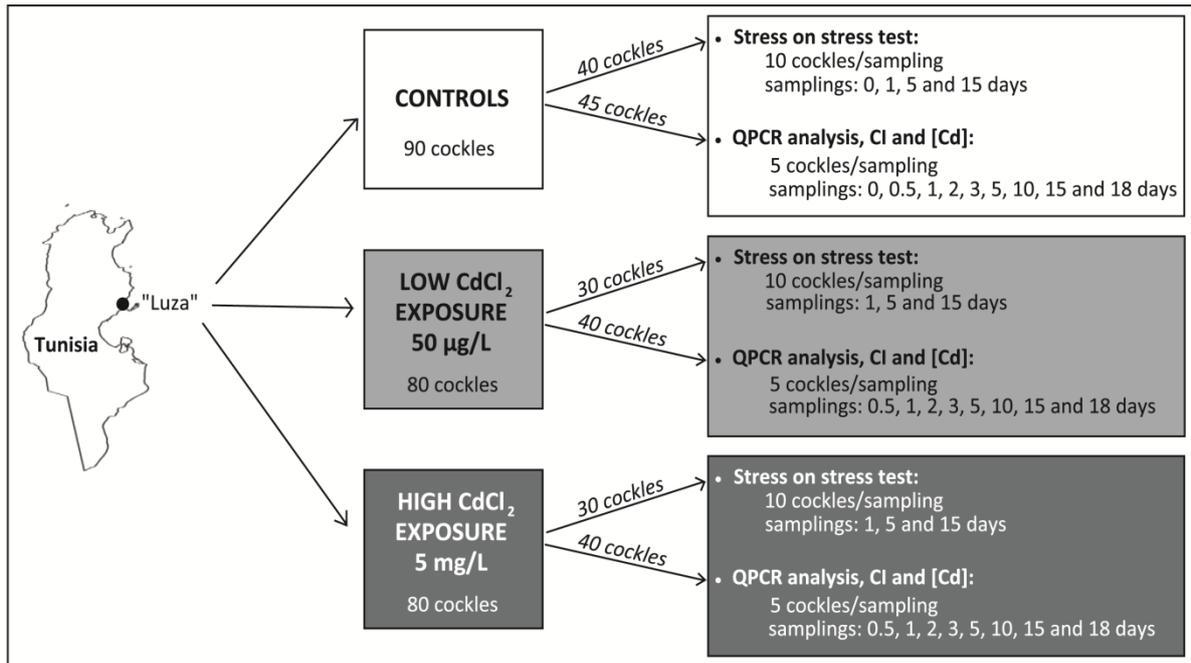


Figure 14 Collecte et exposition des coques au Cd.

Chapitre III

Approche en milieu naturel

Chapitre IIIA

Etude de la structure génétique de populations
de coque *Cerastoderma glaucum* en
Méditerranée occidentale

I. Introduction

De nombreuses études phylogéographiques menées sur *C. glaucum* ont permis de mettre en évidence une grande variabilité interpopulationnelle de cette espèce liée à une grande fragmentation de l'habitat. Ces travaux ont utilisé différentes techniques (l'électrophorèse des allozymes (Hummel et al. 1994), des marqueurs génomiques mitochondriaux (Nikula et Väinölä 2003 ; Tarnowska et al. 2010) et nucléaires (Bercquet 2011 ; Tarnowska 2010 ; Oyieyi 2010). Ces travaux ont concerné des populations de *C. glaucum* couvrant presque toutes les aires de répartition. Suite à ces travaux, plusieurs hypothèses ont été émises concernant la séparation au sein du complexe *C. glaucum* en deux sous espèces *C. glaucum glaucum* de la Méditerranée et *C. glaucum lamarcki* de la région atlanto- baltique (Hummel et al. 1994 ; Brock 1991). Ces mêmes hypothèses ont été par la suite réfutées par les travaux de Nikula et Väinölä (2003) et Tarnowska et al. (2010). Ces derniers auteurs ont démontré, en plus, que les haplotypes méditerranéens tunisiens ont une grande diversité nucléotidique et que par conséquent, l'origine ancestrale de *C. glaucum* pourrait être la Mer Méditerranée à partir de laquelle l'espèce s'est propagée vers les autres régions. L'originalité du travail présenté ici réside dans l'étude de la structure génétique de *C. glaucum* dans sa zone d'origine ancestrale (en se basant sur l'hypothèse de Tarnowska et al. 2010). Aucune étude centrée sur cette aire géographique n'a été réalisée auparavant. De plus, la Méditerranée par sa position géographique entre l'Europe, l'Afrique et l'Asie et par son ouverture sur l'océan atlantique à l'ouest, la mer de Marmara à l'est et la mer Rouge au sud, offre un environnement très particulier pour étudier la structure génétique des organismes marins. Ainsi, dans le but d'apporter un nouveau regard sur la structure génétique de cette espèce dans un environnement original, nous avons utilisé deux types de marqueurs (mitochondrial et nucléaire) pour étudier la phylogéographie de huit populations de *C. glaucum* en Méditerranée occidentale.

II. Résultats

1. variabilité intra populationnelle

1.1 Marqueur mitochondrial COI

Un fragment de 648 pb a été séquencé pour 185 individus de *C. glaucum* collectés sur 8 localités de la Méditerranée occidentale (Tableau 1). Les valeurs relatives de la composition

Etude de la structure génétique de populations de la coque Cerastoderma glaucum en méditerranée occidentale

nucléotidique montrent une prédominance des A et T (60%) par rapport à C et G (40%) pour toutes les populations étudiées. Le nombre de transition était supérieur aux nombres de transversions pour toutes les populations sauf celle de Gargour (G) situé sur la cote sud tunisienne où ils étaient égaux (Tableau 11). Le nombre total de sites polymorphes est de 85 et le nombre total d'haplotypes est de 67 donnant une moyenne de diversité haplotypique de 0.91 et une moyenne de diversité nucléotidique de 0.036 (Tableau 10). L'indice de diversité nucléotidique a tendance à diminuer avec la latitude (Figure 15). Les tests de neutralité sélective sont non significatifs pour toutes les populations sauf deux : Ellouza (E) (Tunisie) et Ebro Delta (ED) (Espagne). L'analyse démographique par la méthode de « mismatch distribution » montre que la distribution du nombre observé de différences entre haplotypes pris deux à deux pour chaque population est multimodal exception faite pour la population Espagnole MM (Figure 16).

Tableau 10 Polymorphisme de l'AND mitochondrial du gène COI et le test de neutralité; N- nombre d'individus, N_H- nombre d'haplotypes, S- nombre de sites polymorphes, H_d- indice de diversité haplotypique, π - indice de diversité nucléotidique, K- moyenne des différences nucléotidiques, D Tajima, Fu and Li's D* and F*, n.s.- non significative (voir le tableau 1 pour les abréviations) .

Sites	N	N _H	S	H _d	π	K	D Tajima	Fu and Li's D*	Fu and Li's F*
G	31	25	109	0.983	0.0241	15.944	n.s.	n.s.	n.s.
SM	28	19	45	0.955	0.0176	10.48	n.s.	n.s.	n.s.
E	26	14	59	0.874	0.0097	6.055	-2.368	-3.837	-3.962
T	23	18	26	0.976	0.0087	5.202	n.s.	n.s.	n.s.
B	21	12	39	0.914	0.0136	8.838	n.s.	n.s.	n.s.
An	19	12	32	0.895	0.0205	6.497	n.s.	n.s.	n.s.
MM	18	10	12	0.765	0.0030	1.948	n.s.	n.s.	n.s.
ED	19	12	65	0.918	0.0134	8.702	-2.241	-2.641	-2.9374
Moyenne	23	15	48	0.91	0.036				
Totale	185	67	85						

Etude de la structure génétique de populations de la coque Cerastoderma glaucum en méditerranée occidentale

Tableau 11 Diversité génétique de l'ADN mitochondrial COI pour chaque population de *C. glaucum*. N- nombre d'individus, N_H- nombre d'haplotypes, S- nombre de sites polymorphes (voir le tableau. 1 pour les abréviations des noms des sites).

Sites	N	N _H	S	Nombre de transitions	Nombre de traversions	Composition nucléotidique
G	31	25	109	57	58	CG : 40% AT : 60%
SM	28	19	45	39	16	CG : 40% AT : 60%
E	26	14	59	54	11	CG : 41% AT : 59%
T	23	18	26	27	2	CG : 41% AT : 59%
B	21	12	39	27	15	CG : 40% AT : 60%
An	19	12	32	12	3	CG : 40% AT : 60%
MM	18	10	12	11	1	CG : 41% AT : 59%
ED	19	12	65	39	27	CG : 40% AT : 60%

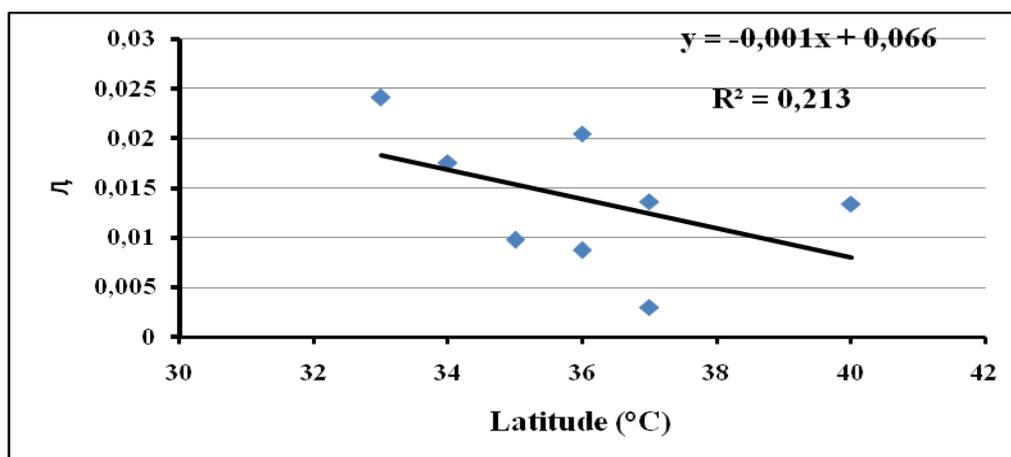


Figure 15 Relation entre la diversité nucléotidique et la latitude

Etude de la structure génétique de populations de la coque Cerastoderma glaucum en méditerranée occidentale

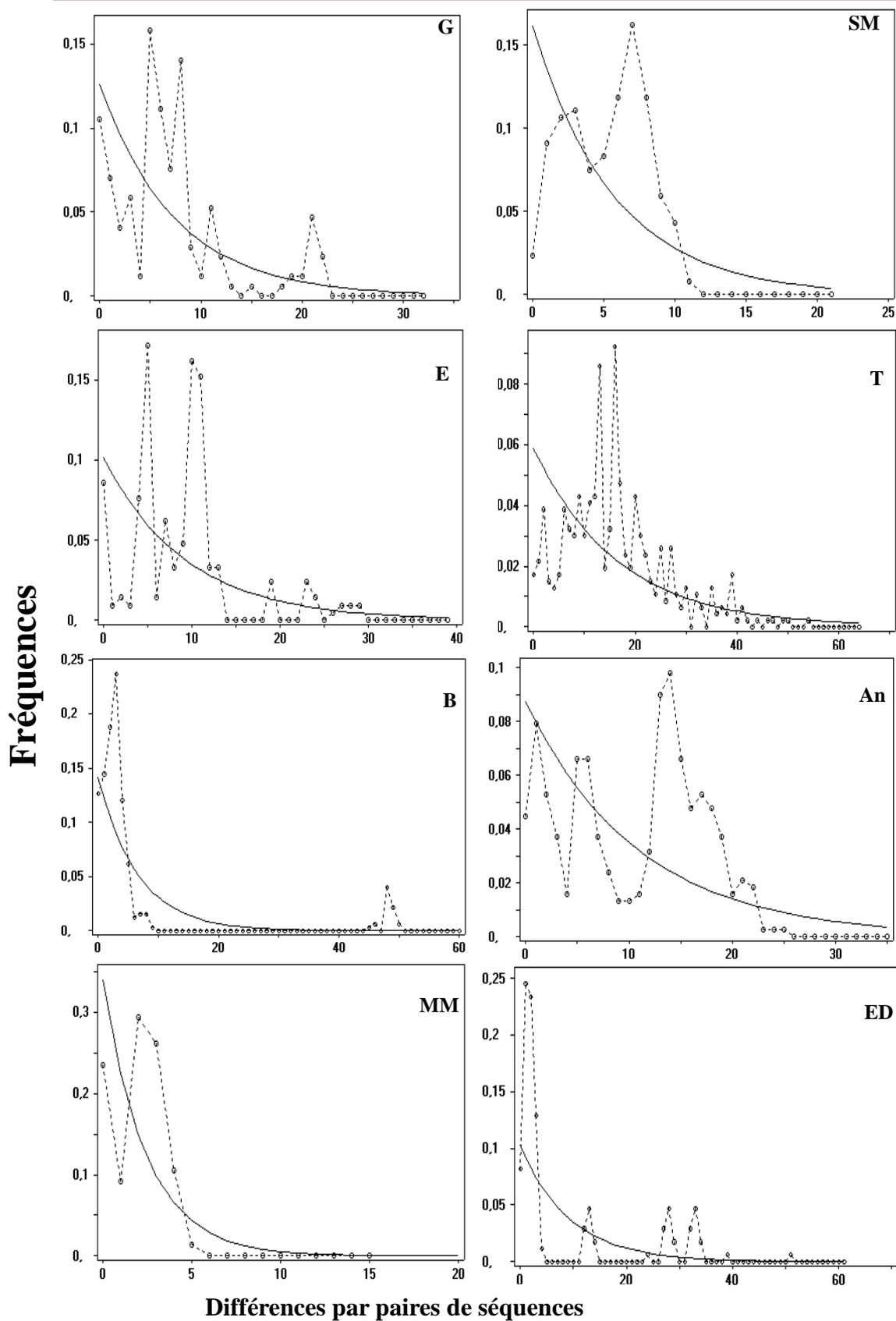


Figure 16 Distribution des mésappariements pour chaque population de *C. glaucum*. (Voir le tableau 1 pour les abréviations).

1.2 Marqueur nucléaire ITS 1

Un fragment de 242 pb a été séquencé pour 147 individus de *C.glaucum* collectés sur 8 sites de la méditerranée. Les valeurs relatives de la composition nucléotidique montrent une prédominance des C et G (63%) par rapport à A et T (37%) pour toutes les populations étudiées. Le nombre de transversions est supérieur au nombre de transitions pour toutes les populations étudiées (Tableau 13). Le nombre total de sites polymorphes est de 134 et le nombre total d'haplotypes est de 72 donnant une moyenne de diversité haplotypique de 0.950 et une moyenne de diversité nucléotidique de 0.0764 (Tableau 12). On n'a pas détecté de corrélation entre la diversité nucléotidique et la latitude (Figure17). Les tests de neutralité sélective sont non significatifs pour toutes les populations étudiées à part les populations Espagnoles (ED et MM) (Tableau 12). L'analyse démographique par la méthode de « mismatch distribution » montre que la distribution des différences entre haplotypes pris deux à deux pour chaque population est multimodale (Figure.18).

Tableau 12 Polymorphisme de l'ADN nucléaire du gène ITS1 et le test de neutralité; N- nombre d'individus, N_H- nombre d'haplotypes, S- nombre de sites polymorphes, H_d- indice de diversité haplotypique, Π - indice de diversité nucléotidique, K- moyenne des différences nucléotidiques, D Tajima, Fu and Li's D* and F*, n.s.- non significative (voir le tableau 1 pour les abréviations).

Sites	N	N _H	S	H _d	Π	K	D Tajima	Fu and Li's D*	Fu and Li's F*
G	13	12	112	0.987	0.12071	26.43	n.s.	n.s.	n.s.
SM	15	12	41	0.943	0.04516	9.438	n.s.	n.s.	n.s.
E	29	25	115	0.988	0.10719	22.081	n.s.	n.s.	n.s.
T	14	11	119	0.956	0.15374	30.440	n.s.	n.s.	n.s.
B	16	11	33	0.933	0.02774	5.908	n.s.	n.s.	n.s.
An	26	13	32	0.895	0.0205	6.497	n.s.	n.s.	n.s.
MM	18	14	66	0.961	0.0592	12.261	-2.003	n.s.	-2.631
ED	16	12	87	0.942	0.07765	16.850	-1.85211	n.s.	n.s.
Moyenne	18	14	75	0.950	0.0764				
Totale	147	72	134						

Etude de la structure génétique de populations de la coque Cerastoderma glaucum en méditerranée occidentale

Tableau 13 .Indices de diversité génétique de l'ADN nucléaire ITS1 pour chaque population de *C. glaucum*.

Sites	N	N _H	S	Nombre de transitions	Nombre de traversions	Composition nucléotidique
G	13	12	112	49	75	CG : 63% AT : 37%
SM	15	12	41	24	27	CG : 63% AT : 37%
E	29	25	115	69	75	CG : 63% AT : 37%
T	14	11	119	51	72	CG : 61% AT : 39%
B	16	11	33	30	34	CG : 63% AT : 37%
An	26	13	32	27	55	CG : 64% AT : 36%
MM	18	14	66	26	46	CG : 63% AT : 37%
ED	16	12	87	40	45	CG : 63% AT : 37%

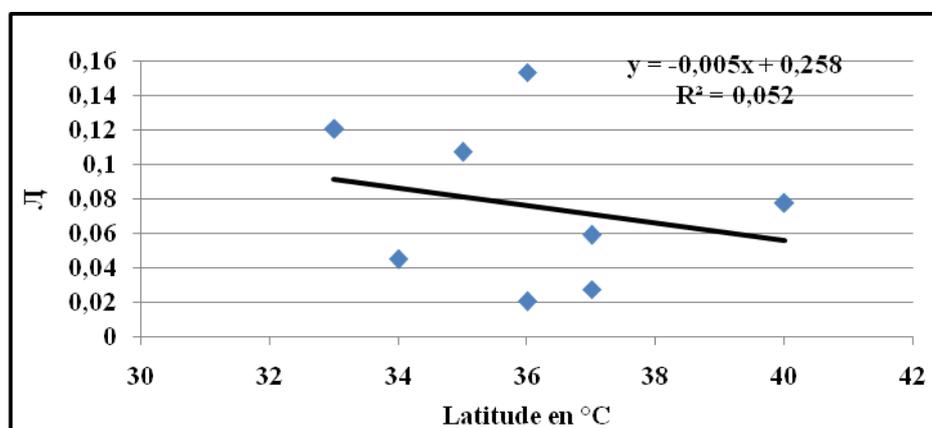


Figure 17 Relation entre la diversité nucléotidique et la latitude

Etude de la structure génétique de populations de la coque Cerastoderma glaucum en méditerranée occidentale

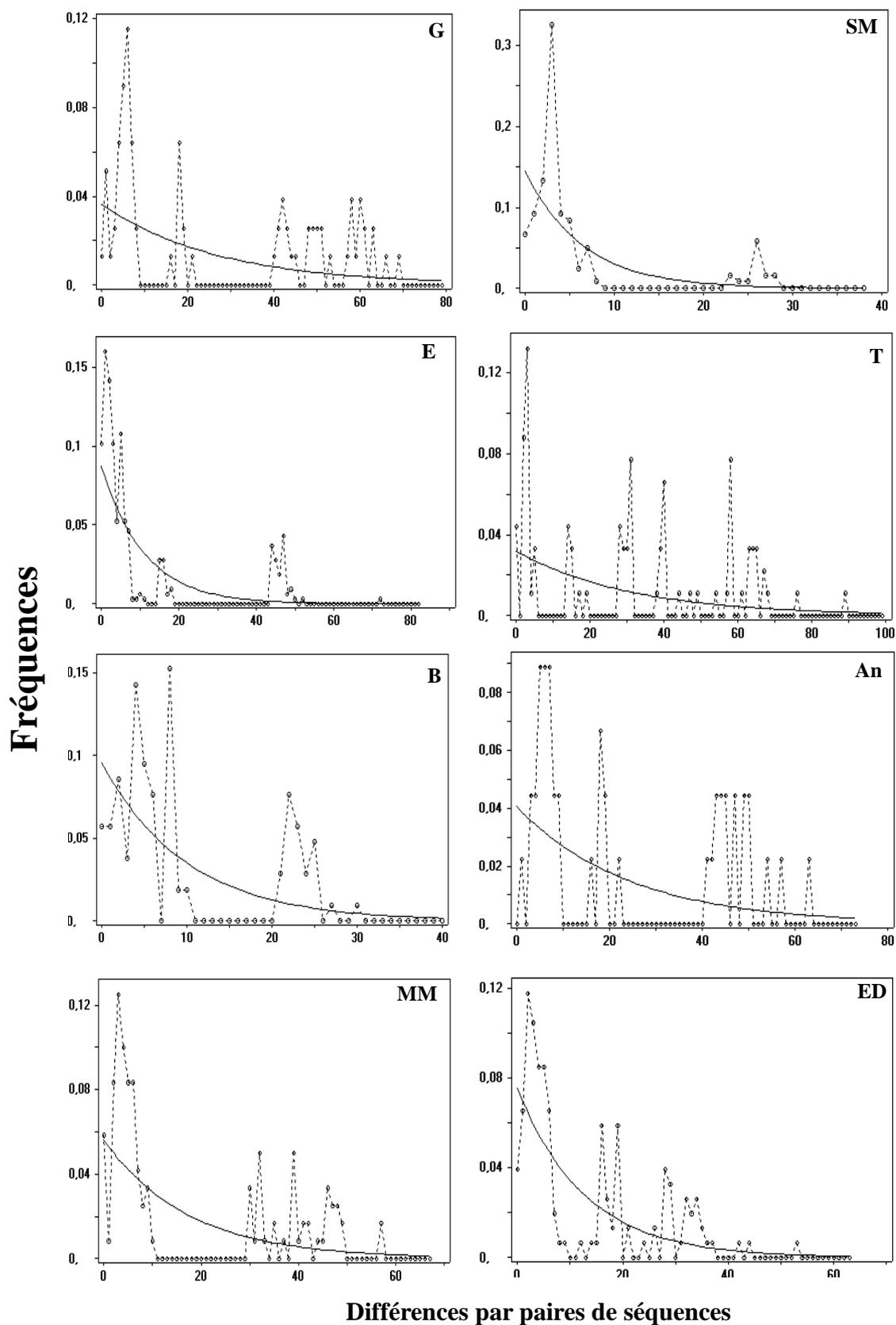


Figure 18 Distribution des mésappariements pour chaque population de *C. glaucum*. (Voir le tableau 1 pour les abréviations).

2. Variabilité inter populationnelle

2.1 Marqueur mitochondrial COI

La méthode de « median joining » est utilisée pour construire un réseau illustrant les relations entre les haplotypes analysés (Figure 19). Cette représentation dévoile la présence d'une structuration génétique qui divise les populations en trois groupes principaux (groupe I, II et III) : le groupe I est formé uniquement par les haplotypes d'une population Tunisienne (E), le groupe II est formé par des échantillons provenant des populations Espagnoles (ED et MM), des populations sud tunisiens (G et SM) et de la population Algérienne (An) et le groupe III est constitué par des échantillons provenant des populations nord tunisiens (B et T), des populations sud tunisiens (G et SM) et de la population Algérienne (An). Cette représentation peut déjà nous renseigner sur la diversité haplotypique intra populationnelle à travers le nombre important d'haplotypes présent dans chaque population. Cette constatation est confirmée par l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA), qui a démontré que la quasi-totalité de la variance (91.87%) est exprimée au niveau intra populationnel contre une très faible proportion (8.13%) au niveau inter populationnel (Tableau 14). L'analyse démographique par la méthode des mésappariements réalisée sur l'ensemble de toutes les populations de *C. glaucum* montre une distribution trimodale (Figure 20). L'estimation des F_{st} par paires de populations prises deux à deux à partir des données mitochondriales montre des valeurs significatives entre toutes les populations étudiées (Tableau 15). Une représentation de cette différenciation basée sur la méthode du cadrage multidimensionnel et les distances génétiques de Nei (1978) (Figure 21) montre que les localités MM et E sont les plus éloignées du reste d'un point de vue génétique. Cette dernière étant la plus isolée. Le test de Mantel n'a pas relevé de corrélation significative entre la matrice F_{st} et les distances géographiques construit à partir du patron général du courant marin ($r=0.368$, $p=0.11$) ou en prenant en compte les distances entre les localités sur la carte ($r=0.410$, $p=0.007$).

Etude de la structure génétique de populations de la coque Cerastoderma glaucum en méditerranée occidentale

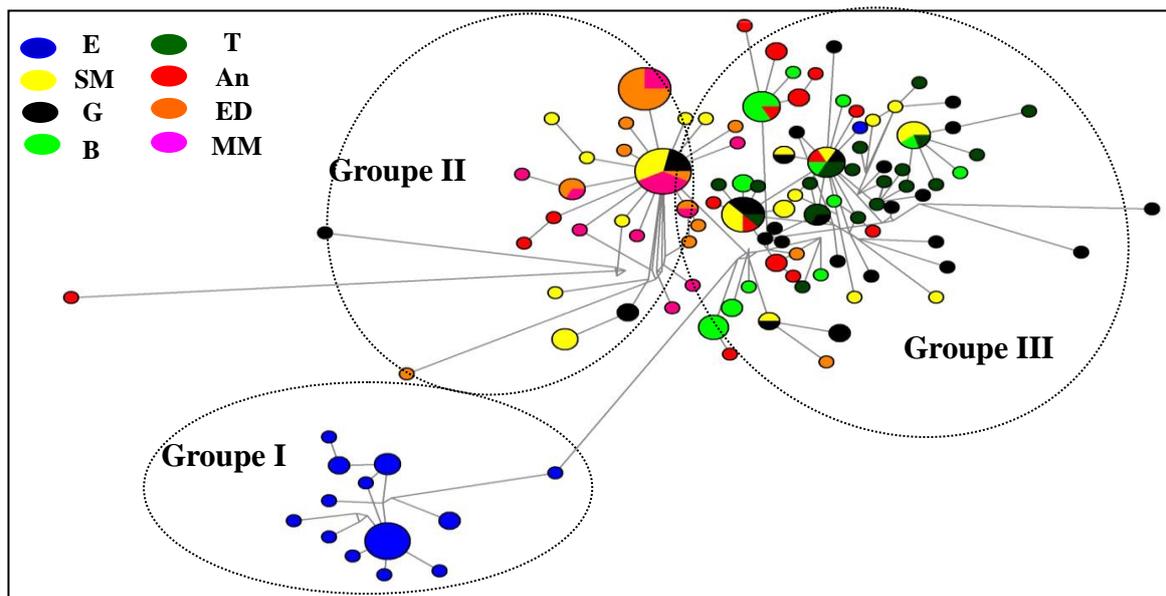


Figure 19 Réseau de relation entre les séquences de COI montrant les relations entre les haplotypes de *C. glaucum* issues de différentes populations (voir le tableau 1 pour les abréviations).

Tableau 14 Analyse moléculaire de la variance (AMOVA) pour le marqueur mitochondrial COI aux niveaux intra et inter populationnel au sein des populations de *C. glaucum*.

Sources de variations	Degrée de liberté	Somme des carrées	Composantes de la variance	Pourcentage de variation
Inter- populationnel	7	9.155	0.04071 Va	8.13
Intra -populationnel	161	74.040	0.45988 Vb	91.87
Total	168	83.195	0.50059	
Indice de Fixation	FST: 0.08133			

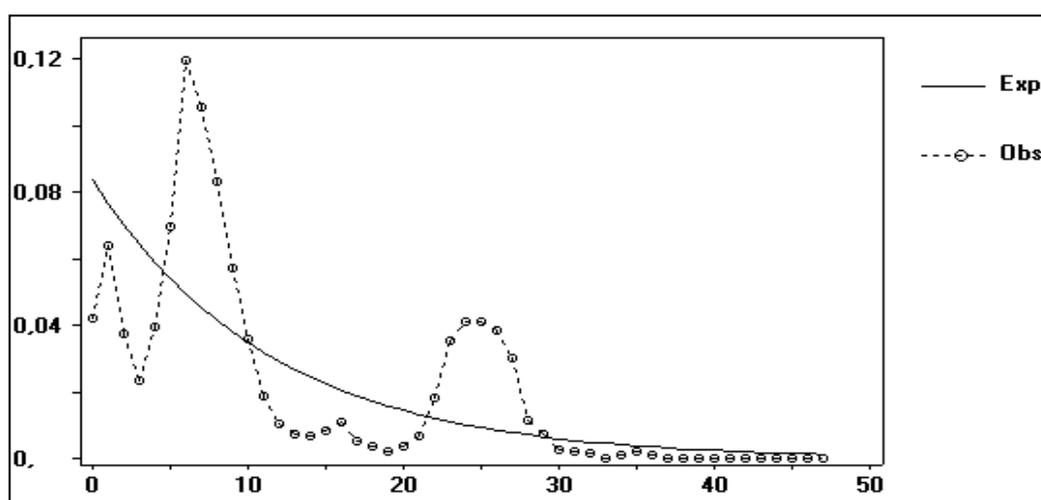


Figure 20 Distribution des mésappariements pour le marqueur mitochondrial COI de l'ensemble des populations de *C. glaucum*.

Etude de la structure génétique de populations de la coque Cerastoderma glaucum en méditerranée occidentale

Tableau 15 Fst par paires de population obtenues à partir des données mitochondriales (les valeurs en gras sont significatives) (Voir le tableau.1 pour les abréviations).

	G	SM	E	T	B	An	MM	ED
G								
SM	0.02850							
E	0.07600	0.08818						
T	0.01726	0.02877	0.07761					
B	0.05060	0.06250	0.11163	0.05140				
An	0.05069	0.06375	0.11937	0.05143	0.08982			
MM	0.12034	0.13368	0.18379	0.12389	0.15903	0.17643		
ED	0.04851	0.06044	0.11001	0.04925	0.08381	0.08769	0.15804	

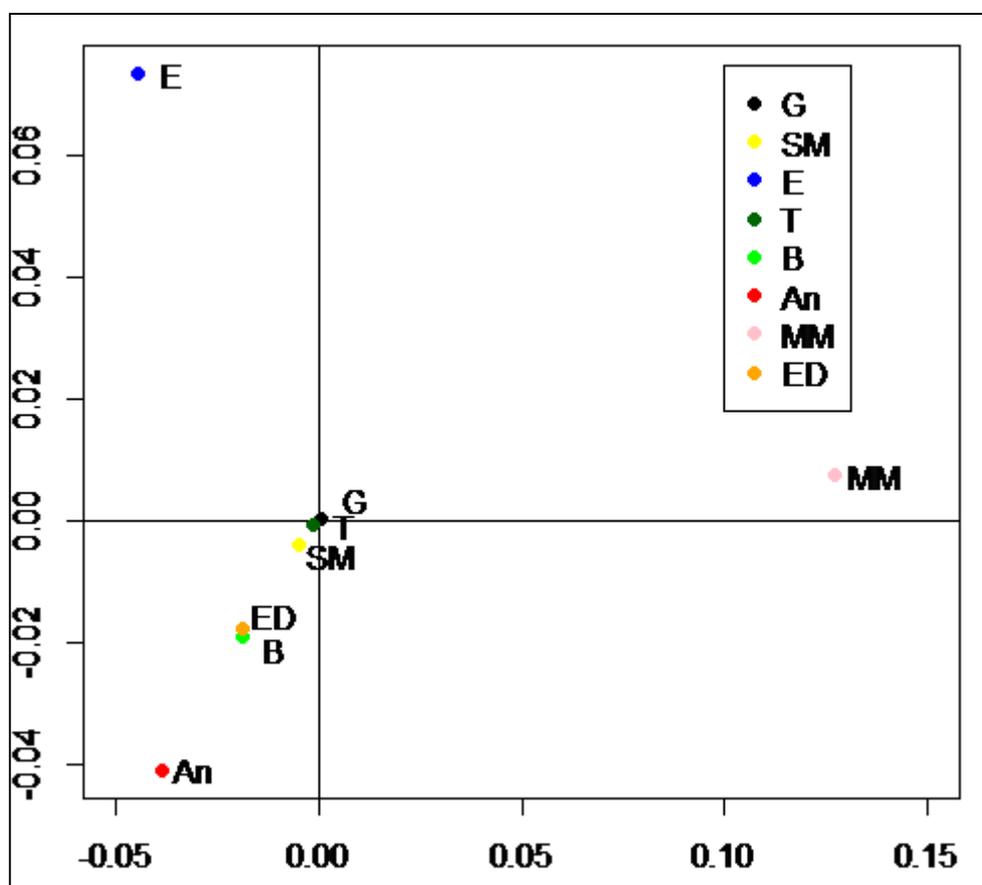


Figure 21 Méthode de cadrage multidimensionnelle (MDS) pour le marqueur mitochondrial COI basée sur la matrice de distances génétiques FST. (Voir le tableau 1 pour les abréviations).

2.2. Marqueur nucléaire ITS1

Le réseau de relation par la méthode « median joining » (Figure 22) établi en se basant sur les données nucléaires montre l'absence d'une véritable structuration génétique entre les populations étudiées. Une grande diversité haplotypique intra populationnelle est démontrée à

Etude de la structure génétique de populations de la coque Cerastoderma glaucum en méditerranée occidentale

travers cette représentation. L'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) confirme cette constatation. En effet, la quasi-totalité de la variance (87%) est exprimé au niveau intra populationnel contre une très faible proportion (13%) au niveau inter populationnel (Tableau 16). L'analyse démographique par la méthode des mésappariements réalisée sur l'ensemble des populations de *C. glaucum* montre une distribution multimodale (Figure.23). L'estimation des F_{st} par paires de populations pris deux à deux à partir des données nucléaires a montré des valeurs significatives pour la plupart des populations étudiées (Tableau 17). Une représentation de cette différenciation basée sur la méthode du cadrage multidimensionnel et les distances génétiques de Nei (1978) (Figure 24) montre que la localité T est la plus éloignée du reste d'un point de vue génétique. Aussi, cette représentation nous a montré la présence de deux groupes séparés selon leurs distances génétiques : le premier est formé par les localités SM, B et An et le deuxième par les localités Espagnoles (ED et MM) et la population Tunienne G. Le test de Mantel n'a pas révélé de corrélation significative entre la matrice F_{st} et les distances géographiques construit à partir du patron général du courant marin ($r=0.335$, $p=0.081$) ou en prenant en compte les distances entre les localités sur la carte ($r=0.410$, $p=0.058$).

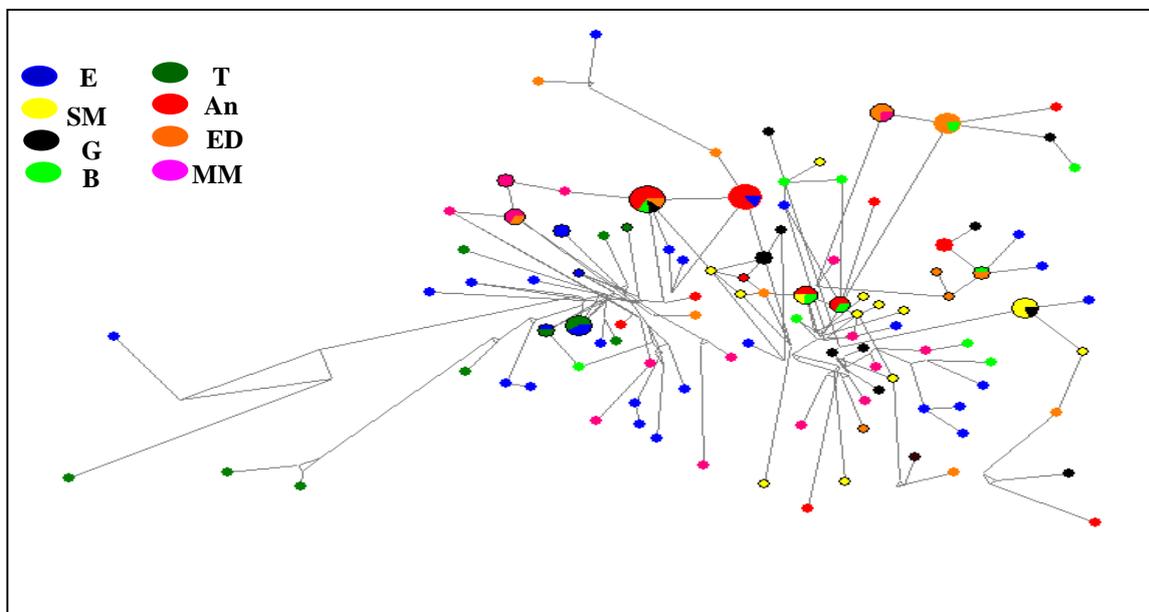


Figure 22 Réseau de relation entre les séquences ITS1 montrant les relations entre les haplotypes de *C. glaucum* issues de différentes populations (voir le tableau 1 pour les abréviations).

Etude de la structure génétique de populations de la coque *Cerastoderma glaucum* en méditerranée occidentale

Tableau 16 Analyse moléculaire de la variance (AMOVA) aux niveaux intra et inter populationnel au sein des populations de *C. glaucum*

Sources de variations	Degré de liberté	Somme des carrées	Composantes de la variance	Pourcentage de variation
Inter- populationnel	7	208.455	01.4656 Va	12.72
Intra -populationnel	106	1065.720	10.0539 Vb	87.28
Total	113	1274.175	11.519	
Indice de Fixation	FST: 0.12723			

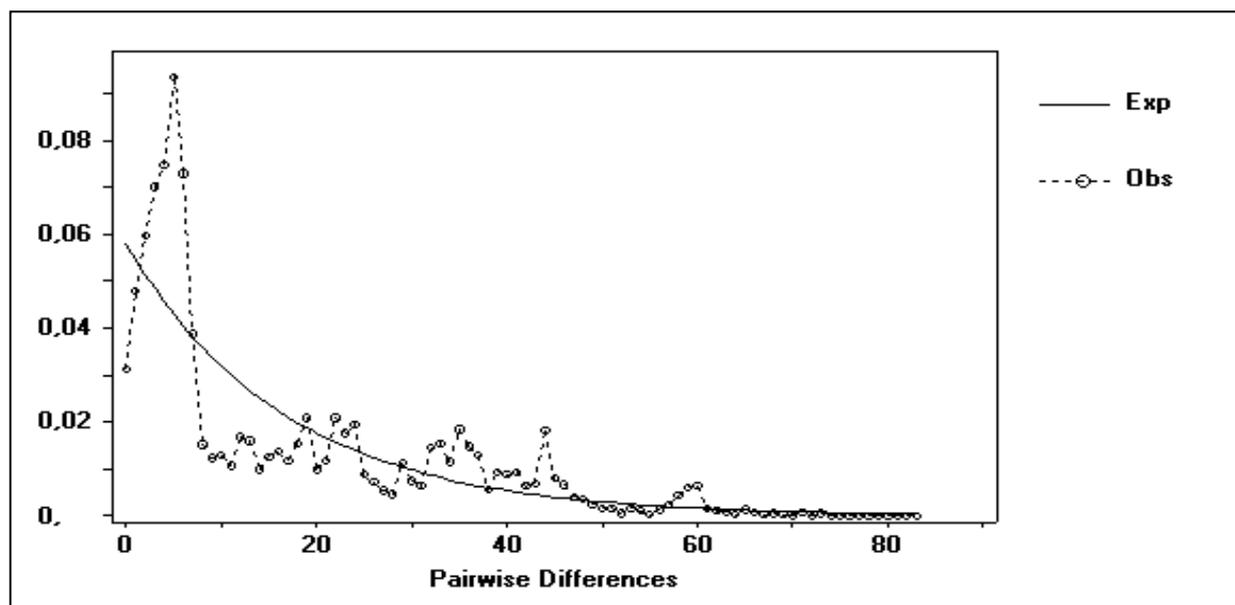


Figure 23 Distribution des mésappariements de l'ensemble des populations de *C. glaucum*

Tableau 17 Fst par paires de population obtenues à partir des données nucléaires. (Les valeurs en gras sont significatives) (Voir le tableau.1 pour les abréviations).

	G	SM	E	T	B	An	MM	ED
G								
SM	0.62605							
E	0.52076	0.11482						
T	0.50736	0.23460	0.04616					
B	0.63572	0.04810	0.12316	0.23674				
An	0.68164	0.04412	0.15734	0.30566	0.07301			
MM	0.04832	0.69944	0.56990	0.58074	0.70320	0.73052		
ED	0.00589	0.67898	0.55715	0.55694	0.68384	0.71630	0.01539	

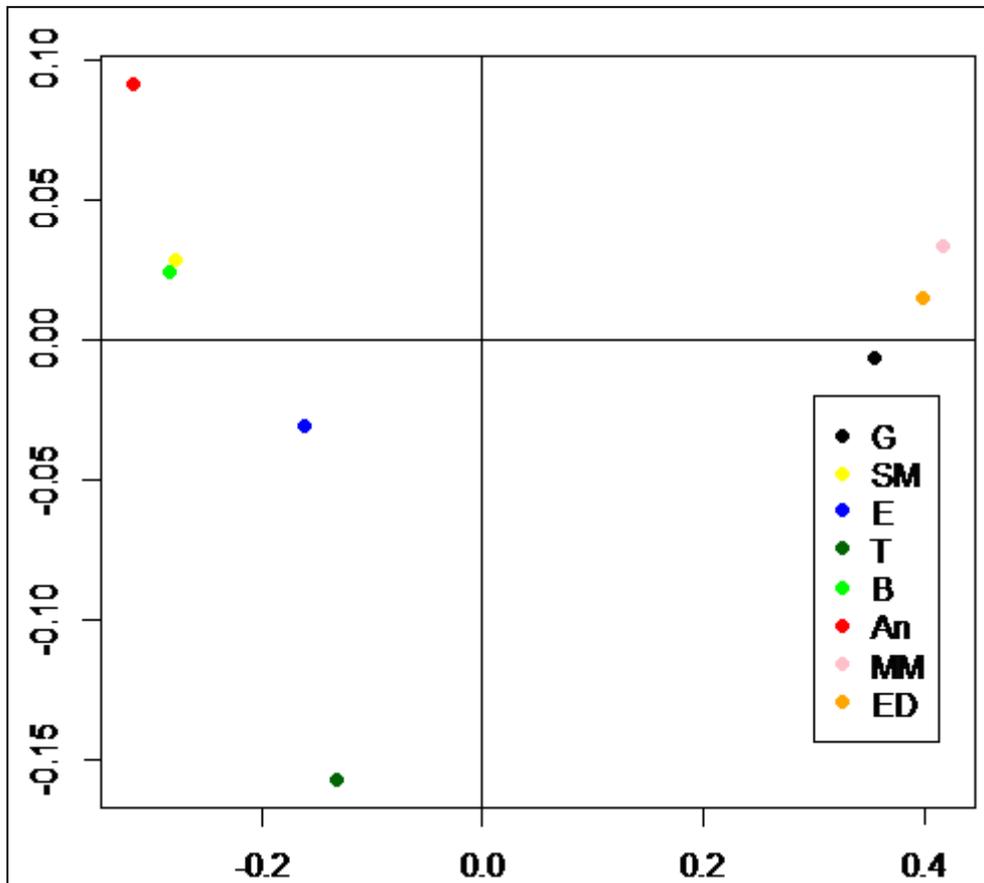


Figure 24 Méthode de cadrage multidimensionnelle (MDS) pour le marqueur nucléaire ITS1 basée sur la matrice de distances génétiques FST. (Voir le tableau 2 pour les abréviations).

III. Discussion

Ce travail présente une étude de la structure génétique de *C. glaucum* en Méditerranée occidentale en utilisant deux marqueurs génomiques, l'un mitochondrial (COI), l'autre nucléaire (ITS1). Les résultats relevés par ces deux types de marqueurs ont montré des similitudes dans la composition nucléotidique des séquences, dans le polymorphisme de l'ADN, dans les résultats des mésappariements au niveau inter et intra populationnel, dans les résultats de l'analyse moléculaire de la variance (AMOVA) ainsi que pour les résultats du test de Mantel. Cependant, des différences sont observées dans les réseaux de relations établies par les deux marqueurs ainsi que pour la méthode de cadrage multidimensionnelle et les distances génétiques de Nei (1978). Cette différence peut être provoquée par les propriétés différentes de ces marqueurs et par le fait qu'elles sont potentiellement influencées de manière différente par les forces de l'évolution comme la démographie de la population et la sélection naturelle (Féral 2002 ; Chan et Levin 2005 ; Chenuil 2006).

1. Diversité génétique

Une grande variabilité dans la composition nucléotidique des séquences mitochondriales et nucléaires est observée. Les séquences ITS1 ont des teneurs de l'ordre de 60% en C+G. Cette teneur est beaucoup plus importante que celle décrite chez les moules (35%) par Insua et al. (2003). Pour les COI, la composition en C+G est de l'ordre de 40%. Cette valeur est aussi plus importante que celle trouvée chez les moules *M. edulis* (37.40%) (Riginos et Henzler 2008) et *M. galloprovincialis* (35.50%) (Zardi et al. 2007).

De forts polymorphismes des ADNs mitochondrial et nucléaire sont aussi observés à travers les valeurs des indices H_d et π . Ces deux indices présentent des valeurs élevées en comparaison avec les travaux de Tarnowska et al. (2010) sur la même espèce *C. glaucum*, Becquet (2011) sur le bivalve *Macoma balthica* et Gérard (2008) sur le bivalve *Mytilus* spp.

Cette forte diversité tant au niveau haplotypique que nucléotidique a été confirmée par les deux types de marqueurs et peut s'expliquer soit i) par l'existence de lignées bien différenciées qui coexistent après un contact secondaire entre populations séparées pendant un temps long, soit ii) par l'existence de populations de taille efficace grande et stable pendant une longue période de leur histoire évolutive et jusqu'à aujourd'hui (Castellanos et al. 2012). Parmi ces deux hypothèses, celle d'une population grande et stable est mieux adaptée à notre cas d'étude puisque les résultats de l'analyse démographique par la méthode des mésappariements à montré pour les deux marqueurs des profils multimodaux caractéristiques de populations stables qui n'ont pas subi d'expansion démographique au cours du temps (Rogers et Harpending 1992). Ainsi, cette grande diversité nucléotidique des populations méditerranéennes étudiées sans trace d'expansion démographique rejoignent les résultats de Tarnowska et al. (2010) et indique que ces zones de la méditerranées pourraient être l'origine ancestrale de *C. glaucum* et que probablement ces zones ont servi de refuge pour cette espèce pendant les cycles glaciaires du Pléistocène. Tous ces résultats plaident donc en faveur d'une grande variabilité génétique démontrée pour les deux types de marqueurs beaucoup plus importante au niveau intra qu'inter-populationnel par le biais de l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA). Ce résultat est observé aussi dans les réseaux de relation établie pour les deux types de marqueurs à travers le nombre important d'haplotypes présent pour une même population (Figure 19 et Figure 22).

2. Flux géniques entre populations

Les réseaux de relation établis pour les deux marqueurs mitochondrial et nucléaire sont très différents. La structure révélée par l'ADN nucléaire montre l'absence d'une véritable structuration génétique, tandis que la structure révélée par le marqueur mitochondrial montre la présence d'une structuration génétique qui divise les populations de *C. glaucum* en trois groupes. Excepté la population Ellouza, un flux génique important semble exister entre les différentes populations. Trois hypothèses peuvent être émises pour expliquer cet échange de flux de gènes. La première hypothèse concerne **la dispersion des larves de cette espèce par les courants marins**. En effet les données suggèrent que les courants marins peuvent modeler la structuration génétique des populations par le transport des larves d'une population à une autre population ou en agissant comme des barrières avec différents degrés de perméabilité (Gaylord et Gaines 2000 ; Muss et al. 2001 ; Taylor et Hellberg 2006). La validité de cette hypothèse dépend donc étroitement de différents aspects de la biologie de l'espèce comme le type d'œufs produits, benthiques ou pélagiques, la présence de stades larvaires pélagiques et la durée de ces phases de développement. Le lien entre la durée du stade larvaire et la structuration génétique des populations a été objet de nombreuses études, sans aboutir, dans la plupart des cas, à une relation clairement établie (Shulman et Bermingham 1995; Taylor et Hellberg 2006 ; Bay et al. 2006; Bowen et al. 2006). Sachant qu'on est en présence d'un modèle biologique à phase larvaire planctonique de durée assez courte (une semaine), l'hypothèse de dispersion des larves par les courants marins semble peu probable. L'analyse de la circulation des courants marins autour de la Méditerranée constitue un élément d'appréciation de cette hypothèse. Cette circulation (figure 25) a été décrite par Millot et Taupier Letage (2005). D'après ces auteurs, l'eau atlantique pénètre en surface à Gibraltar, s'écoule le long de l'Afrique formant le courant Algérien. Ce courant étant très instable : il génère des méandres qui eux-mêmes forment des tourbillons. Ce courant contourne par la suite les côtes nord Tunisiennes. Au niveau du détroit de Sicile, la vanne d'eau se divise en deux branches la première bifurque vers le nord et pénètre le long des côtes italiennes, les côtes françaises puis les côtes catalanes. La deuxième branche se divise elle même en deux branches : la première se dirige vers le Sud Est et traverse le bassin Ionien puis pénètre dans le bassin levantain alors que la seconde se dirige vers le Sud et va alimenter la circulation au large du Golfe de Gabès. Ce schéma montre clairement qu'il existe des courants d'eau reliant

Etude de la structure génétique de populations de la coque Cerastoderma glaucum en méditerranée occidentale

les localités étudiées : le golfe de Gabès (G, SM, E), les côtes nord tunisiennes, les côtes algériennes (An) malgré l'instabilité des courants et les côtes catalanes (ED et MM). Cependant, malgré ces courants marins, l'hypothèse de dispersion en phase larvaire reste peu probable en raison de la durée assez courte de la phase larvaire chez cette espèce. De plus, le test de Mantel a été utilisé pour détecter des corrélations entre la distance génétique et les distances géographiques établies par deux méthodes : en suivant le patron général du courant marin d'une part et en suivant le littoral d'autre part. Ce test a montré des faibles corrélations non significatives pour les deux types de marqueurs étudiés, l'hypothèse de dispersion en phase larvaire par les courants marins est donc très peu probable. La deuxième hypothèse qu'on peut émettre est un **transport par les eaux de navires**. En effet, plusieurs études ont montré que ce mode de transport est à l'origine de plusieurs invasions d'espèces marines exotiques et qu'il peut parfois même changer complètement la composition des populations et le fonctionnement des écosystèmes (Tarnowska et al. 2010). Il est donc tout à fait probable que ce transport soit à l'origine de flux génique pour des espèces autochtones. Dans le cas de *C. glaucum*, qui est une espèce benthique endogée, ce mode de dispersion ne peut être possible qu'au stade larvaire. Toutefois les localités où *C. glaucum* a été échantillonnée au cours de ce travail ne sont pas tous des endroits de circulation des navires. La localité algérienne An et la localité nord Tunisienne B sont des systèmes lagunaires. Une circulation des navires dans ces zones est donc peu probable. Par conséquent, cette hypothèse est aussi peu plausible dans le cas des populations de *C. glaucum* de cette étude. Une autre voie de flux géniques entre populations de mollusques benthiques est possible par le biais des **oiseaux migrants**. En effet, le transport des invertébrés aquatiques dans leurs différents stades de développement (œufs, larve et adulte) est possible par les oiseaux migrants pour de longues distances pouvant aller jusqu'à 1000 Km (Tarnowska 2010). De nombreuses observations plaident en faveur de cette hypothèse. Des cas où des individus de *C. edule* (espèce ressemblant morphologiquement et écologiquement à *C. glaucum*) ont été observés fixés aux pieds d'oiseaux migrants ont été rapportés (Sanchez et al. 2006, Sanchez et al. 2007). Autour de la Méditerranée, de nombreux oiseaux effectuent des migrations régulières, se reposent et se nourrissent dans les lagunes, les estuaires où se développent des populations de *C. glaucum* (Tarnowska 2010). Cette dernière hypothèse doit donc être retenue pour expliquer au moins partiellement l'ampleur des flux génique en méditerranée occidentale.

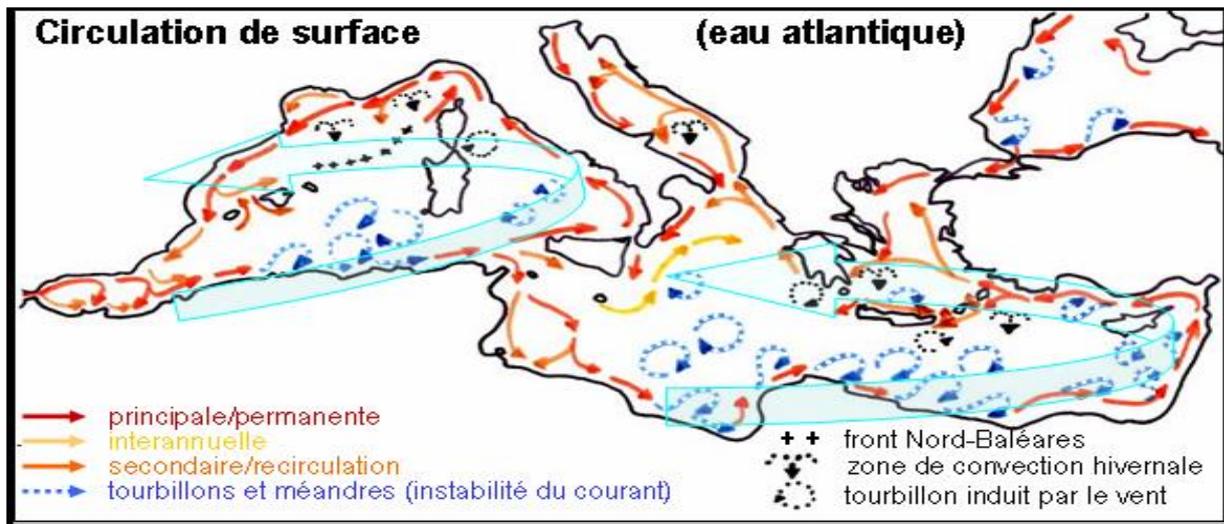


Figure 25 Patron général du courant marin autour de la méditerranée. Extrait de Millot et Taupier Letage (2005).

3. Population distincte d'Ellouza

Le réseau de relation entre les séquences COI par la méthode « Median joining » et la visualisation de la divergence des populations par l'approche « MDS » basée sur les distances génétiques de Nei (1978) s'accordent pour indiquer que la population d'Ellouza est distincte de toutes les autres populations. De plus, les tests de neutralité sélective ont souligné des résultats significatifs pour cette population, ce qui suggère soit l'hypothèse d'un changement démographique soit celle de phénomènes de sélection naturelle. Ainsi, la population d'Ellouza est génétiquement structurée avec un flux génique limité avec toutes autres populations. Trois hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce résultat. La première concerne l'**isolement allopatrique** qui peut être défini comme étant un isolement géographique des populations d'une même espèce se traduisant par un isolement reproductif et une absence de flux géniques entre ces populations. Cette hypothèse est peu plausible du fait que la population Ellouza est située géographiquement à proximité de deux populations SM et G qui ont de forts échanges avec toutes les autres populations. La deuxième hypothèse concerne le **changement démographique** c'est-à-dire le changement dans la taille de la population au cours du temps (expansion ou réduction). Cette hypothèse a été vérifiée par la méthode des mésappariements qui a montré une distribution bimodale pour la population Ellouza (Figure 16) caractéristique d'une population stable qui n'a pas changé de taille au cours du temps (Rogers et Harpending 1992). Donc cette hypothèse est aussi peu probable. La troisième hypothèse concerne la **sélection naturelle**. En effet, face aux contraintes de l'environnement, les génotypes les

mieux adaptés dans une population (et ainsi les caractères phénotypiques) sont favorisés via une sélection naturelle. Les différentes actions de cette sélection sont susceptibles de générer des différenciations entre populations, reflet d'une adaptation locale avec émergence des phénotypes présentant les meilleurs fitness (Kawecki et Ebert 2004). Dans le cas de la population d'Ellouza cette hypothèse reste à prouver par d'autres analyses sur les conditions environnementales, anthropiques et climatiques du site Ellouza ainsi que par l'utilisation d'autres marqueurs moléculaires (nucléaires et mitochondriales). Rappelons en fait qu'avec le marqueur nucléaire ITS1, aucune différence n'a été montrée pour cette population.

IV. Conclusion partielle

Deux résultats majeurs résultent de l'étude de la structure génétique de *C. glaucum* en Méditerranée occidentale.

- Ces populations présentent une grande diversité génétique probablement due à l'origine de l'espèce-cible qui est la Méditerranée occidentale et qui représentait une zone de refuge pendant la période glaciaire du Pléistocène.
- Le marqueur mitochondrial a relevé une population distincte de toutes les autres populations et qui nécessite une étude particulière pour expliquer l'origine de cette différence. Dans la suite de ce travail, nous envisageons une étude écotoxicologique pour cette population en relation avec d'autres populations à proximité pour essayer d'expliquer l'origine de cette différence.

Chapitre III.B

**Réponse adaptative des populations naturelles
de la coque *Cerastoderma glaucum* dans des
sites présentant différents niveaux de pollution**

I. Introduction

Très peu d'études permettent d'évaluer sans ambiguïté les effets des pollutions sur les organismes dans leur milieu naturel. En effet, de nombreux facteurs confondants peuvent intervenir tels que les facteurs environnementaux (variables climatiques, conditions physicochimiques, quantité et qualité de la nourriture disponible), les paramètres liés aux cycles de vie de l'espèce (reproduction, saisonnalité), la compétition intra- et inter-spécifique ainsi que la pression parasitaire. Dans ce sens, la représentativité des études sur le terrain doit passer par une minimisation de ces facteurs en choisissant des sites témoins et contaminés ne différant entre eux, dans la mesure du possible, que par le minimum de substances polluantes. Dans la plupart des cas, les sites non contaminés ou non perturbés n'existent pas au sein des zones anthropisées, il faut alors utiliser les sites les moins contaminés comme site de référence.

Le golfe de Gabès (situé sur les côtes sud Est de la Tunisie) occupe un endroit privilégié au centre de la méditerranée. Cette zone présente des caractéristiques topographiques et biologiques particulières qui lui confèrent l'aspect d'une zone d'élevage, zone qui favorise la reproduction et le développement de nombreuses espèces y compris la coque *C. glaucum*. Cependant, cette région représente aussi la zone la plus industrialisée du sud Tunisien à cause de l'installation de grandes agglomérations industrielles (Sfax, Skhira, Gannouch, Gabès, Djerba et Zarzis) dont les rejets, rarement traités, sont déversés directement dans la plaine littorale. Les caractéristiques de cette région rendent possible la mise en place d'une étude des réponses écotoxicologiques de la coque *C. glaucum* en milieu naturel.

Dans ce contexte, nous avons réalisé une étude de la réponse adaptative des populations de *C. glaucum* en milieu naturel dans des environnements contrastés de la région du golfe de Gabès y compris le site d'Ellouza. Cette réponse a été étudiée à différents niveaux de l'organisation biologique allant du niveau individuel jusqu'au niveau cellulaire et moléculaire.

Les objectifs de cette partie étaient i) d'effectuer une étude préliminaire dont le but était de sélectionner trois sites qui diffèrent par leur degrés de contamination ii) une fois les sites sélectionnés, d'étudier l'effet des différences de niveau de contamination sur les populations naturelles de *C. glaucum* à différents niveaux de l'organisation biologique : le niveau physiologie de l'individu par l'étude de certains paramètres physiologiques globaux (stress-on-stress, indice de condition et le sex-ratio), le niveau organe par l'étude de certains

paramètres biochimiques (dosage des métaux, des réserves énergétiques, du malonaldéhyde (MDA) et de l'acétylcholine estérase (ACE) dans les tissus des coques), le niveau cellulaire par l'étude histologique du cycle reproducteur et du déroulement de la gamétogenèse et finalement le niveau moléculaire par l'étude de l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse à différents types de stress : métallothionéine (MT), transporteurs à ATP Binding Cassette (ABCB1), superoxydes dismutases, (MnSOD et CuZnSOD), catalase (CAT), protéines de choc thermique (HSP70) et cytochrome-c oxydase représentée par le gène de sa sous unité-1 (COI).

1. Les biomarqueurs étudiés

1.1 Le malondialdéhyde (MDA)

Le MDA est le produit terminal de la dégradation lipidique. Sa teneur est en étroite relation avec les dégradations de la membrane cellulaire. Il permet de montrer l'effet d'une pénétration d'un xénobiotique dans l'organisme. Il constitue donc un indicateur précoce et par conséquent il peut être utilisé comme biomarqueur du stress oxydatif (Del Rio et al. 2005; Lykkesfeldt 2007).

1.2 Les Acétylcholinestérases (AChE)

Les AChE sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des esters de la choline et plus particulièrement de l'acétylcholine. Présente dans les jonctions inter-neuronales, le rôle le plus connu de cette enzyme est son implication dans la transmission correcte de l'influx nerveux. Une fois l'information transmise, l'acétylcholine est rapidement inactivée par l'AChE, ce qui permet au système nerveux de revenir à son état de repos. L'inhibition de l'AChE par de nombreux neurotoxiques ainsi que par les métaux provoque une accumulation de l'acétylcholine dans l'espace synaptique ce qui maintient une transmission permanente de l'influx nerveux causant de nombreuses anomalies tel que la tétanie, la paralysie puis la mort (Bocquené 1996). L'inhibition de l'AChE a été décrite chez plusieurs bivalves par différents types de polluants : des métaux comme le Cd chez la coque *C. glaucum* (MachrekiAjmi et al. 2008) et le Cu chez la palourde *Ruditapes decussatus* (Hamza-Chaffai et al. 1998), des pesticides chez la moule *M. galloprovincialis* (Mora et al. 1999), et notamment des organochlorés comme chez la palourde *R. philippinarum* et l'huître *Crassostrea gigas* (Bris et al. 1995).

1.3 Les réserves énergétiques

Il est toujours important de prendre en compte les réserves énergétiques dans les études écotoxicologique puisque la synthèse, la mobilisation et l'utilisation des substances antitoxiques ont un coût énergétique pour l'organisme (Gismondi 2012). Les réserves énergétiques sont constituées par les lipides, le glycogène et les protéines.

3.1 Les lipides

Ils jouent un rôle important en tant qu'élément structural de la membrane biologique et forment une sorte de réserve durant les périodes de carences alimentaire ou de reproduction. Les lipides sont souvent utilisés comme source d'énergie durant la gamétogenèse et jouent un rôle dans la formation des spermatozoïdes et des ovocytes (Perez-Camacho et al. 2003). L'utilisation des lipides comme source d'énergie induit un phénomène de lipolyse permettant aux organismes de les dégrader afin de produire l'énergie nécessaire à leur métabolisme de base (réaction enzymatique, synthèse moléculaire,...) (Gismondi 2012).

3.2 Le glycogène

Source d'énergie immédiatement disponible pour les activités courantes, comme la locomotion (Sparkes et al. 1996), mais également utilisée dans les processus d'osmorégulation, de croissance, ou encore pendant les périodes de reproduction et de carences alimentaires (Oliveira et al. 2004 ; Rosa et Nunes 2003 ; Gismondi 2012). Le taux de glycogène d'un individu est susceptible d'être affecté lors de coûts physiologiques à court terme, contrairement aux lipides qui ne seraient affectés que lors de besoins énergétiques à long terme (Plaistow et al. 2001).

3.3 Les protéines

Les protéines sont des constituants structuraux, fonctionnels et énergétiques. Elles constituent la fraction la plus importante des ovocytes et des muscles et assurent le rôle de fournisseurs d'énergie chez de nombreux bivalves tel que les Vénéridés (Trigui-El Menif 1995 ; Perez-Camacho et al. 2003), les Mytilidés et les Pectinidés (Mathieu et Lubet 1993). Les protéines sont généralement mobilisées lors d'un stress sévère, nécessitant probablement une grande quantité d'énergie pour les systèmes de défense (Gismondi 2012).

1.4 Le stress-on-stress

Le « stress-on-stress » est un test qui donne une évaluation globale de l'état de santé des organismes sans indiquer le type de contaminant présent dans le milieu (Viarengo et al. 1995).

*Réponse adaptative des populations naturelles de la coque *Cerastoderma glaucum* dans des sites présentant différents niveaux de pollution*

Ce test évalue la capacité des organismes à supporter les conditions d'anoxie. Il consiste à ajouter un stress anoxique à des animaux déjà perturbés dans leur milieu d'origine. Il repose sur le principe que plus l'animal est perturbé dans son milieu d'origine, moins il résisterait à un second stress (Viarengo et al. 1995 ; Hamza-Chaffai et al. 1998 ; Ladhar-Chaabouni et al. 2008).

1.5 L'indice de condition

Cet indice est considéré comme étant représentatif de l'état nutritionnel et de l'état des réserves énergétiques d'un individu. Un indice faible est synonyme d'un animal souffrant de conditions environnementales difficiles, de sous alimentation ou d'infection parasitaire. Etant facilement mesurable, cet indice est donc souvent utilisé dans les études s'intéressant à différentes sources de stress.

1.6 Le sex-ratio

Il indique le rapport entre le nombre de mâles et le nombre de femelles dans une population donnée, c'est-à-dire la proportion de chacun des sexes. Il peut être influencé par plusieurs paramètres tels que la qualité du milieu, le climat, la densité des populations l'infection parasitaire et l'effort de reproduction. Il est de plus en plus utilisé comme biomarqueur dans plusieurs études écotoxicologiques en relation avec le cycle reproducteur (Ketata 2008 ; Machreki-Ajmi 2009).

1.7 Les Métallothionéines (MTs)

Ce sont les protéines les plus sensibles à la contamination métallique chez de nombreux organismes marins y compris les bivalves (Naimo 1995 ; Amiard et al. 2006 ; Choi et al. 2007 ; 2008 ; Zorita et al. 2007). Elles ont aussi un rôle de détoxification bien étudiée chez plusieurs invertébrés marins (Bebianno et Langston 1991; Roesijadi 1992; Viarengo et Nott 1993). Ce sont des protéines de faible masse moléculaire qui peuvent être induites par les ions métalliques cytosoliques libres, en particulier le Cd, Cu, Zn et Hg, et sont impliquées dans la défense contre la toxicité des métaux (Klaassen et al. 1999 ; Andrews 2000 ; Hamza-Chaffai et al. 2000 ; Tanguy et al. 2001 ; Ladhar-Chaabouni et al. 2008).

1.8 Les transporteurs à ATP Binding Cassette (ABC) -B1

Ce sont des pompes membranaires ATP dépendantes permettant de réduire la toxicité cellulaire par l'expulsion des éléments toxiques hors de la cellule (Pain et Parant 2003 ; 2007 ; Minier et al. 2006). Les transporteurs ABC sont présents chez tous les organismes vivants

*Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum
dans des sites présentant différents niveaux de pollution*

sous forme de 7 familles dont la famille ABC-B. La protéine ABC-B1 est aussi connue sous le nom de P-glycoprotéine et est la plus étudiée (Pèrez Tomas 2006 ; Zaja et al. 2007). Elle présente, comme tous les transporteurs ABC, une structure en quatre domaines : deux domaines hydrophobes, formant le site de reconnaissance du substrat, et deux domaines hydrophiles conservés, impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP (Pèrez Tomas 2006). L'ABC-B1 est le principal transporteur responsable de l'export des composés n'ayant pas été modifiés par le métabolisme cellulaire (Zaja et al. 2007). L'expression et l'activité de cette protéine peuvent être induites par les métaux tels que le Cd, Cu, Zn et Hg (Achard 2005).

1.9 Les protéines de choc thermique (HSP70)

Appartenant à la famille des chaperonnes, les protéines de choc thermique sont très répandues chez tous les organismes vivants. Elles jouent un rôle très important dans la réparation des protéines endommagées ou leur élimination lorsque celles-ci ne peuvent plus être réparées. Elles fonctionnent comme des chaperons moléculaires accompagnant, surveillant et protégeant les autres protéines (Frydman 2001 ; Harlt et Hayer-Harlt 2002). En termes de recherche écotoxicologique, ces protéines sont des biomarqueurs importants pour plusieurs facteurs de stress, y compris la pollution métallique, et leur induction est donc un signe d'effets indésirables des substances testées (Lewis et al. 1999 ; Perceval et al. 2001 ; Köhler et al. 2001; Radlowska et Pempkowiak 2002). Parmi les protéines de choc thermique, les HSP70 sont les plus ubiquistes et universelles. HSP70 est impliquée dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées ou endommagés ainsi que dans la séquestration et la dégradation des protéines qui sont endommagées sans espoir de réparation (Mayer et Bukau 2005). Un certain nombre d'études ont montré que les HSP70 sont synthétisées de façon intensive dans la cellule en réponse à une variété de facteurs de stress, y compris la chaleur, les métaux tels que le Pb et le Cd et les contaminants organiques (Tedengren et al. 1999).

1.10 Les superoxydes dismutases

La famille des superoxydedismutases (SOD) est l'une des familles de métallo-enzymes antioxydantes les plus importantes. Elles catalysent les réactions de transformation des radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire. Selon leur contenu en métal, les SOD sont classées en quatre groupes distincts comprenant MnSOD, CuZnSOD, FeSOD et NiSOD. Parmi ces SOD, MnSOD et CuZnSOD sont les plus étudiées chez les invertébrés marins (Geret et al. 2004; Chenghua et al. 2011; Huan-Huan et al. 2010).

*Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum
dans des sites présentant différents niveaux de pollution*

L'importance de la CuZnSOD réside dans sa fonction physiologique. Cette enzyme a besoin des ions cuivre et du zinc pour son activité biologique et un manque en cuivre conduit à son inactivation complète. La CuZnSOD se trouve sous deux isoformes présentes dans la plupart des organismes. La CuZnSOD extracellulaire (ec CuZnSOD), présentant un signal de clivage peptidique N-terminal pour la sécrétion, se trouve dans la matrice extracellulaire des tissus. La CuZnSOD intracellulaire (ic CuZnSOD), sans signal peptidique, se trouve principalement dans l'espace intracellulaire et aussi dans l'espace intermembranaire des mitochondries. La MnSOD, contenant l'ion manganèse, se retrouve principalement dans la matrice mitochondriale (mt MnSOD) (Weisiger et Fridovich 1973), mais certaines MnSOD cytosoliques (cMnSOD) ont également été observées (Brouwer et al. 2003). Une importance particulière a été accordée à la MnSOD du fait de son rôle dans la destruction des métabolites ROS dans la matrice mitochondriale. De plus, il a été montré que cette protéine joue un rôle dans la promotion de la différenciation cellulaire et la tumorigenèse (St Clair et al. 1994), dans la réponse immunitaire induite par des bactéries (Jung et al. 2005; Cheng et al. 2006), dans la réponse aux infections virales (Zhang et al. 2007) ou encore dans la réponse à l'exposition à des produits chimiques toxiques (Kim et al. 2007).

1.11 La catalase (CAT)

Enzyme héminique, la catalase contient un atome de fer dans chacun des quatre hèmes qui constituent ses sites actifs. Son rôle principal réside dans la protection contre les effets toxiques du peroxyde d'hydrogène en catalysant sa décomposition en eau et en oxygène (Veldhoen et al. 2009 ; Bigot et al. 2009).

1.12 La cytochrome-c-oxydase (COI)

La sous unité I de la cytochrome-c-oxydase (COI) est un élément du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. Elle catalyse le transfert d'électrons du ferrocyclochrome c à l'oxygène moléculaire qui est alors réduit pour former de l'eau et utilise l'énergie ainsi libérée pour pomper des protons H⁺ dans l'espace intermembranaire (Achard 2005). Le gène COI est fréquemment utilisé en phylogénie moléculaire car il constitue une signature moléculaire au niveau spécifique. Ceci est également un avantage pour son utilisation comme biomarqueur. On peut également s'attendre à observer une régulation similaire de l'expression du gène COI chez les différentes espèces (Achard et al. 2006). De nombreux travaux ont mis l'accent sur l'expression de ce gène et ont démontré que son expression est

modifiable par l'exposition aux métaux chez les bivalves (Navarro et al. 2011 ; Achard et al. 2006). Le Cd en particulier, s'est avéré capable d'inhiber la chaîne de transfert d'électrons dans les mitochondries et induire la production de ROS (Wang et al. 2004).

II. Résultats

A. Etude préliminaire

Dans cette étude préliminaire, nous avons essayé d'évaluer l'état de pollution des sites retenus dans la région du golfe de Gabès en se basant sur l'analyse des deux métaux le cadmium et le plomb, *in toto* dans les coques issues des différents sites. Les prélèvements de *C. glaucum* réalisés dans six sites soumis aux divers rejets industriels et urbains avaient pour objectif de comparer l'état de contamination de différents sites afin de sélectionner trois d'entre eux dont l'un sera considéré comme site de référence, le deuxième comme étant moyennement contaminé et le dernier comme étant fortement contaminé. Le choix des deux métaux Cd et Pb se justifie par le fait que ce sont parmi les métaux non essentiels les plus susceptibles d'être métabolisés et concentrés au niveau des organismes marins. Ils représentent donc des marqueurs bioaccumulables témoins de la pollution du milieu (MachrekiAjmi 2009). Les teneurs en Pb (Figure 26-A) n'ont pas permis de différencier les sites étudiés. Cependant, les variations de la teneur en Cd (Figure 26-B) montrent que la valeur la plus forte en Cd est enregistrée au niveau du site Gargour (25µg/g de poids frais). Ce site a été donc retenu comme étant un site fortement contaminé pour la suite de cette étude. Le site Ellouza présente la teneur la plus faible en Cd (0,860 µg/g de poids frais), il a donc été retenu comme étant un site de référence. Le site Gargour présente des teneurs en Cd 29 fois plus importantes que les teneurs enregistrés au niveau du site Ellouza. Le site Sidi Mansour a été retenu pour ses valeurs intermédiaires entre les deux sites précédents (7,46µg/g de poids frais, soit 4 fois moins pollué en Cd que le site Gargour et 7 fois plus pollué en Cd que le site d'Ellouza) et pour sa richesse en *C. glaucum*.

Suite à ces résultats, des sédiments prélevés sur les trois sites retenus ont été analysés en ICP afin d'évaluer leur composition en métaux (Tableau 18). Les métaux étudiés sont Cd, Cu, Zn, Ni, Cr, Mn et Pb. La composition des trois sédiments montre des valeurs très importantes surtout en Zn, Cr et Mn. Le site Gargour est en général le plus riche pour les différents métaux étudiés, suivi par le site Sidi Mansour puis le site Ellouza. Seul le Cd présente des valeurs

**Réponse adaptative des populations naturelles de la coque *Cerastoderma glaucum*
dans des sites présentant différents niveaux de pollution**

supérieures au seuil toxique établi par Long et al. (1955) (Tableau 18). Pour tous les autres métaux, les valeurs issues des trois sites étaient inférieures à ces seuils.

Suite à cette étude préliminaire, nous avons étudié la réponse adaptative de *C. glaucum* sur les trois sites, à différents niveau de l'intégration biologique allant du niveau individuel jusqu'au niveau moléculaire et et cellulaire.

Tableau 18 Composition en métaux des sédiments issus des trois sites Ellouza, Sidi Mansour et Gargour et valeurs de seuil toxiques établies par Long et al. 1955. Les résultats sont exprimés en mg/kg de sédiment sec.

Sites	Cd	Cu	Zn	Ni	Cr	Mn	Pb
Ellouza	0,818	7,040	52,960	0,727	20,320	47,120	12,370
Sidi Mansour	1,440	5,160	53,680	0,972	24,100	46,460	11,730
Gargour	1,813	10,112	60,320	1,353	29,860	45,940	12,750
Seuil de toxicité	1.2	34	150	20.9	81	-----	47.6

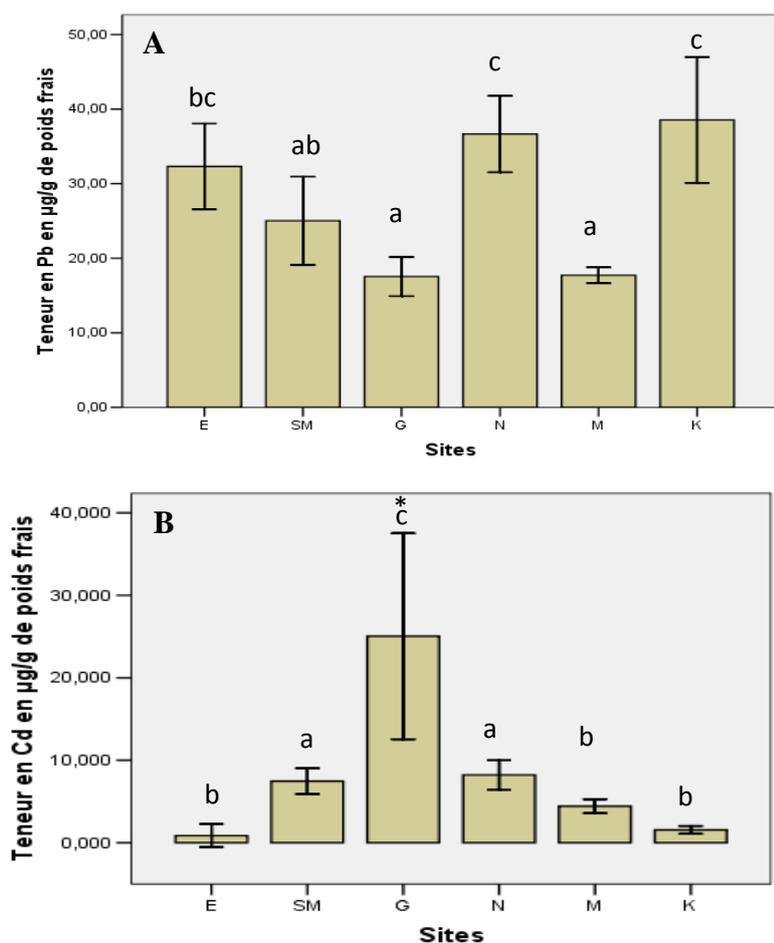


Figure 26 Concentrations moyennes en Pb (A) et Cd (B) affectées des intervalles de confiance 95% *in toto* (n=15) des coques issus des six sites. E : Ellouza ; SM : Sidi Mansour ; G : Gargour ; N : Nakta ; M : Mahrès et K : Kerkanah. Les résultats sont exprimés en µg/g de poids frais. Les moyennes marquées par des lettres différentes sont statistiquement différentes (p<0.05).

B. Niveau individuel

1. Le test de stress-on-stress

Afin de suivre et de comparer les capacités physiologiques des coques issues des trois sites à supporter l'anoxie, le temps auquel on observe 50% de coques mortes (LT50) est pris en considération (Figure 27). Les résultats obtenus montrent que les coques issues du site contaminé Gargour sont les moins aptes à résister à l'anoxie (3 jours < LT50 < 4 jours) suivies par les coques du site intermédiaire Sidi Mansour qui présentent une LT50 de 5 jours. Les coques du site de référence Ellouza sont les plus résistantes à l'anoxie et présentent une LT50 de 6 jours.

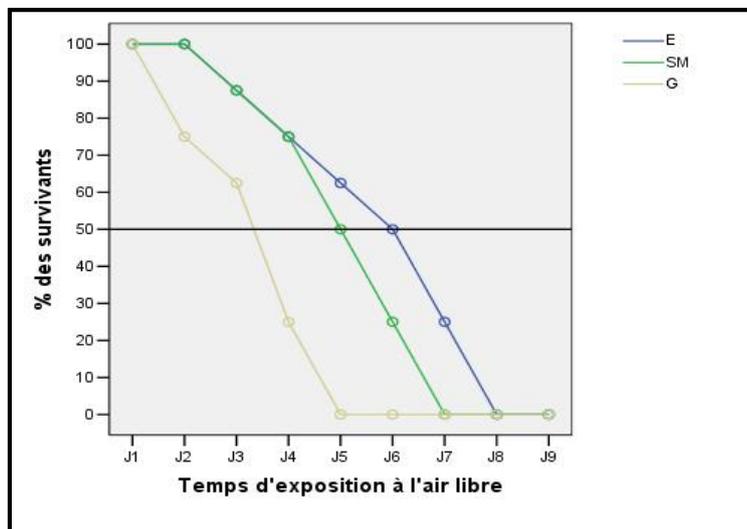


Figure 27 Expériences de stress-on-stress sur des coques issues des trois sites (Ellouza (E) ligne bleue, Sidi Mansour (SM) ligne verte et Gargour (G) ligne beige). La figure donne la variation du pourcentage des survivants en fonction du temps d'exposition à l'air libre.

2. L'indice de condition

Un suivi de l'indice de condition (IC) a été réalisé d'une manière bimensuelle entre la période allant d'octobre à décembre sur les trois sites (Figure 28). Les résultats obtenus montrent que cet indice évolue d'une manière synchrone sur les trois sites, il diminue significativement entre octobre et mi-novembre puis ne varie presque pas pour les autres prélèvements. La comparaison des valeurs des IC inter-sites montre que les individus du site Gargour présentent les valeurs de l'IC les plus faibles suivies par les individus du site Sidi Mansour puis ceux du site Ellouza

Réponse adaptative des populations naturelles de la coque *Cerastoderma glaucum* dans des sites présentant différents niveaux de pollution

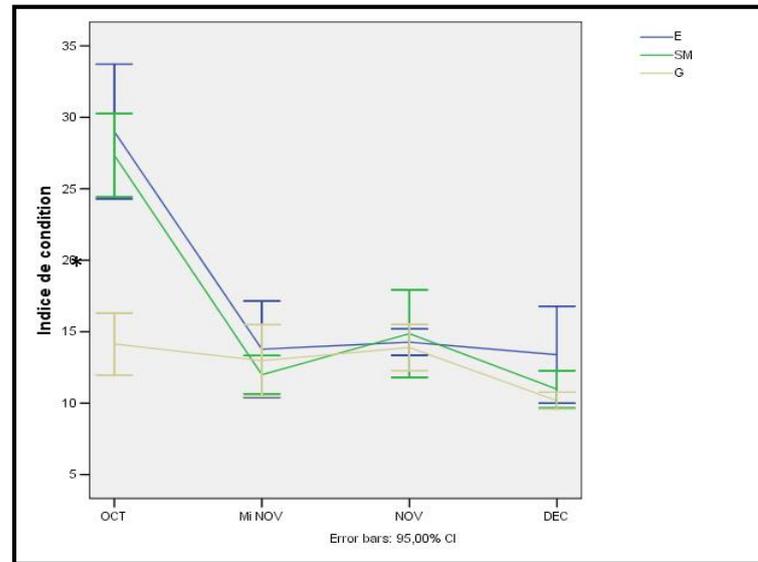


Figure 28 Evolution de l'indice de condition(IC) de coques issues des trois sites Ellouza (E), Sidi Mansour (SM) et Gargour (G) pour la période allant d'octobre à décembre. Les valeurs représentent la moyenne \pm EC pour n=15. (*) Différence significative ($p < 0,05$).

3. Le sex-ratio

La comparaison inter-site du sex-ratio est représentée sur la Figure 29. Les résultats obtenus montrent que ce paramètre évolue en faveur des femelles lorsque la pollution du milieu augmente. Il est équilibré pour le site de référence Ellouza et fortement déséquilibré pour le site contaminé Gargour.

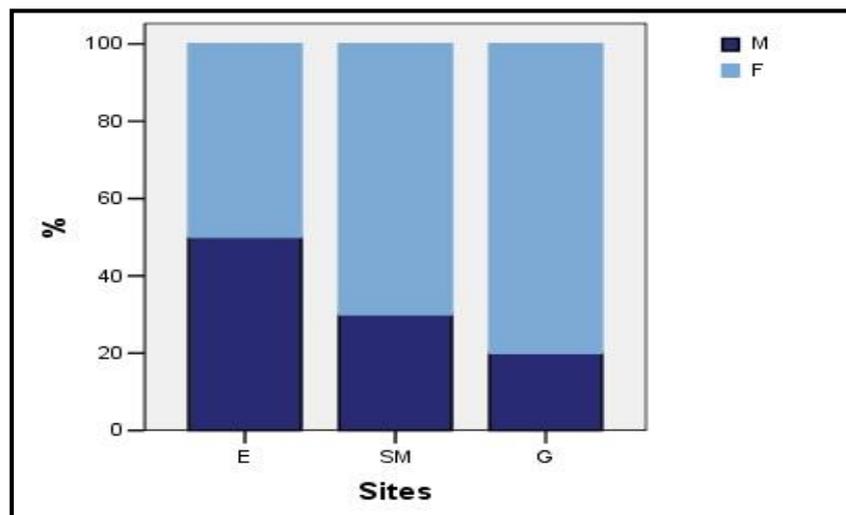


Figure 29 Répartition du sex-ratio des coques issues des trois sites Ellouza (E), Sidi Mansour (SM) et Gargour (G). (n=60) M : mâles, F : femelles.

C. Niveau organe

1. Teneur en Cd, Cu, Zn et Ni chez les coques issues des trois sites

Les teneurs en Cd, Cu, Zn et Ni ont été analysées chez des coques dont les branchies ont été retirées. Le dosage des métaux a donc été effectué sur le reste de l'animal, c'est à dire sur l'ensemble des organes suivants : muscle adducteur, gonade, glande digestive, pied et manteau. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 30. Ces résultats montrent que sur les trois sites, les teneurs en Zn sont les plus importantes suivies par celles du Ni puis le Cu et finalement le Cd qui présente les teneurs les plus faibles. La comparaison inter-sites pour chaque métal montre que, exception faite du Ni, le site contaminé Gargour présente significativement les teneurs les plus importantes en différents métaux et le site de référence Ellouza présente significativement les valeurs les plus faibles.

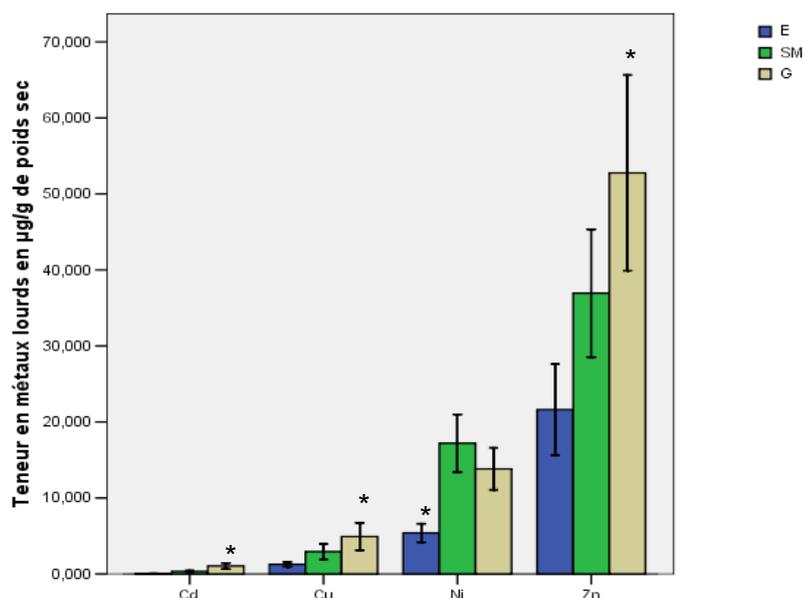


Figure 30 Concentration en Cd, Cu, Zn et Ni (moyenne \pm IC) (n=20) chez les coques issues des trois sites Ellouza (E), Sidi Mansour (SM) et Gargour (G).(*) Différences significatives inter-sites ($p < 0,05$).

2. Réserves énergétiques, malondialdéhyde (MDA) et Activité cholinestérase (AChE)

Les variations des teneurs en réserves énergétiques (glycogènes lipides et protéines ; respectivement Figures 31-A, 31-B et 31-C) ont été mesurées dans les gonades des coques issues des trois sites. Les résultats obtenus montrent l'absence de différences significatives inter-sites dans les teneurs en glycogène et en lipides. Par contre, les teneurs en protéines

*Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum
dans des sites présentant différents niveaux de pollution*

augmentent significativement avec la pollution du milieu.

Les variations des teneurs en MDA et de l'activité AChE (Figures 31-D et 31-E) ont été déterminées respectivement dans la glande digestive et dans les branchies de coques issues des trois sites. Les résultats obtenus ont montré l'absence de différences significatives entre les sites. Toutefois, une tendance à la baisse est observée pour l'activité AChE. En effet, l'activité de cette enzyme a tendance à diminuer au fur et à mesure que la pollution du milieu augmente (Figure 31-E).

Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum dans des sites présentant différents niveaux de pollution

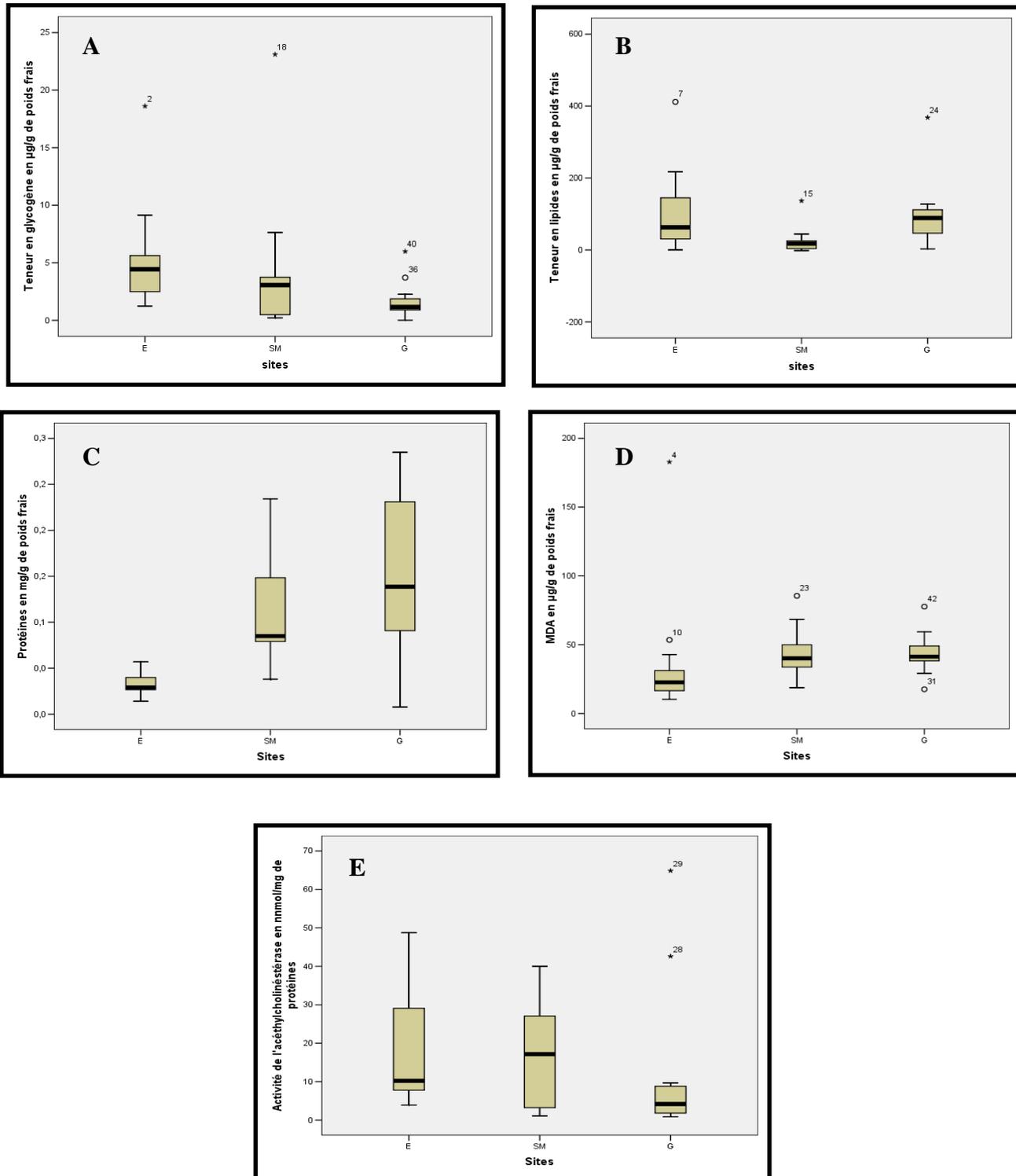


Figure 31 Variation de la concentration moyenne en glycochrome (A), lipides (B) protéines (C), MDA (D) et de l'activité cholinestérase (E) (n=15) affectées des intervalles de confiance (95%) chez les coques issues des trois sites Ellouza (E), Sidi Mansour (SM) et Gargour (G). (*) Différences significatives inter-sites ($p < 0,05$).

D. Niveau cellulaire : étude du cycle reproducteur

1. Rappel des travaux antérieurs

Dans des travaux antérieurs (Karray et al. 2015), l'étude du cycle reproducteur de la coque *C. glaucum* a été réalisée d'une façon mensuelle à partir de coques issues du site Gargour durant une période de 13 mois (Janvier 2007-Janvier 2008). Les résultats obtenus ont montré que le cycle sexuel était de type trimodal : trois périodes de reproduction ont été observées d'une façon synchrone chez les deux sexes. Certains stades reproducteurs n'ont cependant pas pu être observés (maturité et ponte). Suite à ces résultats, nous avons essayé dans ce travail de i) nous focaliser sur une période de reproduction (octobre-décembre 2009) et de faire des prélèvements bimensuels afin de pouvoir visualiser les stades « non observés » (maturité et ponte) et ii) d'effectuer une étude comparative du cycle reproducteur sur les trois sites Gargour, Sidi Mansour et Ellouza afin de vérifier si les différences de niveau de contamination inter-sites ont un effet sur le déroulement de la gamétogenèse.

2. Etude du cycle sexuel

2.1 Description des stades de développement des gonades chez les mâles

La gamétogenèse chez les mâles évolue dans un sens centripète à l'intérieur des tubules gonadiques. L'observation des tissus gonadiques permet de distinguer les stades cytologiques suivants

- **Stade 1, Repos sexuel (R) :** Ce stade est caractérisé par une intense prolifération du tissu de réserve envahissant la gonade. Les tubules gonadiques ne contiennent que des cellules germinales indifférenciées.
- **Stade 2, Développement (D) :** Il ya une augmentation progressive du volume des tubules gonadiques ces derniers sont remplis par des cellules représentant différents stades de développement (spermatogonies, spermatocytes, spermatides).
- **Stade 3, Gamétogenèse (G) :** On rencontre presque tous les stades d'évolution (spermatogonies, spermatocytes et spermatides), les spermatozoïdes existent mais ils sont peu nombreux. Le tissu conjonctif extratubulaire se réduit considérablement et les tubules gonadiques augmentent de volume.
- **Stade 4, Maturité (M) :** Les gonades sont remplies de produits sexuels mûrs et leur volume est maximum. Le tissu conjonctif a quasiment disparu. La spermatogenèse domine,

Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum dans des sites présentant différents niveaux de pollution

les spermatozoïdes sont abondants au centre des follicules, et se regroupent en colonne. Des spermatogonies, des spermatocytes et des spermatides peuvent être présents près de la paroi folliculaire mais ils sont beaucoup moins nombreux que les spermatozoïdes.

- **Stade 5, Ponte (Po)** : Les tubules gonadiques sont partiellement vidés en spermatozoïdes.

- **Stade 6, Passé (Pa)** : Les gamètes non émis sont résorbés et le tissu conjonctif de réserve envahit progressivement les gonades.

Planche 1 : Evolution histologique de la gamétogenèse chez les mâles

Photo 1 : Développement : développement des tubules gonadiques mâles.

Photo 2 : Gamétogenèse : évolution centripète de la gamétogenèse.

Photo 3 : Maturité : les gonades sont remplies de produits sexuels mûrs

Photo 4 : Ponte : vidange partielle des tubules gonadiques mâles.

Photo 5 : Passé : résorption des gamètes non émis.

Tr : tissu conjonctif de réserve

Tg : tubule gonadique

Spg : spermatogonies

Spc : spermatocytes

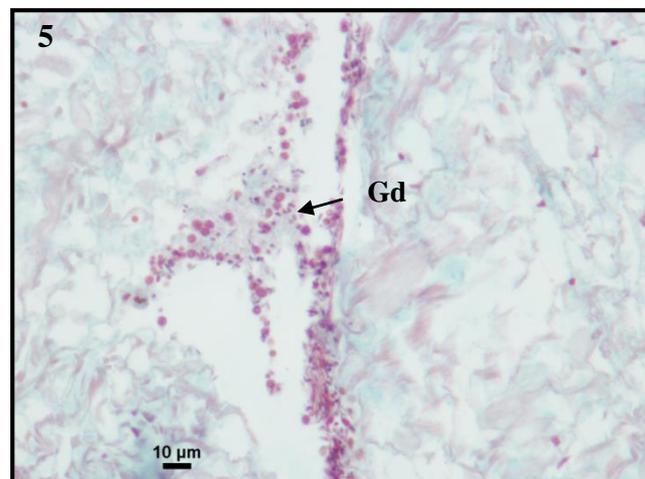
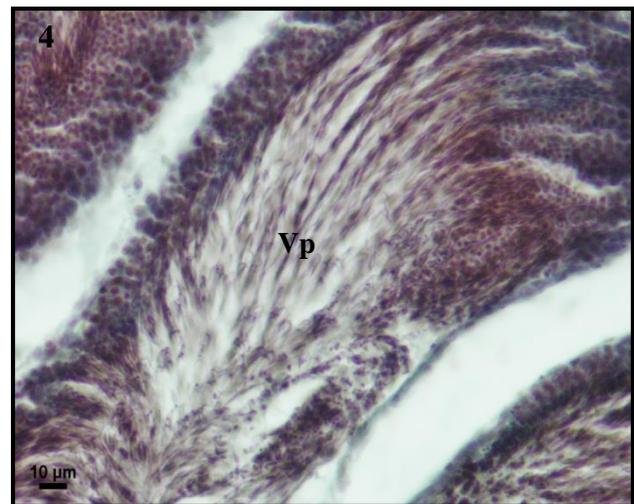
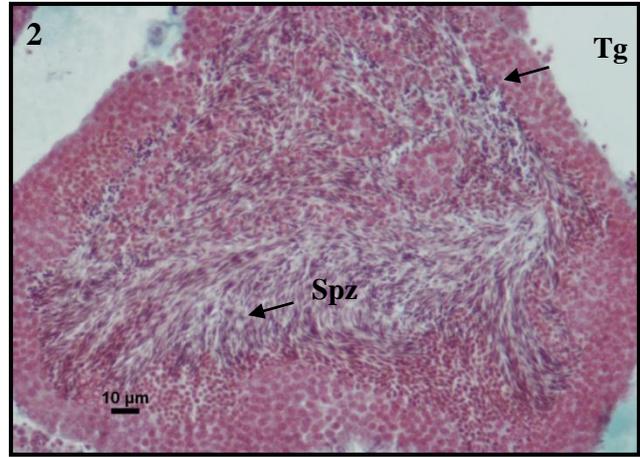
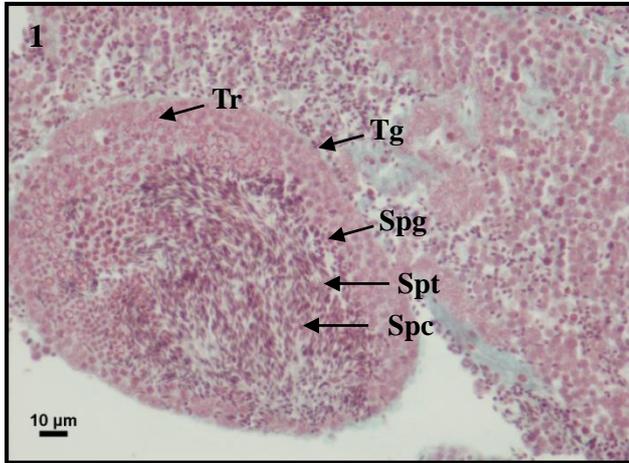
Spt : spermatides

Spz: spermatozoïdes

Vp: vidange partielle des spz

Gd: gamètes en dégénérescences

Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum dans des sites présentant différents niveaux de pollution



*Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum
dans des sites présentant différents niveaux de pollution*

2.2 Description des stades de développement des gonades chez les Femelles

La gamétogenèse chez les femelles évolue à l'intérieur des follicules dans un sens centripète. Au fur et à mesure de la progression de la gamétogenèse, on observe les stades cytologiques suivants :

Stade 1, Repos sexuel (R) : Ce stade est caractérisé par une abondance du tissu conjonctif de réserve et par une absence de l'activité gonadique.

Stade 2, Développement (D) : Les tubules gonadiques contiennent des ovocytes dans leur phase initiale de développement. Il y a une augmentation progressive du volume des tubules gonadiques qui restent envahies dans un important tissu conjonctif de réserve.

Stade 3, Gamétogenèse (G) : L'ovogenèse est active depuis la périphérie vers la lumière des tubules. La population d'ovocytes est caractérisée par une forte hétérogénéité de taille.

Stade 4, Maturité (M) : Les tubules gonadiques sont complètement remplis par des ovocytes matures de taille homogène.

Stade 5, Ponte (Po) : Libération totale ou partielle des gamètes matures.

Stade 6, Passé (Pa) : Résorption des gamètes non émis et envahissement progressif de la gonade par le tissu conjonctif de réserve.

Planche 2 : Evolution de la gamétogenèse chez les femelles

Photo 1 : Développement : les ovocytes se trouvent dans leur phase initiale de développement.

Photo 2 : Gamétogenèse : évolution centripète de la gamétogenèse.

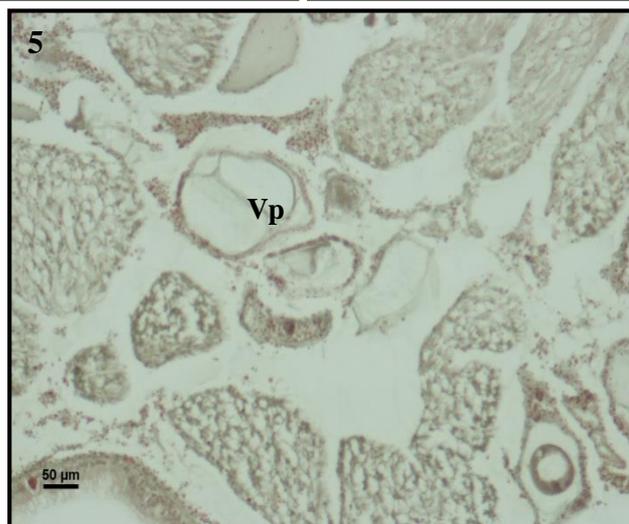
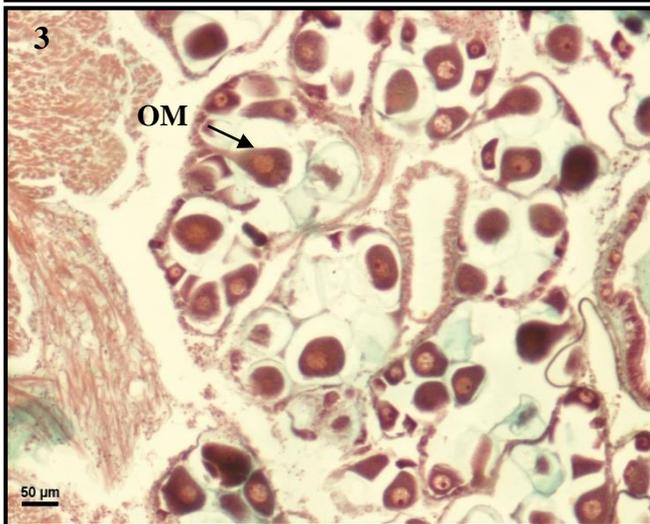
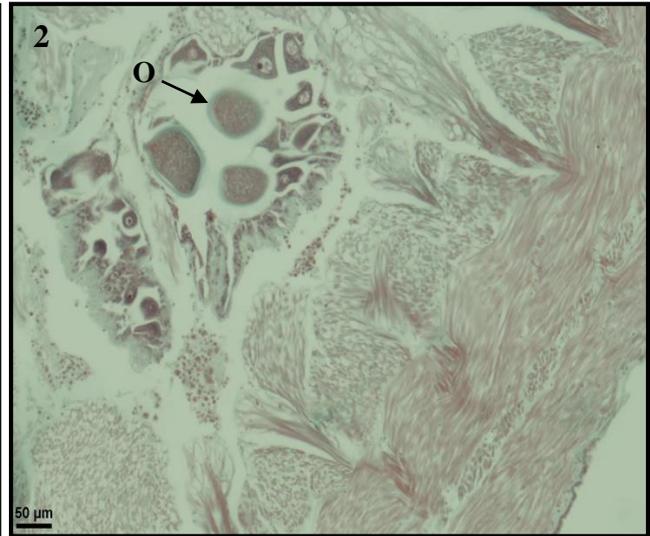
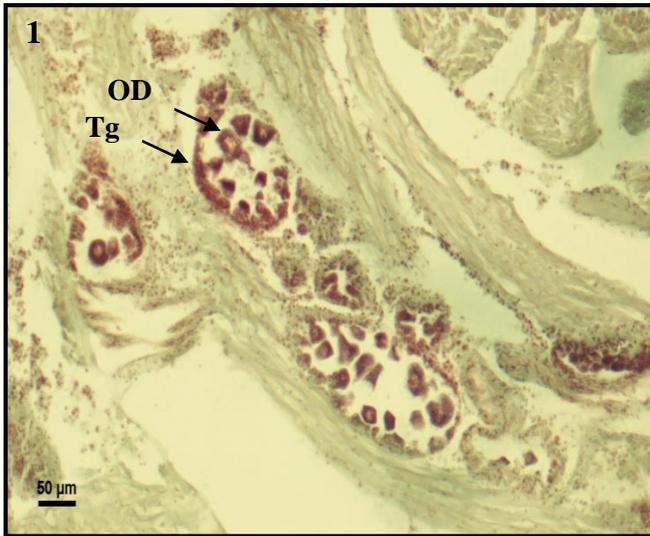
Photo 3 : Maturité : ovocytes de taille homogène.

Photo 4 : Ponte : Libération totale ou partielle des gamètes matures.

Photo 5 : Passé : Résorption des gamètes non émis et envahissement progressif de la gonade par le tissu conjonctif de réserve.

<p>Tg : tubules gonadique OD : ovocyte en développement O : ovocyte OM : ovocyte mûre VP : vidange partiel des ovocytes Gd : Gamètes en dégénérescence</p>

Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum dans des sites présentant différents niveaux de pollution



3. Evolution des stades reproductifs

Aucune différence n'a été décelée dans l'évolution des stades reproductifs entre les mâles et les femelles sur les trois sites étudiés (Figure 32). D'une manière générale, l'évolution de la gamétogenèse se fait pratiquement de la même manière sur les trois sites avec une majorité d'individus au stade développement au premier prélèvement, maturité au deuxième, ponte au troisième et passé au quatrième. Deux différences sont cependant visibles : la première est en début du cycle gamétique sur le site contaminé Gargour avec une majorité d'individus au stade gamétogenèse (stade 3) alors que sur les sites de référence (Ellouza) et intermédiaire (Sidi Mansour), la majorité des individus sont au stade développement (stade 2). La deuxième différence est observée dans le dernier prélèvement (décembre) où les sites plus au moins contaminés (Sidi Mansour et Gargour) sont en avance sur le site de référence (Ellouza) avec des individus en poste ponte.

*Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum
dans des sites présentant différents niveaux de pollution*

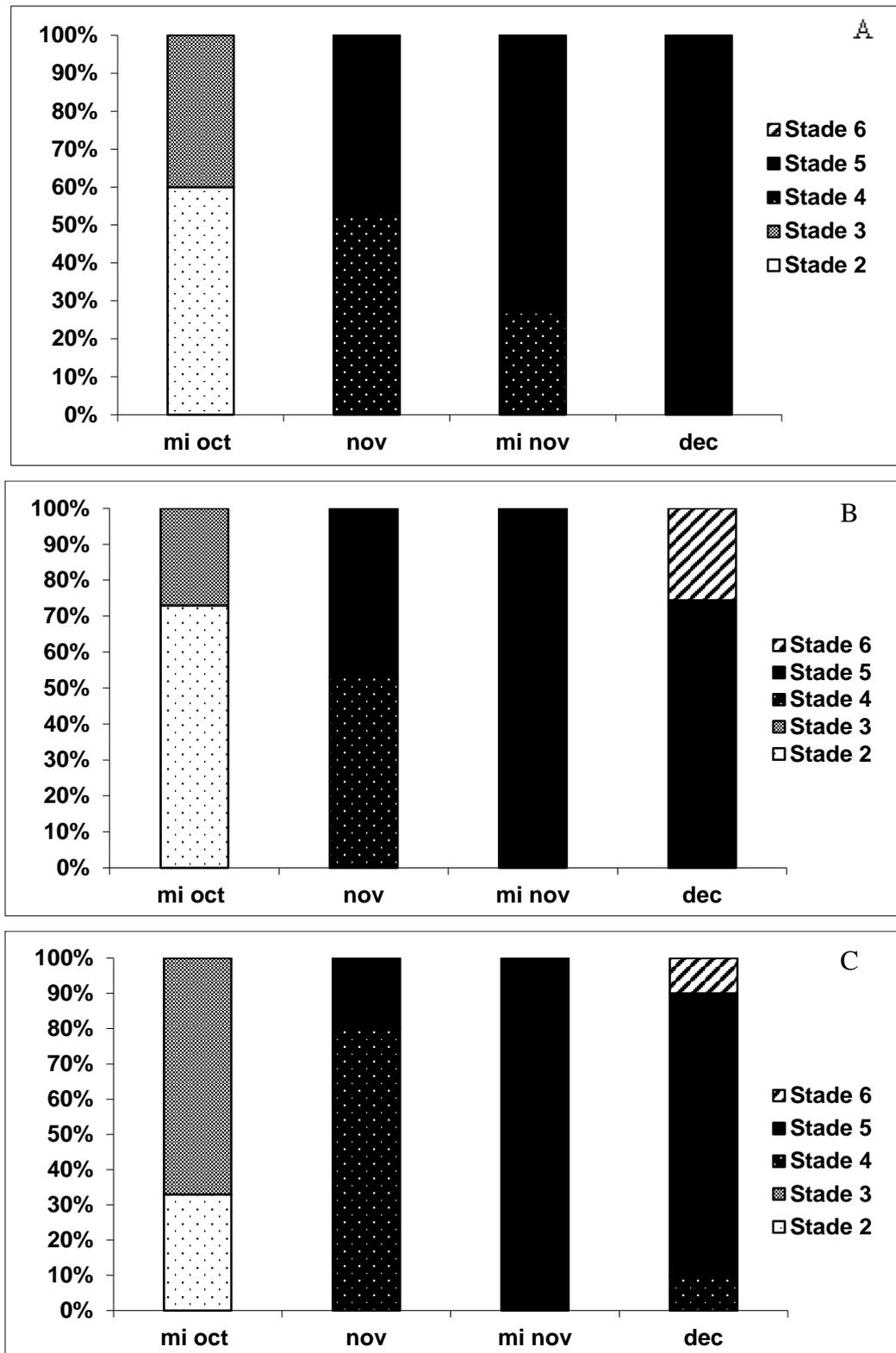


Figure 32 Déroulement de la gamétogenèse chez *C. glaucum* sur les trois sites A : Ellouza, B : Sidi Mansour et C : Gargour. Stade 2 : développement, stade 3 : gamétogenèse ; stade 4 : Maturité ; stade 5 : ponte ; stade 6 : passé.

4. Evolution de l'indice de maturité (IM)

L'évolution de l'indice de maturité sur les trois sites est représentée sur la Figure 33. Les résultats obtenus montrent que l'évolution de cet indice est similaire sur les trois sites aux trois premiers prélèvements. En effet, une augmentation de cet indice est observée entre mi-octobre et mi-novembre correspondant à une évolution de la gamétogenèse qui se déroule de la même manière sur les trois sites. Au dernier prélèvement, une diminution de cet indice est observée chez les individus du site intermédiaire Sidi Mansour et du site contaminé Gargour alors qu'il continue à augmenter chez les individus du site de référence Ellouza. Ces résultats confirment les résultats de l'évolution de la gamétogenèse. En effet les diminutions observées aux sites intermédiaire et contaminé s'expliquent par la présence d'individus au stade « post-ponte » ou « passé » alors que les individus du site de référence sont encore en « ponte » donc aucune chute n'est observable au dernier prélèvement.

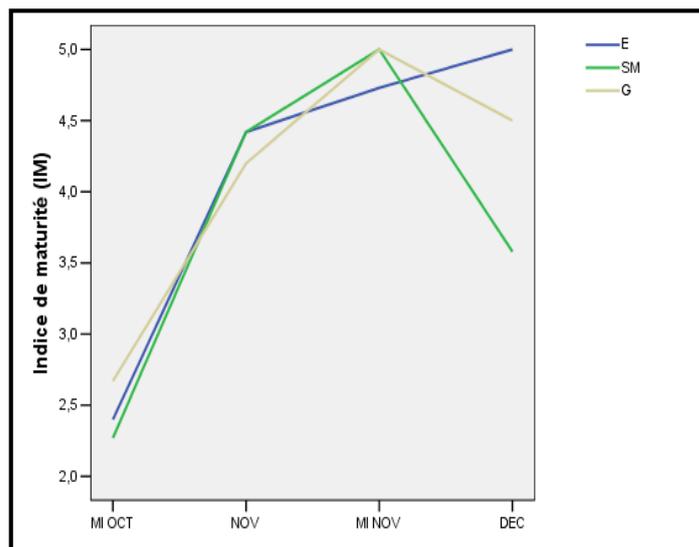


Figure 33 Evolution de l'indice de maturité sur les trois sites : Ellouza (E), Sidi Mansour (SM) et Gargour (G).

5. Evolution du diamètre ovocytaire

La détermination du diamètre ovocytaire a concerné les femelles de *C. glaucum* aux stades développement, gamétogenèse et maturité. Une étude comparative de l'évolution de ce diamètre a été réalisée sur les trois sites Ellouza, Sidi Mansour et Gargour (Figure 34). L'évolution de cet indice est pratiquement la même sur les trois sites. Une augmentation entre octobre et mi-novembre, correspondant à la progression de la

Réponse adaptative des populations naturelles de la coque *Cerastoderma glaucum* dans des sites présentant différents niveaux de pollution

gamétogenèse, est suivie par une chute entre mi-novembre et décembre correspondant à l'émission gamétique. On remarque une nette augmentation du diamètre ovocytaire des femelles du site de référence Ellouza par rapport aux sites intermédiaire Sidi Mansour et contaminé Gargour.

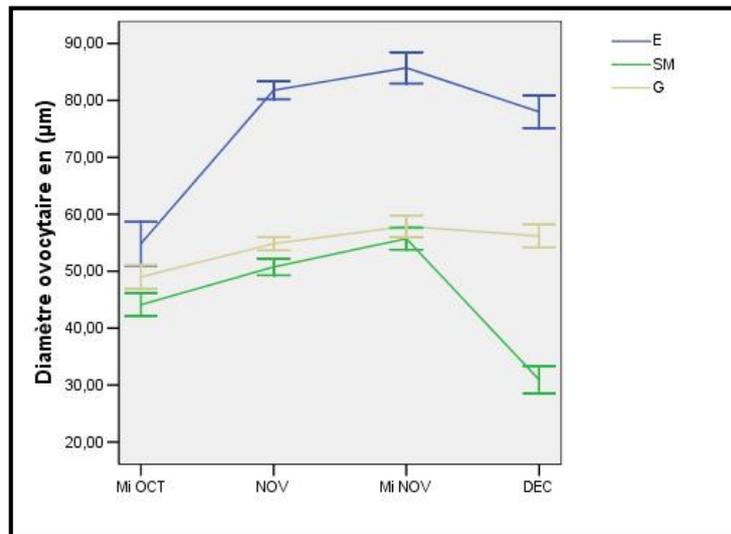


Figure 34 Evolution du diamètre ovocytaire chez *C. glaucum* sur les trois sites : Ellouza (E), Sidi Mansour (SM) et Gargour (G).

E. Niveau Moléculaire

1. Niveau d'expression des gènes

Au niveau moléculaire, l'expression des gènes impliqués dans différents types de stress, à savoir les gènes impliqués dans la détoxification des métaux et des xénobiotiques (MT et transporteur ABCB1), les gènes de défense contre le stress oxydant (MnSOD, CuZnSOD et CAT) ou le stress en général (HSP70) ou encore les altérations mitochondriales (COI) a été étudiée sur les trois sites. Aucune différence n'a été trouvée dans l'expression de ces gènes entre mâles et femelles et les résultats obtenus pour les 2 sexes ont donc été regroupés. Les résultats obtenus montrent que peu de différences dans les niveaux d'expression des gènes ABCB1, MT, CuZnSOD et MnSOD sont observées sur les trois sites (Figure 35). Pour les HSP70, le profil général montre que l'expression de ce gène diminue significativement au fur et à mesure que la pollution du milieu augmente (Figure 35). En effet, le niveau d'expression le plus important est enregistré au niveau du site de référence Ellouza alors que le niveau le plus faible est enregistré au niveau du site contaminé Gargour.

Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum dans des sites présentant différents niveaux de pollution

Pour la CAT, le niveau d'expression est similaire sur les sites intermédiaire Sidi Mansour et contaminé Gargour et il est significativement surexprimé de trois fois par rapport au site de référence Ellouza (Figure 36). Le même profil d'expression est observé pour le gène COI (Figure 36) à la différence que le niveau d'expression de ce gène est significativement surexprimé de 1000 fois sur les sites intermédiaire et contaminé par rapport au site de référence.

*Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum
dans des sites présentant différents niveaux de pollution*

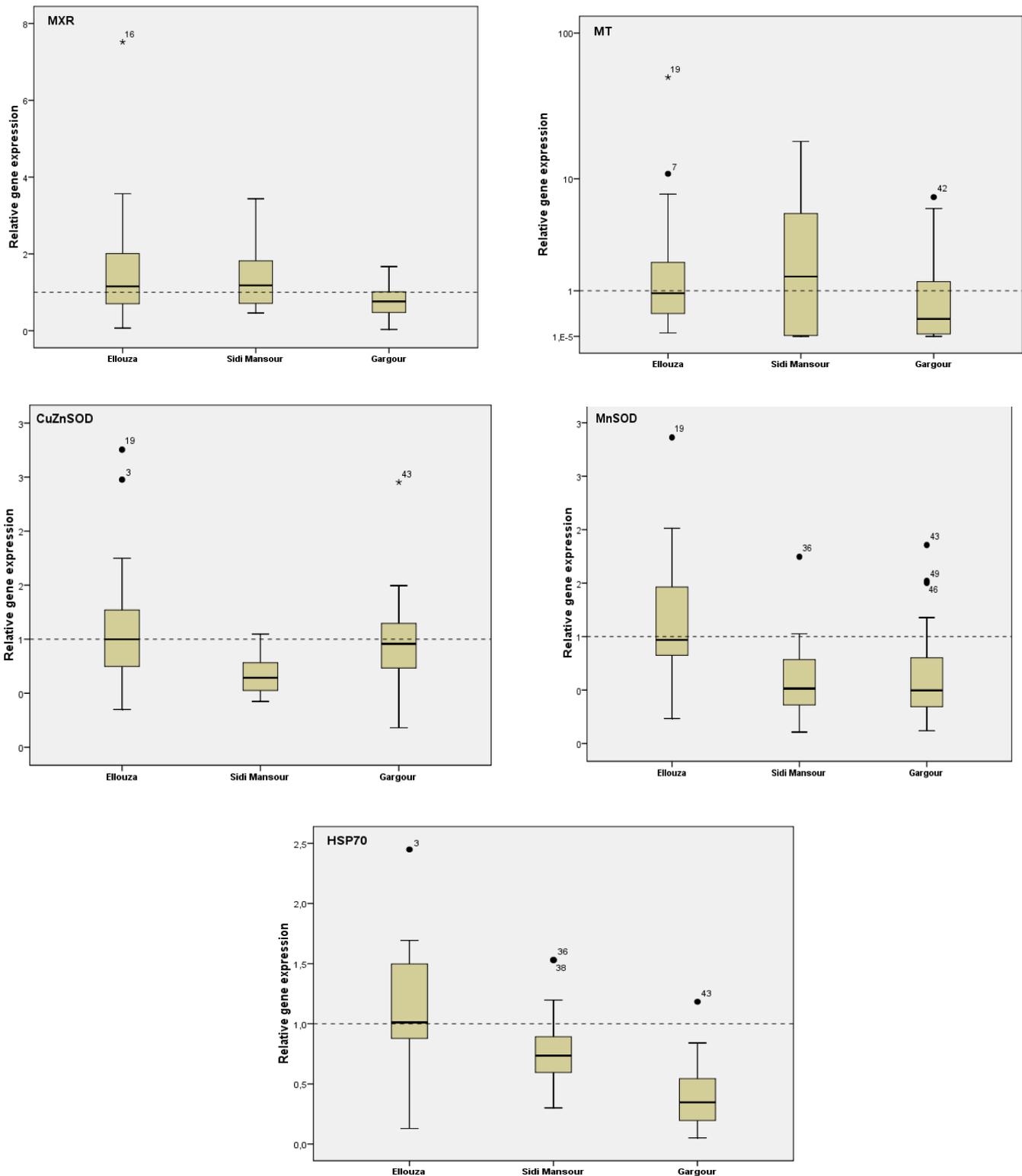


Figure 35 . Profil d'expression relative des gènes ABCB1, MT, CuZnSOD, MnSOD et HSP70 sur les trois sites Ellouza, Sidi Mansour et Gargour. Les différences des niveaux d'expression (échelle logarithmique) sont exprimées par rapport aux individus du site de référence Ellouza.

**Réponse adaptative des populations naturelles de la coque *Cerastoderma glaucum*
dans des sites présentant différents niveaux de pollution**

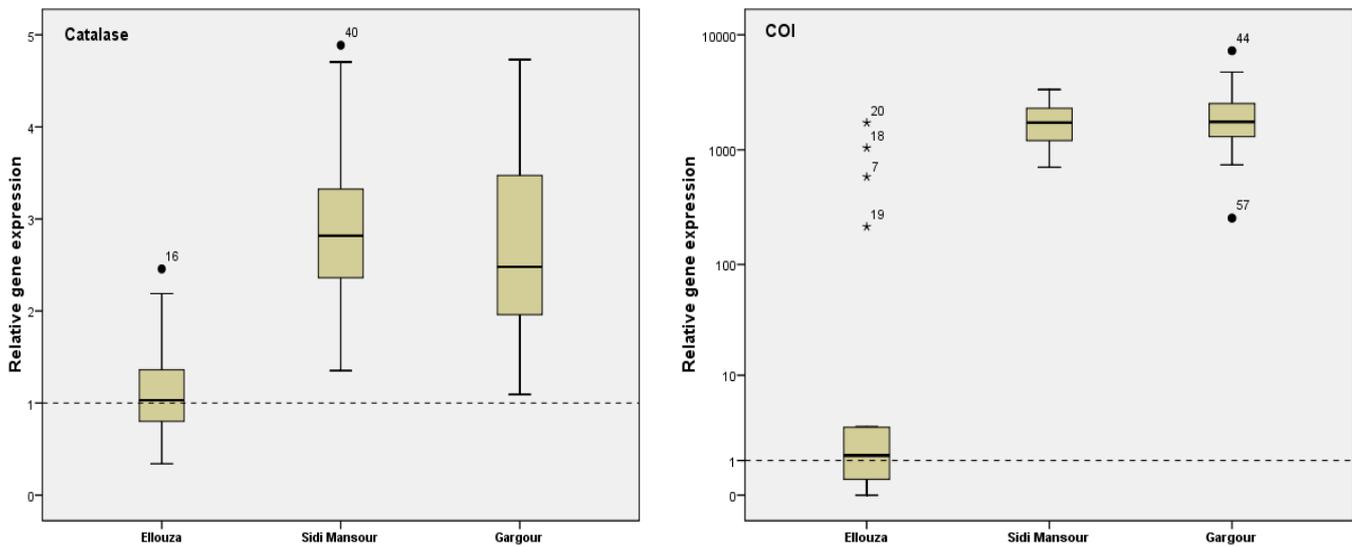


Figure 36 Profil d'expression relative des gènes CAT et COI sur les trois sites Ellouza, Sidi Mansour et Gargour. Les différences des niveaux d'expression (échelle logarithmique) sont exprimées par rapport aux individus du site de référence Ellouza.

2. Analyse en composante principale

Afin de mettre en évidence les relations entre les différents paramètres à savoir le niveau d'expression des gènes MT, ABCB1, CuZnSOD, MnSOD, CAT, HSP70, COI, l'IC et la bioaccumulation des métaux (Cd, Cu, Zn et Ni), une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée avec deux ACP : la première (Figure 37-A) montre la relation entre les différents paramètres et la deuxième (Figure 37-B) correspond à une projection des individus issus des trois sites sur les deux axes de l'ACP. Les résultats de la première ACP (Figure 36-A) montrent la présence de deux groupes : un groupe formé par l'indice de condition, les métaux et l'expression de la catalase et de COI qui sont fortement corrélés les uns aux autres. Le deuxième groupe est formé par l'expression de la CuZnSOD, la MnSOD, la HSP 70 et la MT. Les résultats de la seconde ACP (Figure 37-B) montrent la séparation des individus issus des trois sites. Les individus du site Ellouza sont regroupés à gauche avec de faibles indices de condition et une accumulation faible de métaux mais de fortes expressions des gènes MT, HSP70, MnSOD et CuZnSOD. Les individus du site G sont regroupés à droite en haut avec une expression importante des gènes COI et CAT. Les individus du site SM sont regroupés en bas à droite avec de forts indices de condition et une forte accumulation des métaux.

*Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum
dans des sites présentant différents niveaux de pollution*

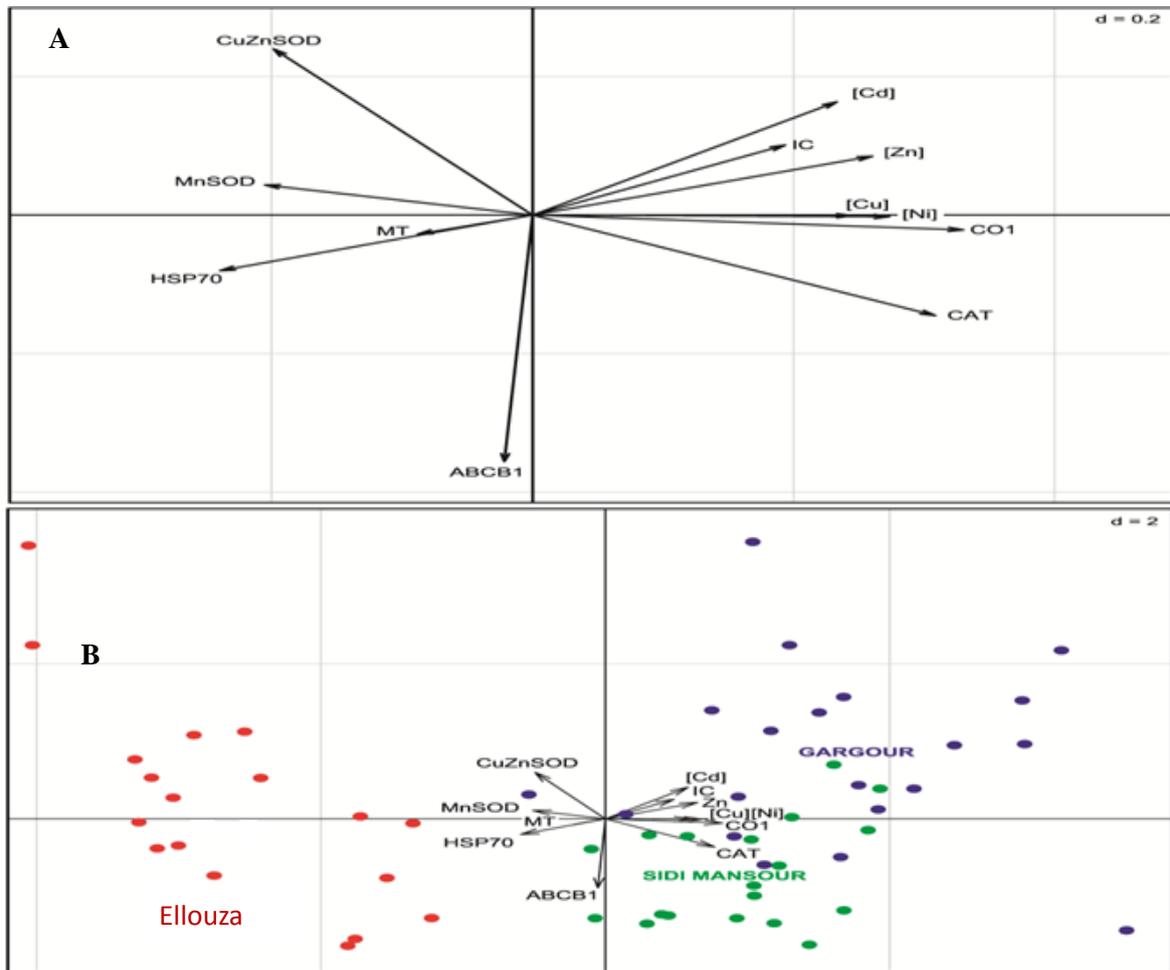


Figure 37 (A) Analyse en composante principale de l'expression relative des gènes (ABCB1, MT, MnSOD, CuZnSOD, CAT, HSP70 et COI), de l'indice de condition (IC) et des teneurs en métaux (Cd, Cu, Zn et Ni). (B) Projection des individus selon les données quantitatives présentées dans (A). [Ni], [Zn], [Cu], [Cd], concentrations des métaux dans les coques.

III. Discussion

Ce chapitre a présenté la réponse adaptative de coques prélevées directement à partir de leur milieu naturel. Cette réponse a été étudiée à différents niveaux de l'intégration biologique allant du niveau individuel jusqu'au niveau moléculaire et cellulaire.

Dans un premier temps, nous avons cherché à sélectionner trois sites qui diffèrent par leurs degrés de contamination. Pour cela, une étude préliminaire a été mise en place, dans laquelle un dosage du Cd et du Pb a été effectué *in toto* chez des coques prélevées sur six sites. Contrairement au Cd qui a permis de mettre en évidence une différence significative entre les six sites, le Pb n'a pas permis de les différencier. Ceci peut être dû au fait que le plomb est

*Réponse adaptative des populations naturelles de la coque *Cerastoderma glaucum* dans des sites présentant différents niveaux de pollution*

considéré comme un polluant ubiquitaire présent dans la plupart des écosystèmes. Sa présence dans les tissus des coques peut donc être due à un apport environnemental par voie atmosphérique, ce qui conduit souvent des résultats diffus et peu discriminants. Suite à cette étude, le site Ellouza a été sélectionné comme site de référence présentant des faibles teneurs en Cd, le site Sidi Mansour a été sélectionné comme site intermédiaire et le site Gargour comme étant un site fortement contaminé. En plus de leur teneur en Cd, la facilité d'accès et la richesse en *C. glaucum* ont été retenus comme facteurs déterminants dans le choix de ces trois sites. Sur ces sites, la réponse des coques a été étudiée aux niveaux individuel, organe, cellulaire et moléculaire.

A. Niveau individuel

Trois paramètres ont été étudiés pour ce niveau : la capacité à supporter l'anoxie (test de stress-on-stress), l'indice de condition et le sex-ratio. Le test de stress-on-stress révèle la capacité physiologique des coques à supporter l'anoxie, il démontre que plus les animaux sont perturbés dans leur milieu d'origine, moins ils résistent à un second stress. Ceci se confirme par les valeurs des LT50 qui décroissent lorsque que la pollution du milieu augmente. Les coques du site de référence Ellouza présente la valeur de la LT50 la plus importante et sont les plus résistantes à l'anoxie alors que les coques du site contaminé Gargour présentent la LT50 la plus faible et sont donc les moins aptes à résister à l'anoxie. Il semblerait donc que ces dernières présentent une déficience physiologique d'ue à la pollution du milieu. Ces résultats rejoignent les travaux de Machreki-Ajmi (2009) réalisés sur la même espèce et qui démontrent que les coques issues d'un site contaminé étaient beaucoup moins résistantes à l'anoxie que des coques issues d'un site témoin. D'autres travaux effectués dans des conditions contrôlées sur des bivalves (Ladhar-Chaabouni et al. 2008 ; Hamza Chaffai et al. 1989 ; Viarengo et al. 1995) ont démontré que, suite à une contamination au Cd, les LT50 diminuent avec le temps d'exposition et la concentration du Cd.

L'indice de condition est un indicateur de l'état physiologique et nutritionnel des animaux mais aussi du déroulement de la gamétogenèse. Pour des organismes prélevés à la même période de reproduction, cet indice peut montrer des différences entre sites témoins et contaminés (Kerambrun 2011). Dans notre travail et avec des animaux pris à la même période de reproduction sur les trois sites, les plus forts indices de condition ont été enregistrés au niveau du site de référence Ellouza témoignant d'un bon état physiologique et nutritionnel des

*Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum
dans des sites présentant différents niveaux de pollution*

animaux. Par contre, les plus faibles indices ont été enregistrés au niveau du site contaminé Gargour montrant l'affectation des individus de ce site au niveau nutritionnel et physiologique. Ceci confirme plusieurs études menées sur l'effet de polluants sur l'indice de condition chez les organismes marins. Ces études ont montré une diminution de celui-ci avec la pollution par les métaux notamment (Avery et al. 1996 ; Riedel et al. 1998). Néanmoins, les variations de ce paramètre peuvent également être liées aux conditions hydro-climatiques spécifiques des sites échantillonnés (température, salinité, disponibilité en oxygène...), comme à la disponibilité en nourriture. Plus largement, ce paramètre peut aussi être fortement lié à la période de l'année ou encore à l'âge. De multiples facteurs pouvant affecter cet indice, il faut donc le considérer avec une certaine précaution en écotoxicologie (Gilliers et al. 2004).

Concernant le sex-ratio, nos résultats montrent que cette caractéristique populationnelle est de plus en plus déséquilibrée en faveur des femelles lorsque la pollution du milieu augmente. Elle est équilibrée pour le site de référence Ellouza et fortement déséquilibrée pour le site contaminé Gargour. Ce déséquilibre entre mâles et femelles reflète des conditions environnementales particulières, notamment la qualité du milieu, la température et les conditions trophiques (Lango-Reynoso, 1999). Bien que dans la littérature, un déséquilibre du sex-ratio est souvent rapporté aux conditions trophiques du milieu et à la reproduction (David 2007 ; Ketata 2008 ; Machreki-Ajmi 2009) et rarement au facteur pollution du milieu, nos résultats laissent penser à un déséquilibre dû à la pollution mais qui peut agir en synergie avec d'autres facteurs. On peut noter aussi que ce déséquilibre a été enregistré en faveur des femelles. Ce résultat rejoint les travaux de Derbali et al. 2009 qui ont montré une prédominance des femelles dans certains sites de la région du golfe de Gabès qui n'a cependant pas été corrélée au facteur pollution du milieu mais plutôt à la taille de la population. En effet, ces auteurs ont montré une prédominance des femelles chez des coques ayant des tailles supérieures à 24 mm.

En conclusion, les investigations menées au niveau individuel montrent une diminution globale de la capacité à supporter l'anoxie, de l'indice de condition et du sex-ratio au niveau du site le plus contaminé Gargour. Le facteur pollution du milieu semble donc induire une réponse au niveau individuel, un niveau permettant d'obtenir des informations globales sur le statut physiologique de l'individu soumis à un stress.

B. Niveau organe

Ce niveau concerne l'accumulation des métaux (Cd, Cu, Zn et Ni), des réserves énergétiques (glycogène lipides et protéines), du MDA et de l'acétylcholine estérase dans les organes des coques issues des trois sites.

L'accumulation des métaux dans les organes est un paramètre très important à étudier puisque contrairement à d'autres polluants, les métaux peuvent s'accumuler dans les organes à des concentrations largement supérieures à celles présentes dans l'environnement, et peuvent atteindre des seuils toxiques. Nos résultats sur l'accumulation des métaux montrent i) que sur les trois sites les teneurs en Zn, Ni et Cu se trouvent à des doses beaucoup plus importantes que celle du Cd. Ceci est en relation avec leur fonction biologique, étant donné que les trois premiers (Zn, Ni et Cu) sont des métaux essentiels à la vie, donc leur forte bioaccumulation par rapport au Cd (métal non essentiel) est un processus naturel, exigé par tous les organismes vivants afin de satisfaire à leurs besoins métaboliques; ii) les coques issues du site contaminé Gargour sont les plus accumulatrices des quatre métaux (Cd, Cu, Zn et Ni) suivies par celles du site intermédiaire Sidi Mansour puis celles du site de référence Ellouza. Ceci montre que cette accumulation est reliée au degré de contamination du milieu. Ceci se confirme aussi par le dosage des métaux dans le sédiment des mêmes sites (Tableau 18) qui montre des teneurs en métaux (Cd, Cu, Zn et Ni) beaucoup plus importantes sur le site Gargour que sur les deux autres sites. D'une façon générale, un sédiment contaminé reflète un milieu pollué et un risque réel pour les organismes qui vivent en contact avec ce sédiment puisque ce dernier sert de nourricerie et de lieu de reproduction pour de nombreuses espèces benthiques (Machreki-Ajmi 2009 ; Geffard 2001). De plus, la remise en suspension des sédiments par des phénomènes naturels ou par les activités humaines peut entraîner un phénomène de relargage des métaux dans la colonne d'eau. Une augmentation de l'accumulation des métaux dans les tissus des coques est donc probablement très favorisée puisque ce dernier est un filtreur qui vit dans le sédiment superficiel.

D'autres facteurs intrinsèques (reproduction, taille, âge...) et extrinsèques (température, salinité ...) peuvent aussi intervenir au niveau du processus d'accumulation (Machreki-Ajmi 2009). Afin d'éviter certains facteurs confondants reliés notamment au cycle biologique et à la taille, nous avons effectué toutes les analyses (dosage des métaux, dosage biochimiques et expression des gènes) à une période où les animaux étaient au repos sexuel. De plus, nous

***Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum
dans des sites présentant différents niveaux de pollution***

avons essayé, dans la mesure du possible, de travailler sur des coques appartenant à la même classe de taille (28-32mm). Ceci a été difficile sur le site intermédiaire Sidi Mansour puisque la plupart des coques sur ce site avaient des tailles inférieures à 28 mm.

Concernant les valeurs en différents métaux, elles sont toutes inférieures aux normes qui sont de 2µg/g de poids sec pour le Cd, 5µg/g de poids sec pour le Cu et 100 µg/g de poids sec pour le zinc, ce qui montre que les teneurs métalliques dans les trois sites étudiés ne présentent pour le moment aucun danger pour la santé humaine (Jorf 1995). Les teneurs en différents métaux (Cd, Cu et Zn) mesurées dans cette étude sont aussi dans la fourchette des valeurs trouvées par Machreki-Ajmi (2009) sur la même espèce dans la région du golfe de Gabès mais supérieures aux valeurs trouvées par Smaoui-Damak et al. (2003) chez la palourde *Ruditapes decussatus* dans la même région, exception faite pour le Cd. Sur les sites analysés, les valeurs sont largement inférieures aux teneurs en métaux accumulés par d'autres bivalves sur d'autres sites (Arini 2011). Ces différences peuvent s'expliquer par les caractéristiques de la zone d'étude elle-même et du modèle biologique, notamment la qualité trophique, l'écologie de ces bivalves et la cinétique d'accumulation des métaux relative à chaque espèce (Smaoui-Damak et al. 2003).

Les biomarqueurs reliés au métabolisme énergétique sont très intéressants dans l'étude de la réponse d'un organisme soumis à un stress puisque la synthèse, la mobilisation et l'utilisation de défenses antitoxiques ont un coût énergétique pour l'organisme (Voets et al. 2006), c'est pourquoi il est important de prendre en compte les réserves énergétiques dans les études écotoxicologiques. Ces dernières peuvent donc mettre en évidence les prémises d'un impact environnemental sur les populations (Smolders et al. 2004 ; Voets et al. 2006). Dans ce travail le niveau des réserves énergétiques (glycogène, lipide et protéine) a été étudié dans les gonades des coques issues des trois sites. Les résultats obtenus n'ont pas montré de différences significatives dans les teneurs en glycogène et en lipides chez les animaux récoltés sur les trois sites. Cependant, une augmentation significative de la teneur en protéine est observée avec l'augmentation de la pollution du milieu. Ceci est en désaccord avec plusieurs travaux effectués sur des organismes marins démontrant que la tendance générale est une diminution des réserves énergétiques comme coût de tolérance vis-à-vis des contaminants présents dans le site contaminé (Shcill et Kolhler 2004 ; Donker 1992 ; Smolders et al. 2004). Nos résultats pour les protéines ne sont donc probablement pas en lien avec le niveau de pollution mesuré puisque si c'était le cas, on observerait une mobilisation c'est-à-dire une

***Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum
dans des sites présentant différents niveaux de pollution***

diminution de ces réserves en protéines en réponse au stress provoqué par le milieu. Or, globalement, les différences inter-sites sont peu marquées au niveau réserves énergétiques. Ceci peut s'expliquer par une concentration en toxique sur les trois sites trop faible pour induire une demande énergétique suffisamment conséquente de la part des mécanismes de défenses des individus. Contrairement à ces résultats, les travaux de Durou et Mouneyrac (2007) font état d'une diminution des réserves énergétiques (glycogène, lipides et protéines) chez l'annélide polychète *Hediste diversicolor* dans un site contaminé par rapport à un site de référence. Cette diminution est expliquée par le coût de tolérance vis-à-vis des contaminants présents dans le site contaminé. Il semblerait donc que le concept de diminution des réserves énergétiques en réponse au coût de la tolérance vis-à-vis des contaminants présents dans le milieu soit respecté dans un site suffisamment pollué, par contre, dans les sites présentant des niveaux de contamination moins forts, ce concept n'est pas respecté en raison de l'interférence entre les différentes composantes du métabolisme énergétique (qualité de la ressource alimentaire, besoin liée au cycle sexuel, réponse au stress polluant). Dans ces conditions la stratégie d'évaluer les réserves énergétiques sous forme de glycogène, lipide et protéine reste trop simpliste et l'utilisation d'autres paramètres tels que l'allocation cellulaire énergétique qui fournit des mesures de répartition de l'énergie au niveau cellulaire doit être envisagée.

Pour évaluer le potentiel de stress oxydant subi par les individus issus des trois sites, nous avons suivi la variation du taux du malondialdéhyde (MDA), produit secondaire engendré par l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène générées par certains contaminants tels que les métaux (Machreki-Ajmi 2009). Les résultats obtenus ont montré qu'il n'y a pas de différence significative dans la teneur en MDA sur les trois sites. Des études menées *in situ* sur les effets de polluants, notamment le Cd, sur les teneurs en MDA ont souvent montré une augmentation de celui-ci avec la pollution du milieu (Machreki-Ajmi 2009 ; Couillard et al. 1995 ; Cossu et al. 2000 ; Giguère et al. 2003; Ladhar Chabouni 2009), tendance qui n'a pas été observée ici, probablement en raison de la synergie d'un ensemble de paramètres dans le milieu tels que la température, la salinité et le cycle des marées (Amiard Triquet et Amiard 2008).

L'acétylcholinestérase, enzyme impliquée dans les mécanismes de transmission des influx nerveux à travers l'organisme, a été considérée par plusieurs auteurs comme étant un indicateur spécifique de l'exposition aux pesticides organophosphorés, carbamates (Days et

Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum dans des sites présentant différents niveaux de pollution

Scott 1990) et aux métaux (Thaker et Haritos 1989; Labrot et al. 1996 ; Hamza-Chaffai et al. 1998). Plusieurs travaux ont montré également une corrélation entre l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase et le gradient de pollution *in situ* dans différentes régions et chez plusieurs bivalves (Machreki-Ajmi 2009 ; Moukrim 2002 ; Dellali et al. 2001). Notre travail montre une tendance à la baisse de l'activité AChE en fonction de la pollution du milieu mais cette variation n'est pas significative. Ceci peut toujours être relié à l'interférence d'autres facteurs du milieu tels que la température, les concentrations en d'autres polluants comme les HAP et les pesticides qui n'ont pas été dosés dans ce travail.

Donc, malgré les différences des niveaux de contamination métallique inter sites, les réponses enregistrées au niveau organe (réserves énergétiques, MDA et AChE) sont peu marquées et n'ont pas permis de différencier les trois sites.

C. Niveau cellulaire

Au niveau cellulaire, le déroulement de la gamétogenèse, l'indice de maturité et la mesure du diamètre ovocytaire ont été étudiés. Les données du déroulement de la gamétogenèse et de l'indice de maturité s'accordent pour indiquer que peu de différences dans l'évolution du cycle gamétique sont observables entre les animaux des trois sites. Cependant, deux différences sont observées et concernent surtout la proportion d'individus pour chaque stade i) en début du cycle gamétique sur le site contaminé Gargour avec une majorité d'individus au stade 3 alors que la majorité des individus du site intermédiaire et de référence sont au stade 2 et ii) à la fin du cycle gamétique sur les sites intermédiaire et contaminé avec une proportion d'individus au stade 6 alors que la totalité des individus du site de référence sont au stade 5. Ces deux différences concernent les sites plus ou moins contaminés, donc, probablement en lien avec les conditions environnementales du milieu (niveau de contamination, température et conditions trophiques). Dans la littérature, des décalages temporels dans l'évolution du cycle reproducteur des bivalves ont été rapportés à des conditions environnementales sévères en relation avec la température, les conditions trophiques, le niveau de contamination du milieu et l'infestation parasitaire (Gauthier Clerc et al. 2002 ; Enríquez-Díaz 2004; Smaoui-Damak et al. 2006 ; Ketata 2008 ; Palais 2011; Tlili et al. 2011). Dans notre travail, et comme nous l'avons signalé précédemment, les différences de niveau de contamination inter-sites peuvent expliquer les différences observées. Ceci a été décrit dans plusieurs travaux de recherche sur le bivalve *Mya arenaria* (Gauthier Clerc et al. 2002), sur la palourde *Ruditapes*

Réponse adaptative des populations naturelles de la coque *Cerastoderma glaucum* dans des sites présentant différents niveaux de pollution

deccussatus (Ketata 2008 ; Smaoui-Damak et al. 2006), sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (Ruiz et al. 2011) et sur le bivalve *Donax trunculus* (Tlili et al. 2011). Tous ces travaux s'accordent pour indiquer que les niveaux de contamination inter-sites affectent la reproduction de ces différents bivalves. Contrairement au facteur pollution du milieu, la température ne semble pas expliquer les différences observées dans notre travail. En effet, un suivi de la température a été réalisé sur les trois sites lors des différents prélèvements (Figure 38) et les résultats obtenus ne font pas apparaître de liens entre les différences observées et la température. Pourtant, dans la littérature la température semble jouer un rôle prépondérant dans la gamétogenèse et surtout dans le processus de l'émission gamétique chez *C. glaucum* (Zaouali 1974 ; 1980 ; Derbali et al. 2009 ; Machreki-Ajmi 2009) et chez d'autres bivalves marins (Enríquez-Díaz 2004 ; Smaoui-Damak 2005 ; Ketata 2008). Concernant, les conditions trophiques, nous avons fait l'erreur de ne pas mesurer directement les conditions nutritionnelles du milieu, à travers l'estimation des teneurs en chlorophylle-a par exemple, mais on peut toujours avoir une idée sur ce paramètre d'une manière indirecte via l'indice de condition qui donne une idée sur l'état nutritionnel des coques et donc du milieu duquel elles proviennent. Cet indice est mesuré à un niveau beaucoup plus élevé sur le site de référence et le site intermédiaire par rapport au site contaminé, montrant les bonnes conditions trophiques sur les deux premiers sites et le stress nutritionnel du site contaminé (Figure 28). Dans ce sens, les travaux d'Enríquez-Díaz (2004) ont montré une relation directe entre l'état trophique du milieu, l'état physiologique de l'animal et la qualité des gamètes. Ces auteurs ont montré qu'une ration élevée de nourriture dans le milieu favorise un développement gamétique plus rapide et plus intense si les animaux issus de ce site sont en bon état physiologique. Ces constatations peuvent expliquer nos résultats de la mesure du diamètre ovocytaire qui montrent des ovocytes plus grands et de meilleure qualité sur le site de référence par rapport aux deux autres sites probablement en lien avec les bonnes conditions trophiques de ce site et le bon état physiologique des animaux issus de ce dernier.

Réponse adaptative des populations naturelles de la coque Cerastoderma glaucum dans des sites présentant différents niveaux de pollution

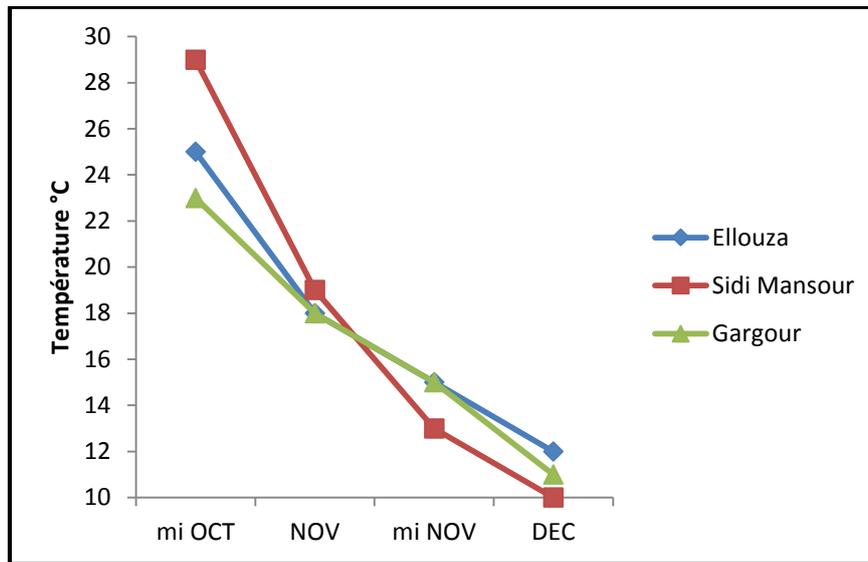


Figure 38 . Evolution de la température sur les trois sites

D. Niveau moléculaire

Face à une contamination, un organisme peut modifier l'expression de ses gènes pour s'acclimater à cette nouvelle situation. Cette modification est souvent considérée comme une réponse précoce de l'organisme soumis à un stress. L'expression de 7 gènes codant pour des enzymes ou pour des protéines impliquées dans différentes voies métaboliques a été suivie sur les populations provenant des trois sites. Ces gènes ont été choisis parce que les données de la littérature montraient qu'ils pouvaient être impliqués dans la réponse aux différents types de stress environnementaux (Achard-Joris et al. 2006 ; Al Kaddissi et al. 2012 ; Ivanina et al. 2008a ; Ivanina et al. 2008b ; Navarro et al. 2011). Etant donné la complexité des typologies des sites étudiés, il nous a semblé important de suivre des marqueurs potentiellement liés aux stress multiples tels que MT, ABCB1, MnSOD et CuZnSOD, CAT, HSP70 et COI. Toutes les réponses transcriptionnelles ont été mesurées sur les branchies puisque cet organe constitue une interface clé pour l'acquisition, le stockage et l'élimination des métaux et a une grande capacité à synthétiser les protéines (Al Kaddissi et al. 2012 ; Marigomez et al. 2002 ; Navarro et al. 2011 ; Paul-Pont et al. 2010). Les profils d'expression obtenus peuvent être rassemblés en trois groupes au sein desquels des similitudes sont remarquables. (1) Les gènes impliqués dans la détoxification des métaux (ABCB1 et MT) et les superoxydes dismutases (MnSOD et CuZnSOD) n'ont pas montré de différence dans leurs niveaux d'expression. Ce résultat peut être dû au fait que plusieurs facteurs confondants intrinsèques (âge, taille, sexe...) et extrinsèques (température, salinité, ensoleillement, turbidité, hydrodynamisme, ressource

Réponse adaptative des populations naturelles de la coque *Cerastoderma glaucum* dans des sites présentant différents niveaux de pollution

trophique...) peuvent intervenir dans la régulation de l'expression de ces gènes. (2) La HSP70 a montré un niveau d'expression qui diminue lorsque la pollution du milieu augmente. Elle présente le niveau d'expression le plus bas dans le site le plus contaminé Gargour. Ceci peut être corrélé à une inhibition de la synthèse de la HSP70 dans les sites contaminés (Gargour et Sidi Mansour) suite à une forte concentration en métaux. Ce phénomène a été décrit aussi par Boutet et al. (2003) sur les huîtres. Ces auteurs ont montré une diminution de la synthèse de la HSP 70 dans le milieu à forte dose de métaux. (3) Les gènes de la CAT et de la COI ont présenté des niveaux d'expression plus forts dans les sites intermédiaire et contaminé. De plus, l'expression du gène COI est 1000 fois supérieure chez les animaux issus des sites intermédiaire et contaminé par rapport au site témoin. Ce dernier résultat est en rapport avec la demande d'énergie qui se trouve particulièrement élevée lors de l'exposition à tout stress environnemental (David 2007). Ainsi le très fort taux d'expression du gène COI dans le site contaminé confirme l'importance du métabolisme énergétique dans la réponse au stress.

En conclusion, la régulation de l'expression des gènes est un phénomène complexe mais relativement rapide. Les profils d'expression de gènes observés ici ne sont donc qu'un instantané et sont à considérer avec certaines précautions puisque comme nous l'avons signalé précédemment, la régulation de l'expression génique en milieu naturel est soumise à de nombreux facteurs de contrôle intrinsèques et extrinsèques.

IV. Conclusion partielle

Trois résultats majeurs résultent de l'étude de la réponse adaptative de la coque en milieu naturel

- l'importance du métabolisme énergétique dans la réponse au stress à travers la surexpression du gène COI
- Les paramètres étudiés au niveau individuel ont permis de différencier les trois sites.
- Pour tous les autres niveaux (organe, cellulaire et moléculaire), la présence de facteurs confondants conduisant à des réponses diffuses et ne permet pas, dans la plupart des cas, de différencier les trois sites.

Dans la suite de ce travail, nous envisageons d'étudier la réponse de la coque à différents niveaux de l'organisation biologique dans des conditions contrôlées.

Chapitre IV

Approche en Conditions contrôlées

Chapitre IV.A

Étude de l'impact d'une contamination par les effluents sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque *Cerastoderma glaucum*

I. Introduction

Avec l'essor industriel et urbain de certains pays, divers contaminants sont constamment déversés dans le milieu marin, ce qui provoque l'instabilité et le désordre des écosystèmes marins (Cong et al. 2012 ; Ladhar-Chaabouni et al. 2012). Parmi ces contaminants, les effluents sont constamment évacués à partir des usines de traitement municipales et industrielles et ont progressivement affecté de nombreux écosystèmes (Jadeja et al. 2007). Qu'ils soient traités ou non, ces effluents sont capables de libérer beaucoup de polluants tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les produits pharmaceutiques et les métaux (Sim et al. 2013). Ces derniers causent d'importants problèmes en raison de leur rémanence et de leur toxicité élevée (Gargouri et al. 2011).

L'évaluation de l'exposition à des effluents sur la composante biocénotique a été décrite dans plusieurs travaux. Ces travaux ont rapporté d'importants effets délétères chez les organismes étudiés en rapport avec l'immunotoxicité (Gagné et al. 2008 ; Salo et al. 2007), la neurotoxicité et le stress oxydatif (Kamel et al, 2012) ainsi que d'autres altérations physiologiques (Doux fils et al. 2007). L'impact de ces rejets d'effluents dans le milieu marin est souvent évalué dans les tissus des organismes marins par biosurveillance passive (organismes échantillonnés directement dans la zone d'étude) ou active (organismes transplantés ou suite à des expérimentations en conditions contrôlées). Cependant, les expériences menées en conditions contrôlées restent une alternative pour évaluer les effets potentiels de la toxicité d'un mélange de contaminants (les effluents) sur les organismes marins.

En Tunisie, le golfe de Gabès est influencé par une activité industrielle importante, provenant surtout d'une usine de traitement de phosphate brut (SIAPE: Société des Industries d'Acide Phosphoriques et d'Engrais), exposant les organismes marins à une contamination croissante (Ladhar-Chabouni et al. 2009). L'activité principale de cette industrie est la transformation du phosphate brut en engrais chimique, elle génère des effluents riches en sulfates, fluorures, phosphores et métaux qui seront libérés dans le milieu marin (Choura 2008). Par conséquent, l'écosystème marin autour de cette industrie a été fortement dégradé et des niveaux de métaux toxiques élevés ont été observés dans les sédiments et dans les organismes marins provenant de cette région (Ketata et al. 2007 ; Machreki-Ajmi et al. 2009).

La coque *C. glaucum* compte parmi les bivalves qui sont largement distribués dans cette zone et a été validée comme organisme bio-indicateur de pollution dans plusieurs travaux

(Machreki-Ajmi et Hamza-Chaffai 2006; Szefer et al. 1999). De plus, ce bivalve est adapté aussi bien aux études de terrain (Ladhar-Chaabouni et al. 2009b ; Machreki-Ajmi et al. 2009 ; Machreki-Ajmi et Hamza-Chaffai 2006) qu'aux expériences en conditions contrôlées (Ladhar-Chaabouni et al. 2008, 2010). Les travaux précédents menés sur cette espèce se sont focalisés sur les paramètres biochimiques (mesures de la bioaccumulation des métaux et des biomarqueurs). De plus, les études réalisées en conditions contrôlées sur cette espèce ont utilisé un contaminant pur (le cadmium). L'originalité du travail présenté ici réside dans l'utilisation de biomarqueurs moléculaires pour évaluer la réponse de la coque *C. glaucum* à un mélange « naturel » de contaminants, les effluents provenant de la SIAPE (golfe de Gabès). Le niveau moléculaire peut apporter une détection précoce et sensible de l'exposition aux contaminants et peut aussi permettre la prédiction des effets biologiques à des niveaux plus élevés de l'organisation biologique. De plus, les changements dans l'expression des gènes sont susceptibles de jouer un rôle critique dans l'acclimatation et/ou l'adaptation des organismes (Schulte 2004).

L'objectif de cette étude est donc d'étudier les réponses de la coque *C. glaucum* exposée à deux effluents différents provenant de la SIAPE, à travers l'analyse de:

- (1) la bioaccumulation des métaux dans les tissus des coques,
- (2) l'état physiologique des organismes,
- (3) la réponse au niveau transcriptionnel des 7 gènes clés déjà utilisés dans la partie *in situ*, à savoir MT, ABCB1, MnSOD, CuZnSOD, CAT, HSP70 et COI,
- (4) la relation entre l'expression génique et les teneurs en métaux.

Contrairement à la plupart des études réalisées au niveau moléculaire sur des pools d'échantillons (Ciacci et al. 2012; Navarro et al. 2009), notre étude analyse l'expression des gènes à l'échelle de l'individu afin de mettre en évidence la variabilité entre les coques soumises à la même exposition.

II. Résultats

1. Effets de l'exposition aux effluents sur l'état physiologique global des coques

La capacité à supporter l'anoxie (test de stress-on-stress) est significativement affectée par l'exposition aux effluents ($p < 0,05$). Une diminution de la LT50 a été enregistrée pour le groupe des individus exposés par rapport au groupe contrôle; cette baisse est significative pour F1 ($p < 0,05$) et non significative pour F2. Pour l'indice de condition, aucune différence

significative n'a été enregistrée entre les individus témoins et exposés (contrôles: $12,6 \pm 9$; F_1 : $12,1 \pm 3,6$; F_2 : $13,3 \pm 4,2$). L'indice de condition n'est pas non plus affecté par le facteur temps d'exposition.

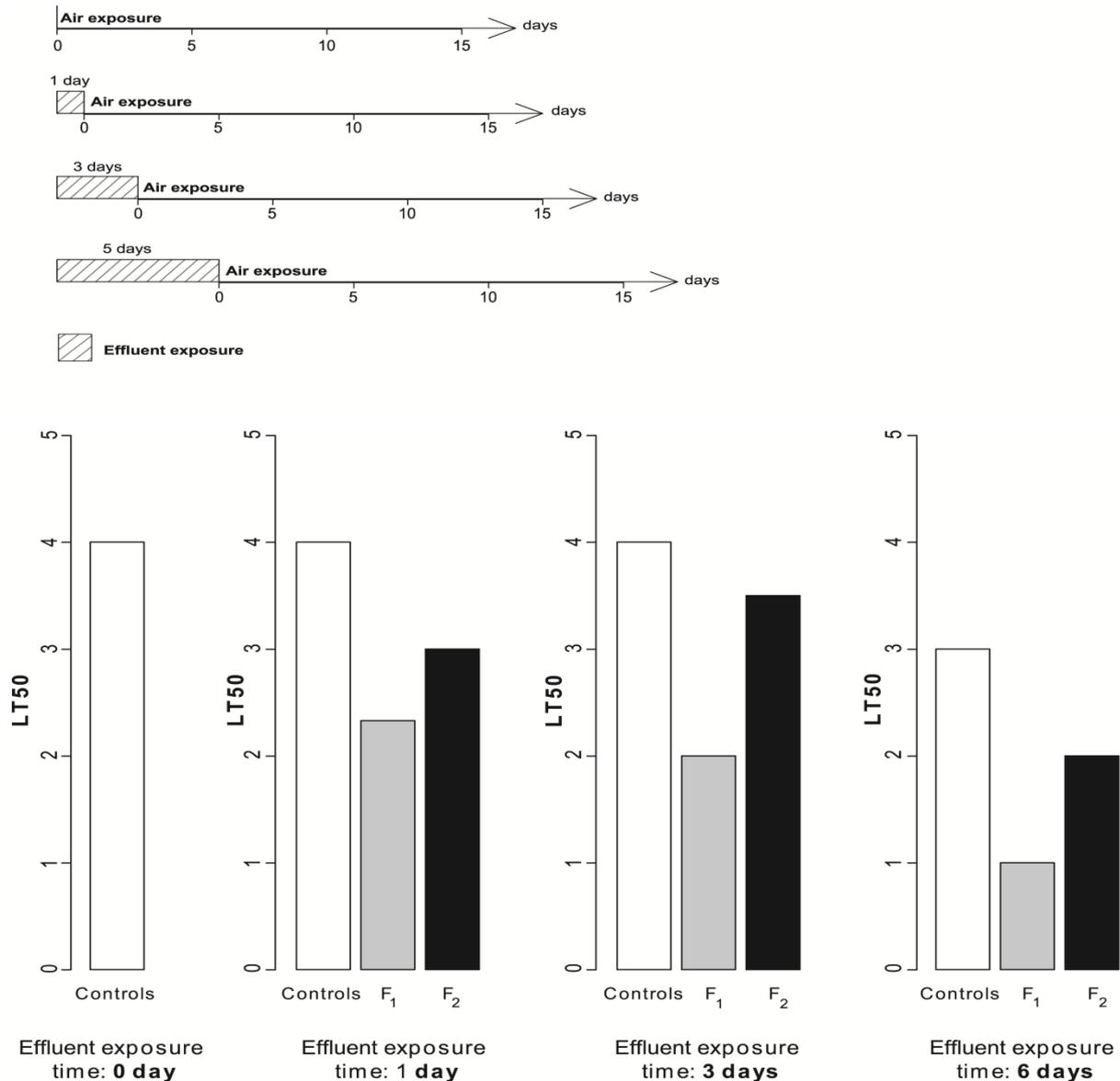


Figure 39 Protocole et résultats du test de stress-on-stress. A) Les conditions expérimentales: la longueur de la barre hachurée indique le temps d'exposition aux effluents. La flèche indique la suite de survie sous anoxie après exposition. B) Résultats: LT50 (en jours) des coques soumises à l'anoxie après exposition aux effluents F1 et F2 et à chaque temps d'exposition.

2. Concentrations en métaux dans les effluents F1 et F2 et dans les tissus des coques.

La composition des effluents F1 et F2 en métaux est donnée dans le tableau 19. Les résultats obtenus montrent que F1 est beaucoup plus riche en métaux que F2 : Cu (X 63), Cd (X 29), Cr X (24), Mn (X13), Ni (X10), Zn (X 6) et Pb (X 5). Les concentrations en Cu, Ni, Zn et Cd

Etude de l'impact d'une contamination par les effluents sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque *Cerastoderma glaucum*

dans les tissus des coques sont présentées sur les Figures 40 et 41. Les résultats obtenus montrent que la concentration en ces différents métaux (exprimée en µg/g de poids sec) reste relativement faible et ne varie pratiquement pas durant l'expérience dans les tissus des coques témoins. Par contre dans les lots contaminés, l'accumulation varie d'un métal à l'autre probablement en relation avec la concentration initiale de ce métal dans les effluents. L'accumulation du Cd dans les tissus des coques est beaucoup moins marquée que celle les autres métaux (100 fois moins importante). Les coques exposées à F1 accumulent significativement ($p < 0.05$) plus de métaux (Cd, Cu, Zn et Ni) que celles exposées à F2 (1,5 fois pour le Cu, Zn et Ni et 24 fois pour le Cd). La cinétique d'accumulation du Cu, du Ni et du Zn est la même pour les individus exposés à chacun des effluents. La concentration en Zn et en Ni ne semble pas augmenter avec le temps d'exposition alors que la concentration du Cu augmente avec le temps d'exposition. En effet, les coques exposées accumulent le Cu entre 1 et 6 jours (accumulation plus importante pour les individus exposés à F1). Un profil similaire est observé pour le Cd (Figure 41) qui présente de faibles variations durant les deux premiers jours d'exposition suivie par une augmentation. Cette augmentation est très modérée pour F2, atteignant $0,224 \pm 0,106$ ng/g de poids sec après 5 jours d'exposition, alors qu'elle est très importante pour F1, avec une valeur maximale de $6,181 \pm 1,276$ µg/g de poids sec atteinte après 6 jours d'exposition.

Tableau 19 Composition des effluents F1 et F2 en métaux. Les normes tunisiennes et françaises sont indiquées sur les deux dernières lignes. Les résultats sont exprimés en mg/L d'effluent.

	Cd	Cr	Cu	Mn	Zn	Ni	Pb
Effluent F1	0,953	0,994	0,381	0,445	2,757	0,469	0,174
Effluent F2	0,033	0,043	0,006	0,034	0,486	0,045	0,033
Normes Tunisiennes	0.005	2	1.5	1	10	2	0.5
Normes Françaises	0.2	0.5	0.5	1	2	0.5	0.5

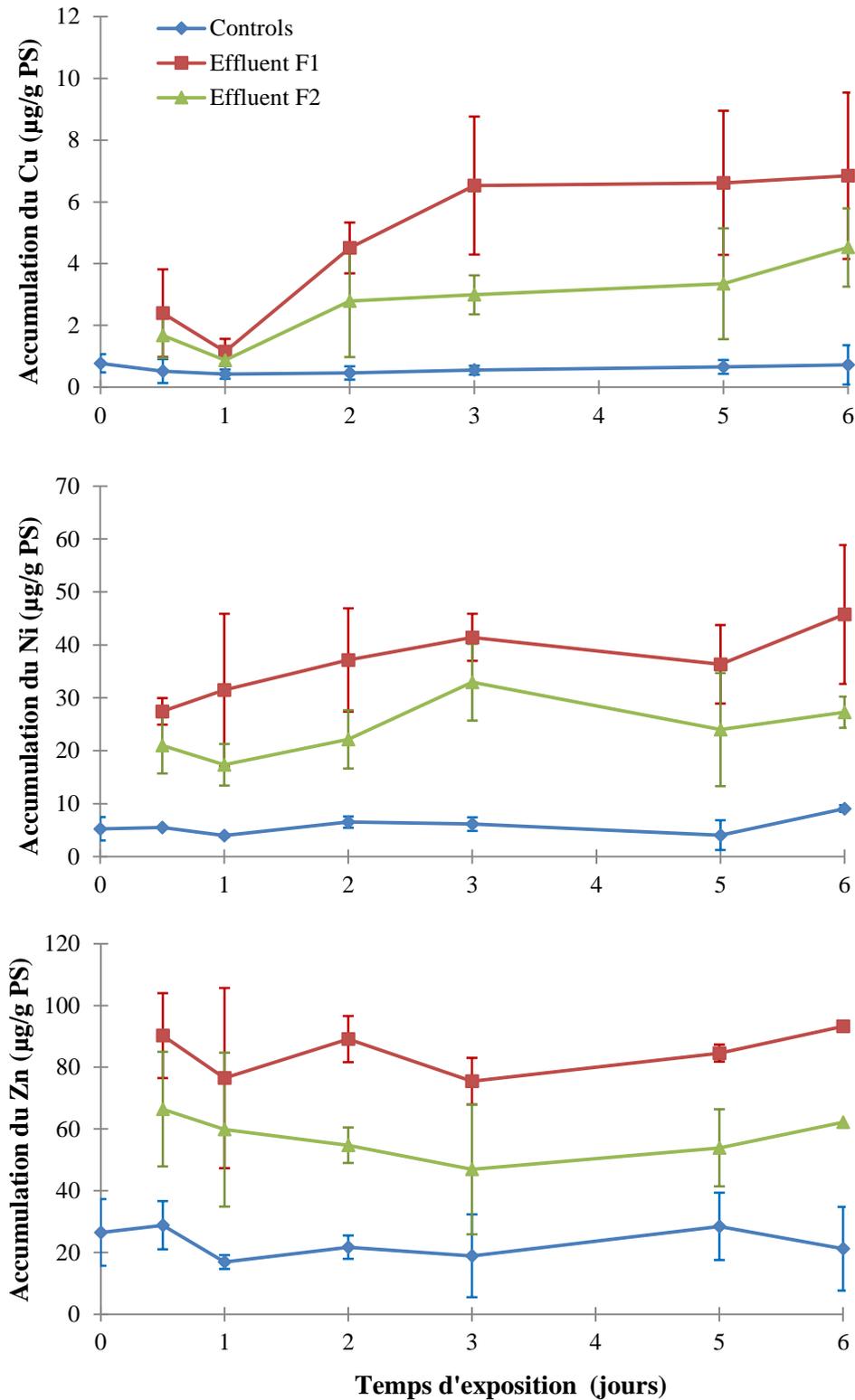


Figure 40 Bioaccumulation du Ni, Zn, et Cu [$\mu\text{g/g PS}$] chez les coques témoins et exposées à F1 et à F2. Les données sont exprimées en moyenne \pm ET (n = 4); PS: poids sec.

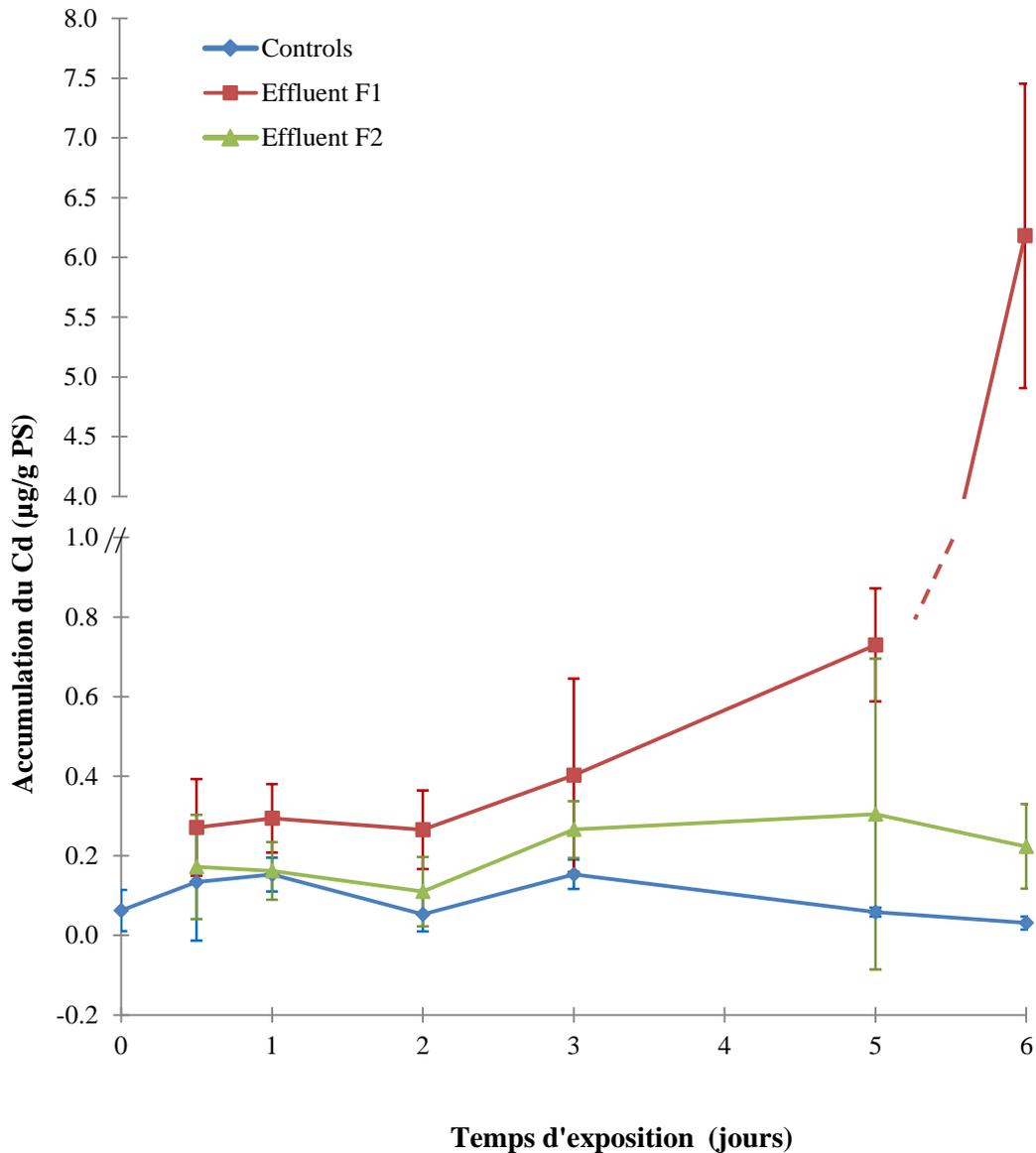


Figure 41 Bioaccumulation du Cd [$\mu\text{g/g}$ (PS)] chez les coques témoins et exposées à F1 et à F2. Les données sont exprimées en moyenne \pm ET (n = 4); PS: poids sec

3. Effets de l'exposition à F1 et à F2 sur l'expression des gènes

L'expression relative des 7 gènes étudiés est représentée sur les Figures 42 et 43 sous formes de « box plots ». L'expression de ces gènes est globalement plus élevée chez les coques exposées que chez les témoins. La variabilité (représentée sous forme d'écart type et de quartiles de « box plots ») est également plus élevée chez les individus exposés que chez les témoins (Figures 42 et 43). L'expression des gènes MT, COI et HSP70 (Figure 42 et Tableau 20) augmente avec le temps d'exposition chez les coques exposées à F1 tandis que chez les

Etude de l'impact d'une contamination par les effluents sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque Cerastoderma glaucum

individus exposés à F2, le temps d'exposition n'a pas d'influence sur l'expression de ces gènes. Malgré les fluctuations observées, l'expression du gène ABCB1 est plus importante chez les individus exposés que chez les témoins, mais le facteur temps ne semble pas avoir une influence sur l'expression de ce gène que ce soit avec F1 ou F2. Pour les enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydatif (Figure 43), l'expression des gènes MnSOD et CAT augmente avec le temps d'exposition chez les coques exposées à F1. En effet, l'expression de ces gènes est proche de celle des témoins pendant les deux premiers jours d'exposition, augmente fortement au 3ème jour (9 et 43 fois le niveau d'expression des contrôles pour MnSOD et CAT respectivement) et reste élevé jusqu'à la fin de l'expérience (Figure 43). Le temps d'exposition n'a pas d'influence sur l'expression du gène CuZnSOD (Tableau 20 et Figure 42). Au contraire, chez les coques exposées à F2, l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif (CAT, MnSOD, CuZnSOD) diminue globalement avec le temps d'exposition (Tableau 20). En effet, la cinétique est la même pour les trois gènes: l'expression augmente au cours des premières 24 heures (87, 71 et 58 fois par rapport au niveau d'expression des contrôles pour CAT, MnSOD et CuZnSOD respectivement) puis diminue jusqu'au 5ème jour (-10, -2, -3 fois pour CAT, MnSOD et CuZnSOD respectivement), puis augmente à nouveau légèrement au 6ème jour d'exposition (Figure 42).

Tableau 20 Influence du traitement et du temps d'exposition sur l'expression des différents gènes par rapport aux contrôles

		ABCB1	CuZnSOD	MnSOD	CO1	HSP70	CAT	MT
F1 effluent	Influence du traitement	+ ^{a***b}	+*	+*	+**	+**	+***	+***
	Influence du temps d'exposition	/	/	+*	+***	+***	+**	+**
F2 effluent	Influence du traitement	+***	+***	+**	+***	+***	+**	+**
	Influence du temps d'exposition	/	-***	-**	/	/	-***	/

^a Effet global: +, effet positif (l'expression augmente); -, effet négatif (l'expression diminue);

^b significativité statistique: *, p≤0.05; **, p≤0.01; ***, p≤0.001; /, pas d'effet significatif (p>0.05).

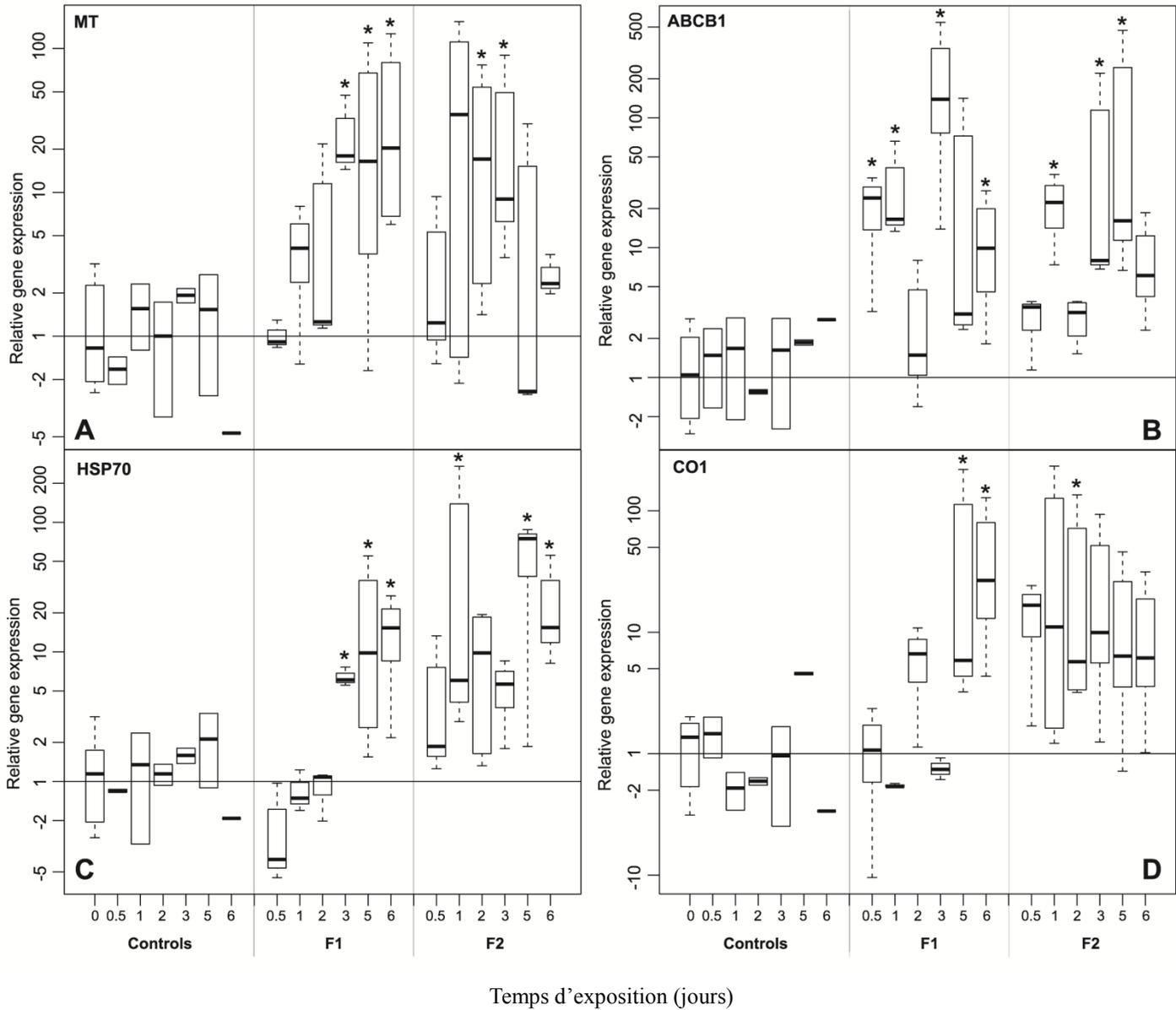


Figure 42 Profils d'expression des gènes (A) MT, (B) ABCB1, (C) HSP70 et (D) COI. Les différences de niveaux d'expression (échelle logarithmique) sont exprimées par rapport aux contrôles au temps T0. Les différences significatives par rapport aux contrôles sont représentées par des astérisques ($p < 0,05$, test de Kolmogorov-Smirnov).

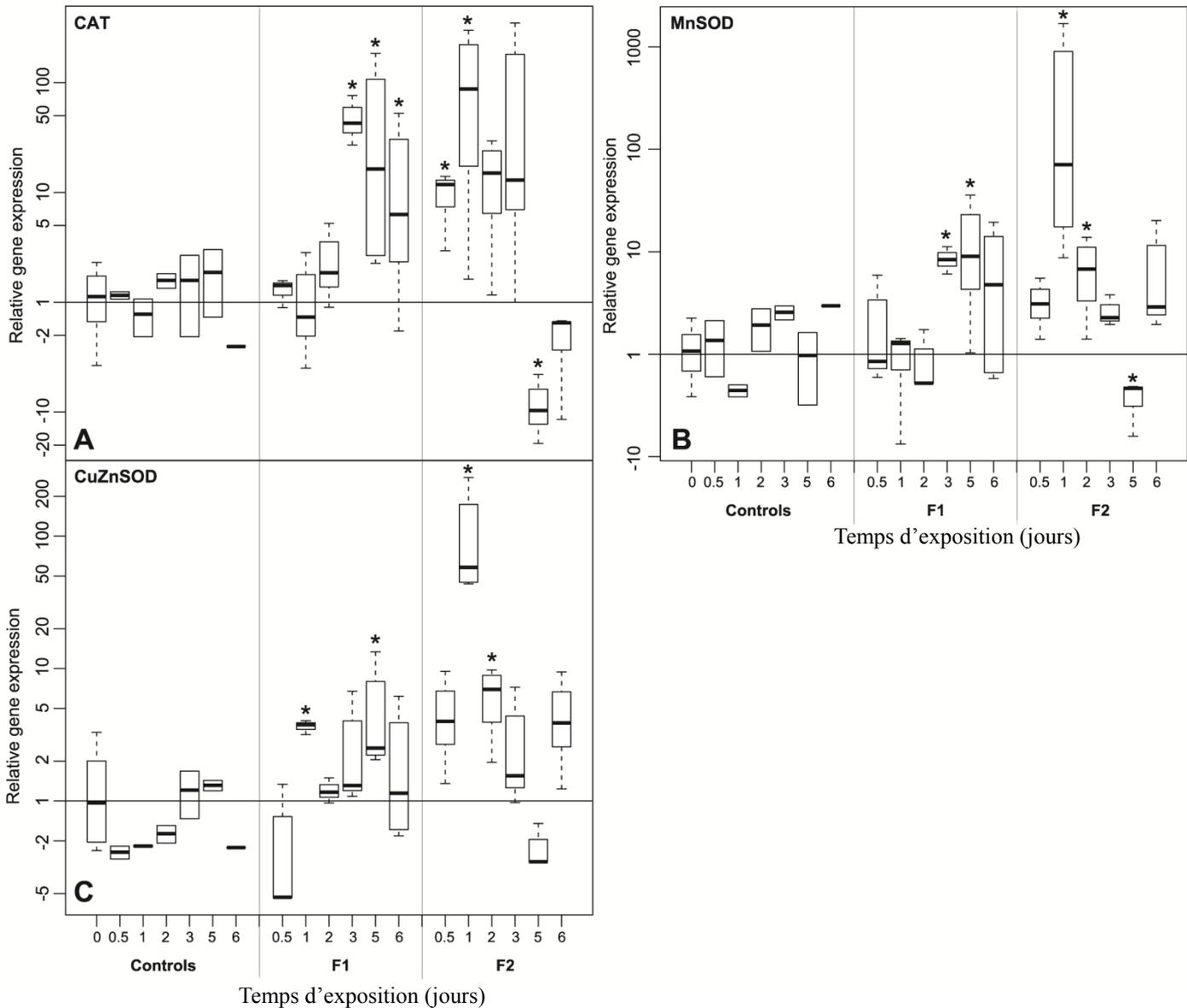


Figure 43 Les profils d'expression des gènes (A) CAT, (B) MnSOD et (C) CuZnSOD. Les différences de niveaux d'expression (échelle logarithmique) sont exprimées par rapports contrôles au temps T0. Les différences significatives par rapport aux contrôles sont représentées par des astérisques ($p < 0,05$, test de Kolmogorov-Smirnov).

4. Analyse en composante principale

Pour mettre en évidence les relations entre les niveaux d'expression des 7gènes, l'IC et la bioaccumulation des métaux, deux ACP ont été réalisées : la première considérant les individus contrôles et exposés à F1 (ACP F1) et la deuxième considérant les coques contrôles et exposées à F2 (ACP F2).

Pour l'ACP F1 (Figure 44-A), 59,3% de la variance totale est expliquée par les deux axes

principaux. Tous les paramètres apparaissent du même côté par rapport au premier axe (c'est à dire sur la gauche de la figure). Deux groupes avec des paramètres corrélés ($p < 0,05$, test de Pearson) apparaissent en fonction de leur emplacement par rapport au second axe (présentés par des cercles en pointillé sur la Figure 44-A). Le premier groupe apparaît sur le haut de la figure, formé par le Zn et l'expression des gènes MT, MnSOD, CuZnSOD, CAT et ABCB1. Le second apparaît sur la partie inférieure de la figure, formé par le Ni, le Cu et le Cd, l'expression de COI et de la HSP70 et par l'IC (Figure 44-A et Tableau 21). La projection des individus sur les deux axes principaux de l'ACP (Figure 45-A) indique que tous les contrôles sont regroupés sur la droite de la figure avec des niveaux d'accumulation très faibles des différents métaux (Ni, Zn, Cu et Cd) ainsi que des niveaux d'expression très faibles des sept gènes étudiés. Par contre, les coques exposées se trouvent principalement sur la gauche de la figure avec une bioaccumulation des métaux et des niveaux d'expression très élevés (Figure 45-A). Cependant, quelques coques exposées sont groupées avec les témoins. Par ailleurs, la projection des individus en fonction du temps d'exposition (Figure 45-C) indique que les individus aux trois premiers temps d'exposition (12 heures, 1 jour, 2 jours) sont situés sur la droite, proches du groupe contrôle, avec un faible niveau d'expression des gènes étudiés et une faible bioaccumulation des métaux. Les individus aux temps 3, 5 et 6 jours d'exposition à F1 sont situés sur la gauche de la figure avec des niveaux d'expression et une bioaccumulation très élevées. On remarque également que les coques à 3 jours d'exposition sont situées au sommet de la Figure 44-C avec le plus haut niveau d'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif (MnSOD, CuZnSOD, CAT), MT et ABCB1, alors que les coques à 6 jours d'exposition sont situées en bas de la figure avec le plus haut niveau d'expression des gènes HSP70 et COI.

Pour l'ACP F2 (Figure 44-B) 62,8% de la variance totale est expliquée par les deux axes principaux. Un premier groupe formé de paramètres corrélés ($p < 0,05$, test de Pearson, Tableau 22) apparaît sur le haut de la figure, composé de l'expression de la CAT, de la MnSOD, de la CuZnSOD et de la MT (coefficients de corrélation de Pearson $> 0,517$, $p < 0,05$). Le second groupe apparaît sur le bas de la figure, composé par la bioaccumulation des métaux (Cd, Cu, Zn et Ni) et l'expression des gènes HSP70 et ABCB1 (coefficients de corrélation de Pearson $> 0,341$, $p < 0,05$, Tableau 22). L'expression de la COI, apparaît le long du premier axe, elle est fortement corrélée aux deux groupes (Tableau 22). La projection des individus sur les deux axes principaux de l'ACP (Figure 45-B) indique que tous les contrôles se trouvent sur la droite de la figure avec une faible bioaccumulation de tous les métaux, un

Etude de l'impact d'une contamination par les effluents sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque *Cerastoderma glaucum*

faible niveau d'expression des sept gènes étudiés et des valeurs d'IC très faibles. Par contre, les coques exposées se trouvent principalement sur la gauche de la figure avec une forte bioaccumulation de tous les métaux et un niveau d'expression élevé des gènes étudiés (Figure 45-B). La projection des individus en fonction du temps d'exposition (Figure 45-D) indique que la plupart des individus correspondant aux trois premiers temps d'exposition (12 heures, 1 et 2 jours) sont situés en haut et à gauche de la figure, avec des niveaux d'expression élevés des gènes codant pour les enzymes antioxydantes (CAT, MnSOD, CuZnSOD) et pour la MT. Par contre, la plupart des individus aux temps d'exposition 3, 5 et 6 jours sont projetés en bas et à gauche de la figure, avec une grande accumulation de métaux (Cd, Cu, Zn et Ni) et un haut niveau d'expression des gènes HSP70 et ABCB1 (Figure 45-D).

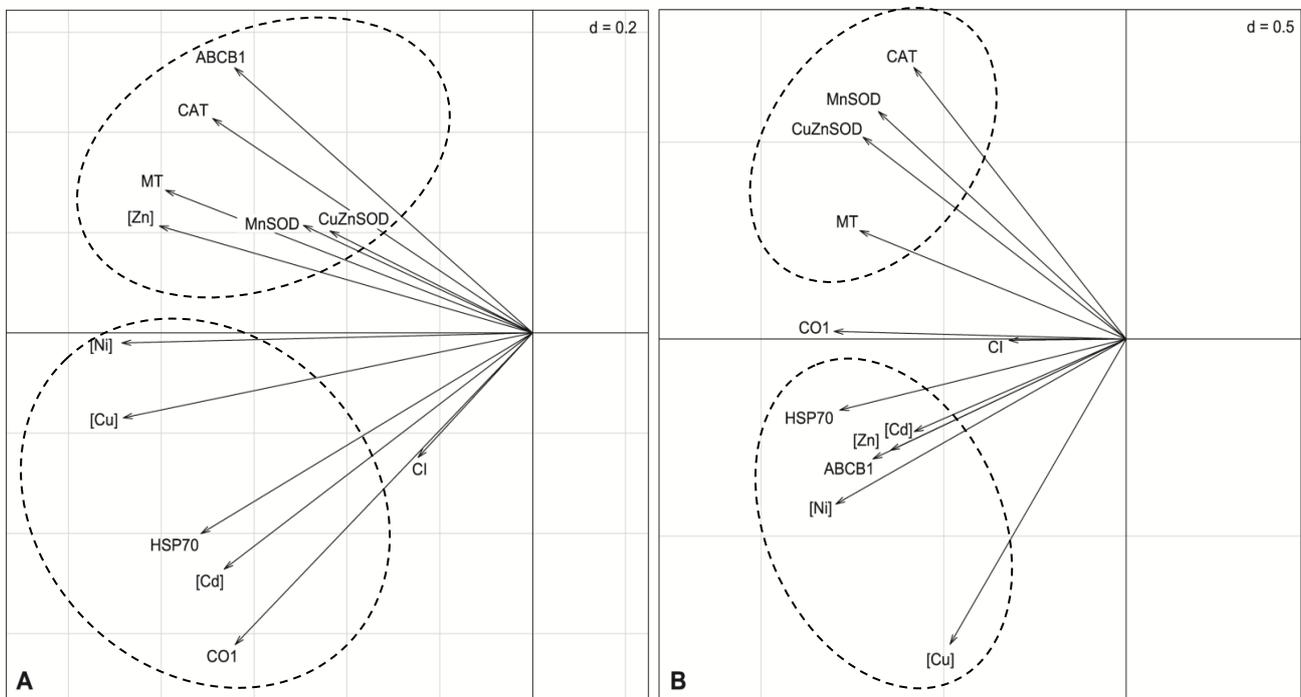


Figure 44 Analyse en composantes principales (ACP) de l'expression des gènes, la bioaccumulation des métaux (Ni, Zn, Cu et Cd) et l'IC. (A) ACP effectuée sur les individus contrôles et exposés à l'effluent F1; (B) ACP effectuée sur les individus contrôles et exposés à l'effluent F2; IC, indice de condition; [Ni], [Zn], [Cu], [CD], la bioaccumulation des métaux dans les tissus des coques.

Etude de l'impact d'une contamination par les effluents sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque Cerastoderma glaucum

Tableau 21 Matrice de corrélation entre la bioaccumulation des métaux, l'expression des différents gènes, et l'indice de condition des coques exposées à l'effluent F1 et des contrôles.

	ABCB1	CuZnSOD	MnSOD	CO1	HSP70	CAT	MT	CI	[Cu]	[Cd]	[Ni]	[Zn]
ABCB1	1	0,339	0,284	0,077	0,210	0,517	0,515	0,094	0,468	0,246	0,598	0,696
CuZnSOD	0,339	1	0,154	0,198	0,411	0,377	0,347	0,235	0,293	0,018	0,282	0,215
MnSOD	0,284	0,154	1	0,098	0,392	0,414	0,404	0,293	0,341	0,161	0,349	0,342
CO1	0,077	0,198	0,098	1	0,630	0,245	0,342	0,195	0,689	0,607	0,577	0,362
HSP70	0,210	0,411	0,392	0,630	1	0,382	0,460	0,346	0,638	0,562	0,495	0,340
CAT	0,517	0,377	0,414	0,245	0,382	1	0,788	0,090	0,534	0,217	0,457	0,448
MT	0,515	0,347	0,404	0,342	0,460	0,788	1	0,040	0,575	0,484	0,591	0,608
CI	0,094	0,235	0,293	0,195	0,346	0,090	0,040	1	0,139	0,155	0,088	0,067
[Cu]	0,468	0,293	0,341	0,689	0,638	0,534	0,575	0,139	1	0,585	0,840	0,689
[Cd]	0,246	0,018	0,161	0,607	0,562	0,217	0,484	0,155	0,585	1	0,610	0,474
[Ni]	0,598	0,282	0,349	0,577	0,495	0,457	0,591	0,088	0,840	0,610	1	0,869
[Zn]	0,696	0,215	0,342	0,362	0,340	0,448	0,608	0,067	0,689	0,474	0,869	1

Les coefficients de corrélation dont la p-values<0.05 sont indiqués en gras.

Etude de l'impact d'une contamination par les effluents sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque Cerastoderma glaucum

Tableau 22 Matrice de corrélation entre la bioaccumulation des métaux, l'expression des différents gènes et l'indice de condition des coques exposées à l'effluent F2 et des contrôles.

	ABCB1	CuZnSOD	MnSOD	COI	HSP70	CAT	MT	IC	[Cu]	[Cd]	[Ni]	[Zn]
ABCB1	1	0,392	0,235	0,487	0,642	0,218	0,463	-0,021	0,552	0,369	0,564	0,415
CuZnSOD	0,392	1	0,840	0,535	0,451	0,703	0,517	0,178	0,028	0,209	0,318	0,391
MnSOD	0,235	0,840	1	0,418	0,447	0,699	0,540	0,233	-0,079	0,315	0,304	0,328
COI	0,487	0,535	0,418	1	0,678	0,477	0,599	0,303	0,358	0,350	0,548	0,445
HSP70	0,642	0,451	0,447	0,678	1	0,232	0,507	0,198	0,464	0,428	0,601	0,384
CAT	0,218	0,703	0,699	0,477	0,232	1	0,619	0,096	-0,247	0,206	0,253	0,200
MT	0,463	0,517	0,540	0,599	0,507	0,619	1	0,183	0,150	0,318	0,469	0,246
IC	-0,021	0,178	0,233	0,303	0,198	0,096	0,183	1	0,134	0,158	0,286	0,218
[Cu]	0,552	0,028	-0,079	0,358	0,464	-0,247	0,150	0,134	1	0,341	0,697	0,493
[Cd]	0,369	0,209	0,315	0,350	0,428	0,206	0,318	0,158	0,341	1	0,598	0,350
[Ni]	0,564	0,318	0,304	0,548	0,601	0,253	0,469	0,286	0,697	0,598	1	0,662
[Zn]	0,415	0,391	0,328	0,445	0,384	0,200	0,246	0,218	0,493	0,350	0,662	1

Les coefficients de corrélation dont la p-values<0.05 sont indiqués en gras.

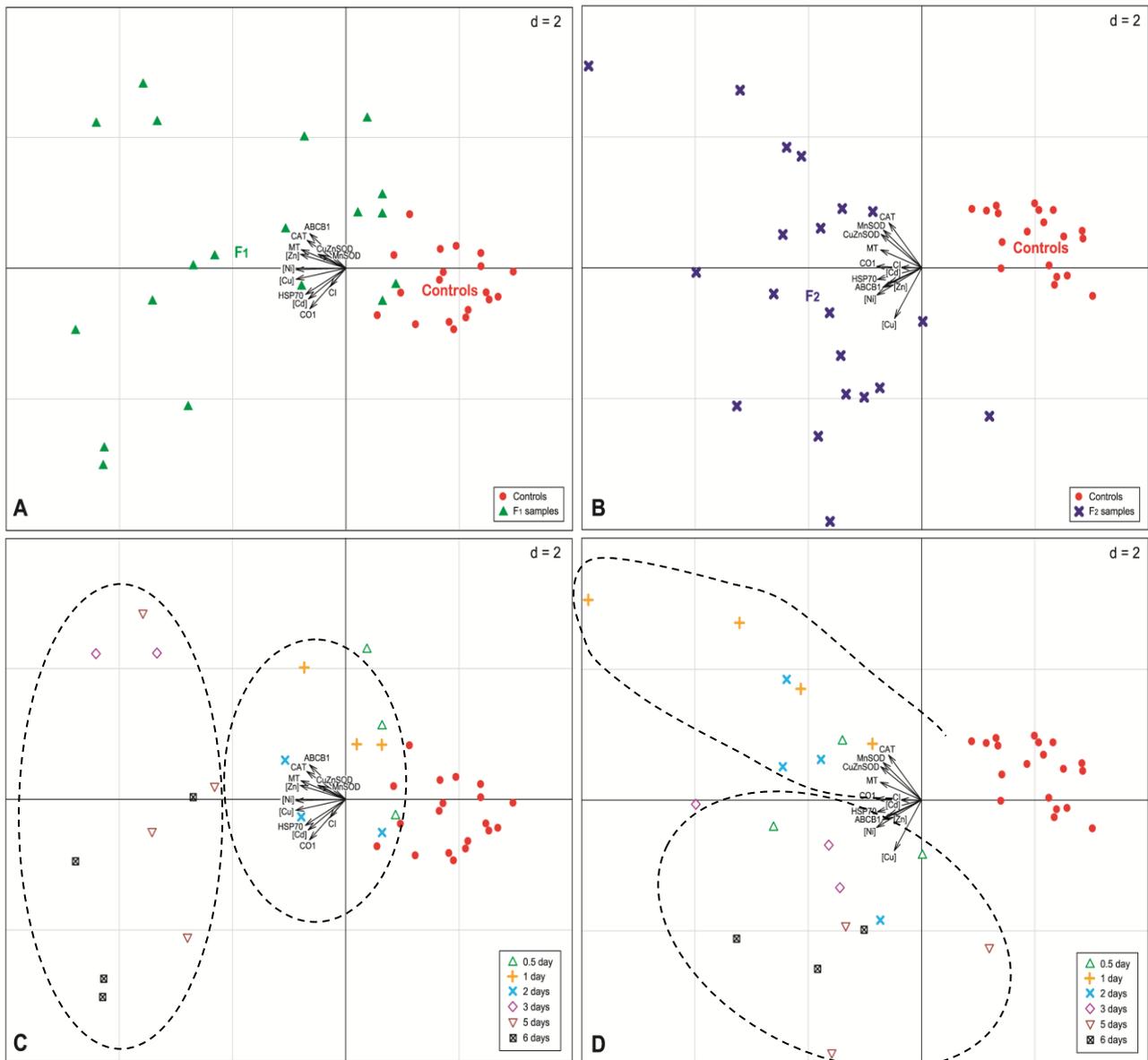


Figure 45 (A) Projections des individus selon les données quantitatives présentées dans la Figure 44-A (exposition à l'effluent F1); (B) Projections des individus selon les données quantitatives présentées dans la Figure 44-B (exposition à l'effluent F2) ; (C) Projections des individus en fonction du temps d'exposition à F1 ; (D) Projections des individus en fonction du temps d'exposition à F2.

III. Discussion

La pollution environnementale par les eaux usées municipales et industrielles est un problème majeur dans de nombreux pays. En effet, ces eaux contiennent généralement de nombreuses substances potentiellement polluantes (Gagné et al. 2008 ; Kamel et al. 2012 ; Sim et al. 2013). Les approches spécifiques qui utilisent un contaminant pur restent insuffisantes pour fournir les informations nécessaires qui concernent la toxicité des eaux. Ainsi, les expériences

qui utilisent un mélange de contaminants (les effluents) déversés dans l'environnement représentent une alternative qui permet de donner une réponse globale à la toxicité des eaux. Le golfe de Gabès (Tunisie) connaît une importante activité industrielle, principalement l'industrie de transformation des phosphates bruts ainsi que d'autres industries émettrices de métaux tels que les salines, les tanneries, les industries de textile, de céramique, les savonneries et les matériaux de construction (Barhoumi et al. 2009). La transformation de phosphates bruts en engrais chimique génère des effluents fortement chargés en métaux, en particulier en Cd, Zn et Cr (Javied et al. 2009 ; Tayibi et al. 2009 ; Mars et Okazaki 2012). Le but de notre étude est donc d'analyser les réponses des coques *C. glaucum* exposées à une dose sublétales (soit 1%) des deux effluents pendant 6 jours à travers l'étude de (1) la bioaccumulation des métaux dans les tissus, (2) l'état physiologique global des coques, (3) l'expression de plusieurs gènes clés et (4) la relation entre les niveaux d'expression génique et les niveaux d'accumulation de métaux.

1. Concentration des métaux dans les effluents

Les effluents (F1 et F2) utilisés dans cette étude ont été collectés à la sortie d'une usine de transformation de phosphate brut localisée près de Skhira dans le golfe de Gabès. F1 est un effluent global produit par trois unités de production différentes (acide sulfurique, acide phosphorique et des engrais) de l'usine SIAPE, tandis que F2 est le produit d'une seule unité (acide phosphorique). C'est pour cette raison que l'effluent F1 est beaucoup plus riche en métaux que l'effluent F2. Les effluents F1 et F2 sont plus chargés en métaux que d'autres effluents industriels d'origine tunisienne ou internationale cités dans la littérature (Hajem et al. 2006; Patela et al. 2009; Santos-Yabe et de Oliveira 2003; Sancey et al. 2011), en particulier la concentration en Cd de ces effluents dépasse les normes tunisiennes et françaises (TN 106,002 et le décret ministériel français du 22 Février 1998, respectivement).

2. Accumulation des métaux dans les tissus des coques

Les coques exposées en continu pendant une semaine aux effluents F1 et F2 (à la concentration de 1%) présentent des concentrations en métaux (Cd, Cu, Zn et Ni) plus importantes que chez les contrôles. Ces concentrations sont aussi plus élevées chez les coques exposées à F1 que chez celles exposées à F2, probablement en rapport avec la concentration initiale en métaux dans les deux effluents. L'accumulation du Cd était beaucoup moins importante que celle des autres métaux, ce qui peut s'expliquer au moins en partie par son taux d'assimilation plus faible que celui des autres métaux (Luoma et Rainbow 2005). La

concentration en Ni et en Zn est relativement constante pendant toute la durée de l'expérience (6 jours). Cependant la concentration en Cu et en Cd, augmente légèrement avec le temps d'exposition. Cette augmentation est en général très faible, sauf pour le cadmium ou elle est exponentielle chez les coques exposées à F1. Selon Luoma et Rainbow (2005), une faible variation d'un métal avec le temps d'exposition est en rapport avec une excrétion rapide de ce métal, tandis qu'une augmentation rapide de la concentration de ce dernier dans les tissus est en rapport avec une excrétion très lente de ce dernier. Nos résultats suggèrent donc que le phénomène d'excrétion est plus efficace pour le Ni et le Zn que pour le Cu et surtout le Cd chez *C. glaucum*.

3. L'état physiologique global des coques

Nos résultats montrent que l'exposition à l'effluent F1 affecte significativement la LT50, ce qui implique une perturbation métabolique et un statut physiologique général affaibli des coques exposées. Ce résultat suggère que les mécanismes de protection et/ou de détoxification peuvent impliquer des coûts énergétiques et donc peuvent réduire la capacité des coques à résister à un second stress qui dans notre cas consiste en une exposition à l'air libre (Viarengo et al. 1995). De tels compromis énergétiques ont déjà été décrits dans la littérature chez plusieurs organismes marins (Forbes 2000 ; Handy et al. 1999 ; Van Straalen et Hoffman 2000). Le même profil de réponse est observé pour l'effluent F2 mais d'une manière non significative. Cette différence peut s'expliquer par la concentration très importante en métaux de l'effluent F1 par rapport à F2.

Les mesures de l'indice de condition chez les bivalves sont considérées comme des indicateurs fiables de l'état physiologique et des réserves énergétiques. Cependant, les résultats obtenus dans ce travail ne montrent pas de différences significatives entre les individus contrôles et exposés. Ce résultat peut être dû au fait que ce paramètre est trop intégratif et que seulement 6 jours d'exposition pourraient ne pas être suffisants pour produire des variations sensibles entre les coques témoins et exposées aux effluents. Ceci se confirme par les résultats de l'ACP. En effet l'IC est représenté par de petites flèches sur la figure 44 de l'ACP indiquant que ce dernier est un paramètre faiblement structurant.

4. Effet de l'exposition aux effluents sur l'expression des gènes

L'expression des sept gènes étudiés est significativement plus élevée chez les coques exposées (F1 et F2) que chez les témoins. De plus, la présence d'une grande variabilité (larges box plots) suggère l'existence de différents types de réponses chez les coques dans les mêmes

conditions d'exposition. La projection des individus dans l'ACP confirme ces résultats. En effet, pour les deux types d'effluents, les individus contrôles se trouvent assez groupés alors que les individus exposés sont plus dispersés (Figure 45-A et B).

L'expression d'ABCB1 présente un profil diffus et indépendant du temps d'exposition que ce soit pour les individus exposés à F1 ou à F2. En effet, l'expression de ce gène augmente à 12 h et à 24 h, suivi par une diminution et un second pic à 3 jours pour F1 et à 5 jours pour F2. Par ailleurs, ce biomarqueur est significativement corrélé à la bioaccumulation de métaux (Cd, Zn, Ni et Cu) pour les coques exposées à F2. La protéine ABCB1 est un transporteur transmembranaire dont l'activité est d'expulser activement les toxines hors de la cellule (Minier et al 2006 ; Pain et Parant 2003) et notre travail montre que son expression est modulée par les niveaux d'exposition aux métaux. Ces résultats rejoignent plusieurs travaux qui ont mis en évidence une forte augmentation de l'expression de ce gène chez plusieurs organismes marins suite à une exposition au cadmium et à d'autres métaux (Franzelli et Fabbri 2006 ; Ivanina et Sokolova 2008 ; Zucchi et al. 2010 ; Della Torre et al. 2014).

Pour les deux effluents, les défenses anti oxydantes sont déclenchées par l'augmentation de l'expression des gènes CAT, CuZnSOD et MnSOD. Le rôle principal des SODs (CuZnSOD et MnSOD étant respectivement les formes cytosoliques et mitochondriales) est de catalyser la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, qui est à son tour réduit par la CAT en eau et en oxygène moléculaire. L'augmentation de l'expression de ces enzymes anti-oxydantes, en réponse à l'exposition aux effluents constitue une adaptation pour prévenir et/ou réparer les dommages induits par le métal (Fernandez et al. 2010). Plusieurs études ont démontré que les métaux peuvent déclencher le stress oxydatif dans les cellules (Sabatini et al. 2011; Trevisan 2014; Wang et al. 2010) en particulier les travaux de Kamel et al. 2012 ont démontré une corrélation positive entre la CAT, la MnSOD et l'accumulation des métaux chez des palourdes traitées par des effluents municipaux.

Le gène MT est également induit en réponse à l'exposition aux deux effluents. Une augmentation significative de son expression (+35 fois) est observée au deuxième jour d'exposition pour les coques exposées à F2 alors qu'un profil presque linéaire est observé pour les individus exposés à F1 pour lesquels l'expression de MT atteint la valeur maximale (+20 fois) au 6ème jour d'exposition. La surexpression de ce gène confirme d'autres travaux réalisés avec différents invertébrés suite à des expositions à différents métaux (Al Kaddissi et al. 2012 ; Dondero et al. 2005 ; Lecoeur et al. 2004; Navarro et al. 2011 ; Zorita et al. 2007). Ces résultats reflètent le rôle important des MTs dans la séquestration et la détoxification des

métaux, ainsi que leur rôle en tant qu'antioxydants réagissant avec les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui permet de réduire considérablement la toxicité des ROS et de prévenir des interactions avec les composantes cellulaires telles que les enzymes, les protéines structurales, l'ADN et les lipides membranaires (Amiard et al. 2006 ; Andrews, 2000 ; Coyle et al. 2002 ; Ivanina et al. 2009 ; Kamel et al. 2012 ; Tanguy et al. 2001).

L'expression des gènes COI et HSP70 est remarquablement plus importante chez les coques exposées à l'effluent F2 avec une forte corrélation avec la bioaccumulation de métaux pour les deux effluents. Pour les coques exposées à l'effluent F1, cette surexpression est surtout observée dans la deuxième partie de l'expérience c'est-à-dire entre 3 et 6 jours d'exposition. Le rôle de la cytochrome c oxydase (dont le gène COI code une sous-unité) est de transférer les électrons du cytochrome c à l'oxygène moléculaire dans la chaîne respiratoire mitochondriale et de contribuer à la production d'un gradient électrochimique de protons à travers la membrane interne mitochondriale ce qui entraîne la synthèse de l'ATP (Capaldi et al. 1983; Capaldi 1990). L'augmentation de l'expression de ce gène suite à l'exposition aux effluents reflète une activité métabolique très importante chez les coques exposées. Cela pourrait être une stratégie cellulaire (1) pour compenser la diminution du nombre de mitochondries fonctionnelles en augmentant la production d'ATP de manière à fournir suffisamment d'énergie pour les besoins cellulaires, notamment pour tolérer les métaux (Al Kaddissi et al. 2012) ; ou (2) pour consommer efficacement l'O₂ ce qui permet de limiter les dommages oxydatifs provoqués par le métal dans les cellules (Chen 2003; Wang et al. 2004). Nos résultats rejoignent donc plusieurs études qui ont mis en évidence une augmentation de l'expression du gène COI suite à une exposition au Cd et à d'autres métaux (Achard-Joris et al. 2006 ; Al Kaddissi et al. 2012 ; Navarro et al. 2011). La réponse du gène HSP70 est presque similaire à celle de COI après exposition aux deux effluents F1 et F2. Les protéines HSP70 sont impliquées dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées et endommagées ainsi que dans la séquestration et la dégradation des protéines qui sont endommagés sans espoir de réparation (Mayer et Bukau 2005). Les HSP70s sont connues pour être synthétisées de façon intensive en réponse à une variété de facteurs de stress (chaleur, métaux, contaminants organiques...) et plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de l'expression des HSP70s chez les bivalves tel que *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea virginica* suite à l'exposition à des métaux tel que le Cu, le Cd, le Pd, le Pt et le Rt (Ivanina et al. 2008 ; Ivanina et al. 2009 ; Navarro et al. 2011). Ainsi la surexpression du

gène HSP70 observée dans notre travail (atteignant 15 et 75 fois le niveau d'expression des contrôles pour F1 et F2 respectivement) confirme les données précédentes et reflète un mécanisme de protection des cellules contre les dommages induits par le stress.

Enfin, on peut noter que l'exposition à F1 versus F2 semble avoir un impact sur le profil global de l'expression des gènes au cours du temps. En effet, l'expression des différents gènes étudiés (exception faite d'ABCB1) est plus importante chez les individus exposés à F2 par rapport à ceux exposés à F1 bien que F1 soit plus riche en métaux que F2 et provoque une accumulation plus forte de métaux dans les tissus des coques. Des études similaires récentes sur les daphnies ont montré également que la régulation de l'expression des gènes se produit à des concentrations en métaux inférieures (même si l'accumulation était plus grande à des concentrations plus élevées). Donc, un niveau de stress élevé (cas de F1) peut causer une inhibition de la transcription et/ou une dégradation de l'ARNm plutôt que des mécanismes de défense (Klaper et al. 2008 ; Lerebours et al. 2010 ; Poynton et al. 2008).

IV. Conclusion partielle

La réponse transcriptionnelle de 7 gènes impliqués dans différents types de stress montre que pour les deux expositions (F1 et F2), des mécanismes sont rapidement mis en place pour prévenir les dommages cellulaires par (1) la détoxification et l'expulsion des métaux hors de la cellule par la régulation de l'expression des gènes MT et ABCB1, (2) la réduction de la toxicité des ROS par la régulation de l'expression des enzymes antioxydantes (CAT, CuZnSOD et MnSOD), (3) la protection et/ou la réparation des protéines par la régulation de l'expression de la HSP70 et (4) l'augmentation de la production d'ATP (à travers la régulation de l'expression de COI) pour fournir de l'énergie nécessaire aux cellules et leur permettre de tolérer une exposition au stress. Ces réponses moléculaires impliquent des coûts énergétiques qui pourraient expliquer la diminution de la tolérance de la coque à l'anoxie observée avec le test de stress-on-stress. Dans la suite de ce travail, nous allons étudier la réponse de la coque à un contaminant pur (le Cd), en utilisant les mêmes marqueurs.

Chapitre IV.B

Etude de l'impact d'une contamination par le cadmium sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque *Cerastoderma glaucum*

I. Introduction

Deux sources majeures sont à l'origine de la présence du cadmium dans le milieu aquatique : la source naturelle, représentée par les roches phosphatiques et les sols, et la source anthropique, représentée par les effluents industriels et urbains et les ruissellements agricoles (Choi et al. 2008). Le cadmium est parmi les métaux les plus toxiques dans l'environnement. Il est souvent retrouvé dans les engrais phosphatés (Cupit et al. 2002) et comme sous-produit du raffinage du zinc (Pinot et al. 2000). Le cadmium peut rentrer dans la chaîne alimentaire aquatique via la consommation de l'eau. Il peut ensuite être accumulé à chaque niveau de la chaîne trophique alimentaire et par conséquent l'homme peut accumuler une grande quantité de Cd via l'alimentation (Zhu et al. 2012). Le Cd peut donc être considéré comme un important problème environnemental. Dans ce sens, plusieurs programmes de bio-surveillance de la qualité des milieux aquatiques ont été mis en place afin d'étudier les effets du Cd à plusieurs niveaux de l'organisation biologique (écosystème, communauté ou population) (Al Kaddissi et al. 2012 ; Brooks et al. 2004 ; Issartel et al. 2010 ; Morin et al. 2007). Les réponses à l'exposition au Cd ont été étudiées chez plusieurs bivalves marins, tels que les coques (Ladhar-Chaabouni et al. 2008 ; Paul-Pont et al. 2012), les moules (Navarro et al. 2011), les huîtres (Ivanina et al. 2008a, 2008b ; Sanni et al. 2008), *Argopecten irradians* (Wang et al. 2009), *Meretrix meretrix* (Wang et al. 2010) et certains bivalves d'eau douce (Bigot et al. 2009). Afin de mettre en évidence ces réponses, différents biomarqueurs ont été utilisés à différents niveaux de l'organisation biologique : biochimique (Sanni et al. 2008 ; Ladhar-Chaabouni et al. 2008), transcriptionnel (Ivanina et al. 2008a ; Sanni et al. 2008 ; Wang et al. 2009, 2010 ; Paul-Pont et al. 2012 ; Navarro et al. 2011 ; Bigot et al. 2009), protéomique (Ivanina et al. 2008a, 2008b) et histochimique (Bigot et al. 2009). Ces études ont montré que l'exposition au Cd peut inhiber l'activité de certaines enzymes mitochondriales et induire l'expression de certains gènes de détoxification et de défense, mais leur régulation reste complexe.

En Tunisie, le golfe de Gabès est connu pour être contaminé par plusieurs éléments métalliques, en particulier par le Cd qui provient principalement de l'activité de la SIAPE (industrie de transformation des phosphates bruts) (Hamza-Chaffai et al. 2003 ; Smaoui-Damak et al. 2003). Les concentrations en Cd chez des bivalves collectés dans cette zone dépassent le niveau fixé par l'OMS (Machreki-Ajmi et Hamza-Chaffai 2006 ; Smaoui-Damak

et al. 2003). Parmi les bivalves de cette région, la coque *C. glaucum* a été utilisée précédemment comme bio-indicatrice de la pollution de cette zone dans quelques études de terrain ainsi qu'en conditions contrôlées (Machreki-Ajmi et al. 2009 ; Szefer et al. 1999). En effet, cette espèce est capable d'accumuler de fortes concentrations de métaux y compris le Cd (Machreki-Ajmi et al. 2009 ; Szefer et al. 1999). La réponse de cette espèce à une exposition au Cd a été précédemment étudiée en utilisant des biomarqueurs biochimiques (Ladhar-Chaabouni et al. 2008 ; 2009). L'originalité de notre travail réside dans l'étude de la réponse de *C.glaucum* à l'exposition au Cd en utilisant des marqueurs moléculaires. En effet, l'analyse de l'expression des gènes par qRT-PCR est devenue l'un des outils les plus robustes en biologie moléculaire. De plus, les changements dans l'expression des gènes sont susceptibles de jouer un rôle essentiel dans l'acclimatation et l'adaptation aux changements environnementaux puisqu'ils précèdent la manifestation de fortes altérations fonctionnelles et permettent donc la détection précoce de ces altérations (Schulte 2004 ; Mirbahai et Chipman 2013 ; Schulte 2001 ; Steiner et Anderson 2000).

L'objectif de notre travail est donc de mettre en évidence les modifications de l'expression des sept gènes déjà utilisés pour la partie *in situ* et pour l'exposition aux effluents industriels (MT, ABCB1, HSP70, COI, MnSOD, CuZnSOD et CAT) suite à l'exposition des coques au Cd. Contrairement à la plupart des travaux qui analysent l'expression des gènes sur des pools d'échantillons (par exemple Ciacci et al. 2012 ; Navarro et al. 2009), notre travail analyse l'expression des gènes par individu afin de mettre en évidence la variabilité inter-individuelle des coques dans les mêmes conditions d'exposition. L'impact du Cd sur la réponse transcriptionnelle de ces gènes a été analysé avec une très forte concentration en Cd (5 mg/L) et une autre relativement faible (50 µg/L) pendant une période allant de 12 heures à 18 jours. La capacité des coques à survivre sous anoxie (test de stress-on-stress) a été évaluée ainsi que l'accumulation du Cd. Finalement, les relations entre le niveau d'expression des gènes et le niveau d'accumulation du Cd ont été examinées afin de mettre en évidence un profil d'expression chez des coques exposées *in vivo* au Cd.

II. Résultats

1. Taux de mortalité, stress-on-stress et indice de condition

Le taux de mortalité de *C.glaucum* a été analysé pour chaque condition (T, 50µg/L et 5mg/L)

Etude de l'impact d'une contamination par le cadmium sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque Cerastoderma glaucum

et pour chaque temps d'exposition. Les résultats obtenus montrent que ce taux était toujours inférieur à 10%.

La survie sous anoxie (test de stress-on-stress) est significativement affectée par l'exposition au Cd (Figure 46). En effet, une diminution significative des valeurs de la LT50 est observée avec l'augmentation de la concentration en Cd ($p < 0.001$) et avec le temps d'exposition ($p < 0.001$, Figure 46). La LT50 des coques contrôles est de 8 jours et diminue à 2 jours pour les individus après 15 jours d'exposition à 50 $\mu\text{g/L}$ de Cd. Pour les coques exposées à 5mg/L, la LT50 passe de 6 jours (après 1 jour d'exposition) à 1 jour (après 15 jours d'exposition).

Pour l'indice de condition, aucune différence significative n'a été enregistrée entre les individus contrôles ($9,14 \pm 2,42$) et exposés (50 $\mu\text{g/L}$: $7,39 \pm 1,75$; 5 mg/L : $8,39 \pm 1,98$) après 18 jours d'exposition.

Etude de l'impact d'une contamination par le cadmium sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque *Cerastoderma glaucum*

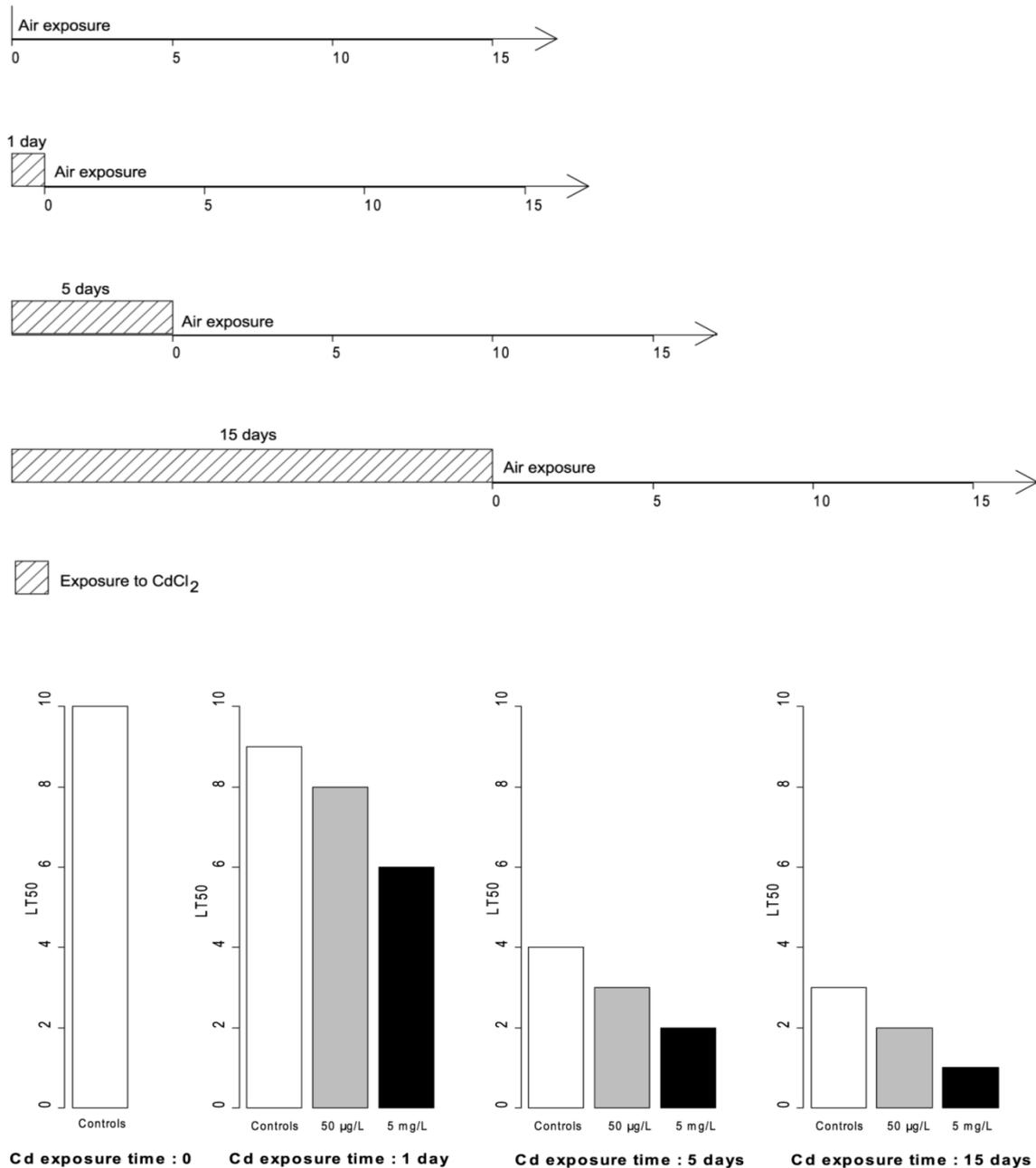


Figure 46 Protocole et résultats du test de stress-on-stress. A) Les conditions expérimentales: la longueur de la barre hachurée indique le temps d'exposition au CdCl₂. La flèche indique la suite de survie sous anoxie après exposition. B) Résultats: LT50 (en jours) des coques soumises à l'anoxie après exposition à 50 µg/L et à 5 mg/L de CdCl₂ et à chaque temps d'exposition.

2. Accumulation du Cd dans les tissus des coques

La concentration en Cd dans les tissus des individus contrôles reste faible et relativement constante. Pour les coques exposées à 50 µg/L, la concentration en Cd augmente

significativement jusqu'à 0,5µg/g et ne varie pratiquement plus avec le temps d'exposition. Par contre, pour les animaux exposés à 5mg/L, la concentration en Cd augmente fortement avec le temps d'exposition pour atteindre $35,9 \pm 2,850$ µg/g au 18^{ème} jour d'exposition (Figure 47).

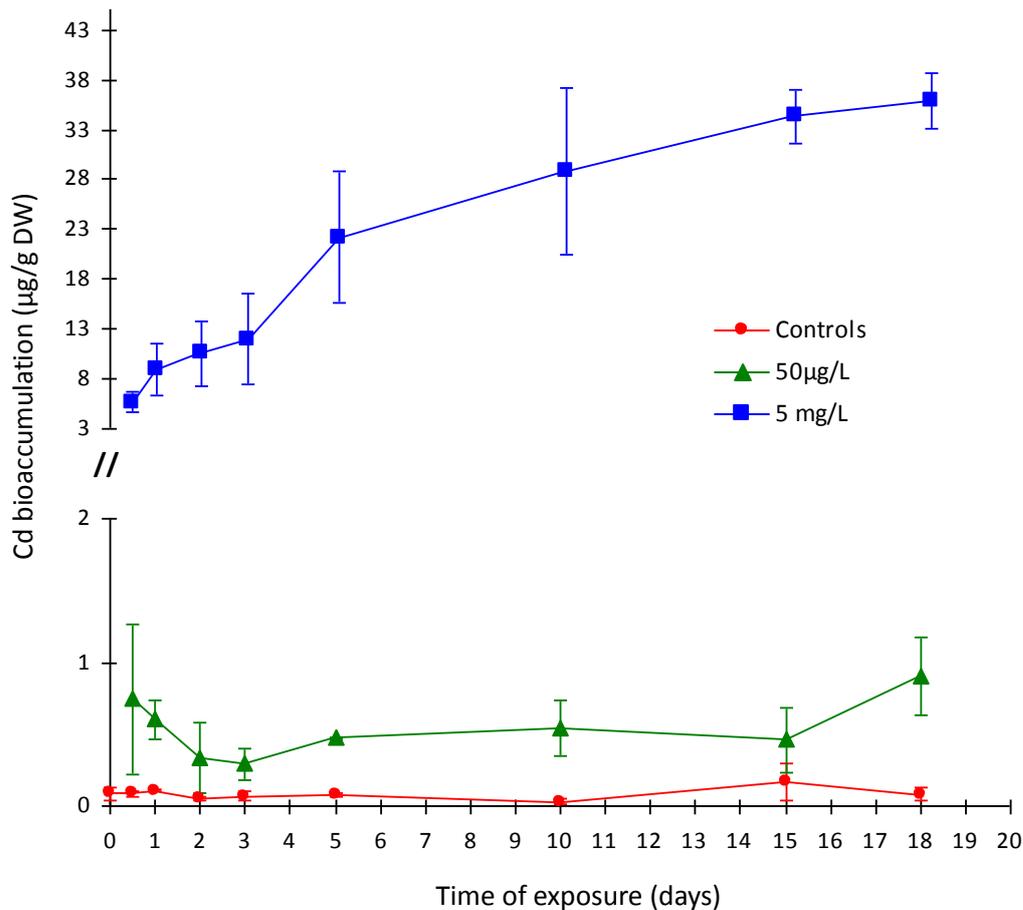


Figure 47 .Bioaccumulation du Cd [µg/g (PS)] chez les coques témoins et exposées à 50µg/L et à 5mg/L. Les données sont exprimées en moyenne \pm ET (n = 5); PS: poids sec.

3. Effet de l'exposition au Cd sur l'expression des différents gènes

L'expression relative des 7 gènes étudiés est représentée sur les Figures 48 et 49 sous forme de « box plots ». L'expression de ces gènes est globalement plus élevée chez les coques exposées (pour les deux concentrations 50µg/L et 5mg/L) que chez les témoins. Cependant,

Etude de l'impact d'une contamination par le cadmium sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque *Cerastoderma glaucum*

des profils différents sont observés pour les 7 gènes. L'exposition au Cd entraîne une augmentation de l'expression des gènes CuZnSOD (243 fois plus importante que la moyenne de l'expression des contrôles), CAT (x49), MT (x44) et HSP70 (x379) (Figure 48A-D et Tableau 23). Les changements dans l'expression des gènes CAT, MT et HSP70 semblent dose-dépendants ; en effet, l'influence du traitement par le Cd est plus importante chez les individus exposés à 5mg/L que chez ceux exposés à 50µg/L (Figure 48B-D et Tableau 23). L'expression des gènes augmente globalement avec le temps d'exposition pour CuZnSOD, MT et HSP70 pour les coques exposées à 50µg/L et pour CAT et MT chez les coques exposées à 5mg/L (Figure 48A-D et Tableau 23).

Globalement, l'expression des gènes COI, MnSOD et ABCB1 n'a pas été influencée par l'exposition au Cd quelque soit sa concentration, en particulier parce qu'il existe une grande variation inter-individus. Par contre, l'expression de certains de ces gènes semble varier en fonction du temps d'exposition. C'est le cas de la MnSOD chez les coques exposées à 50µg/L et de COI chez les coques exposées à 5 mg/L dont l'expression tend à diminuer avec le temps d'exposition (Figure 49 et Tableau 23).

Tableau 23 Influence du traitement et du temps d'exposition sur l'expression des différents gènes par rapport aux contrôles

		CuZnSOD	CAT	MT	HSP70	COI	MnSOD	ABCB1
50 µg/L	Traitement par le Cd	+ ^{a***b}	+*	+*	+*	/	/	/
	Temps d'exposition	+**	/	+**	+***	/	-***	/
5 mg/L	Traitement par le Cd	+***	+***	+***	+***	/	/	/
	Temps d'exposition	/	+***	+**	/	-***	/	/

^a Effet global: +, effet positif (l'expression augmente); -, effet négative (l'expression diminue);

^b signifiante statistique: *, p≤0.05; **, p≤0.01; ***, p≤0.001; /, pas d'effet significatif (p>0.05).

Etude de l'impact d'une contamination par le cadmium sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque Cerastoderma glaucum

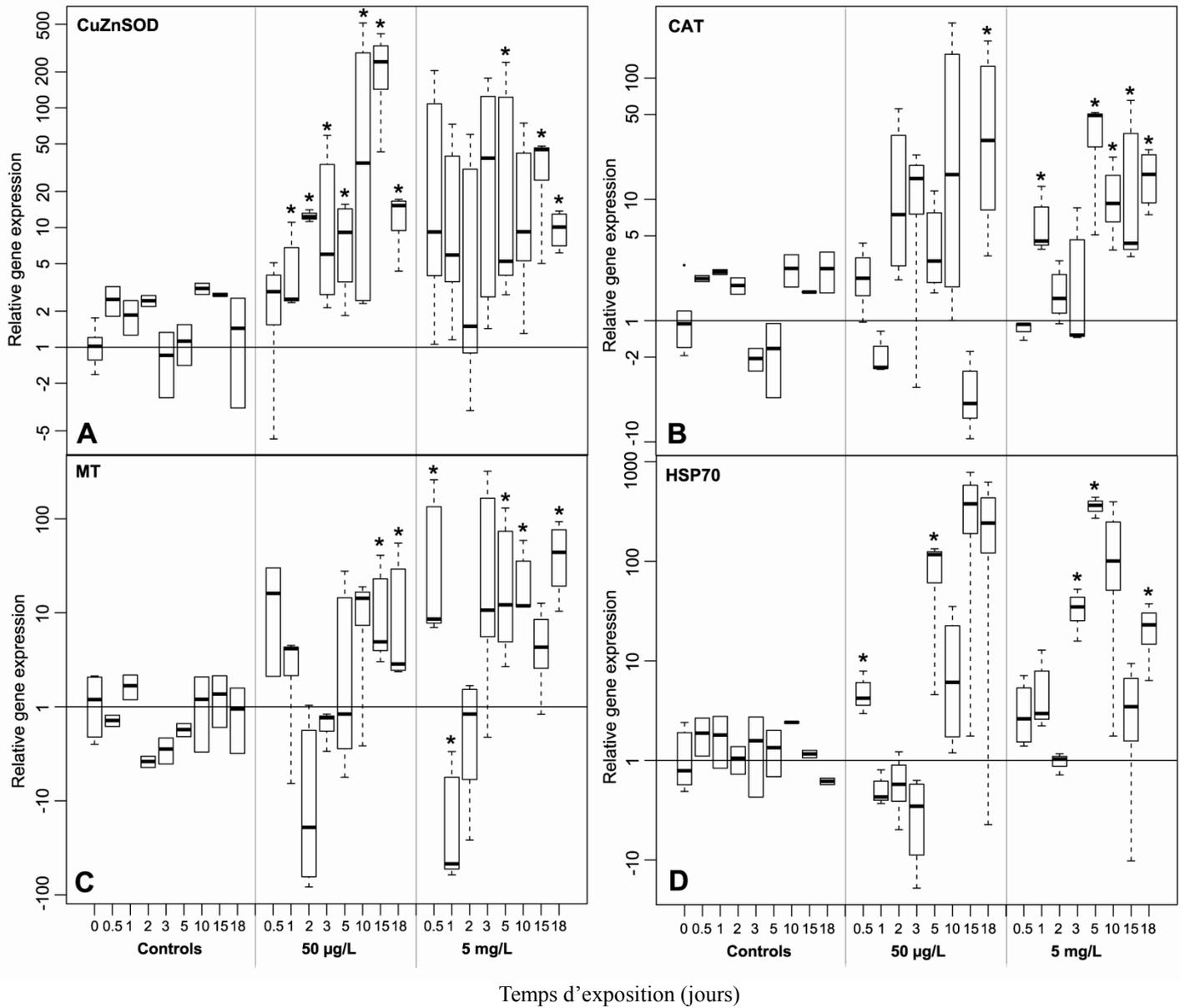


Figure 48 Profils d'expression des gènes CuZnSOD (A), CAT (B), MT (C) et HSP70 (D). Les différences de niveau d'expression (échelle logarithmique) sont exprimées par rapport aux contrôles au temps T0. Les différences significatives par rapport aux contrôles sont représentées par des astérisques ($p < 0,05$, test de Kolmogorov-Smirnov).

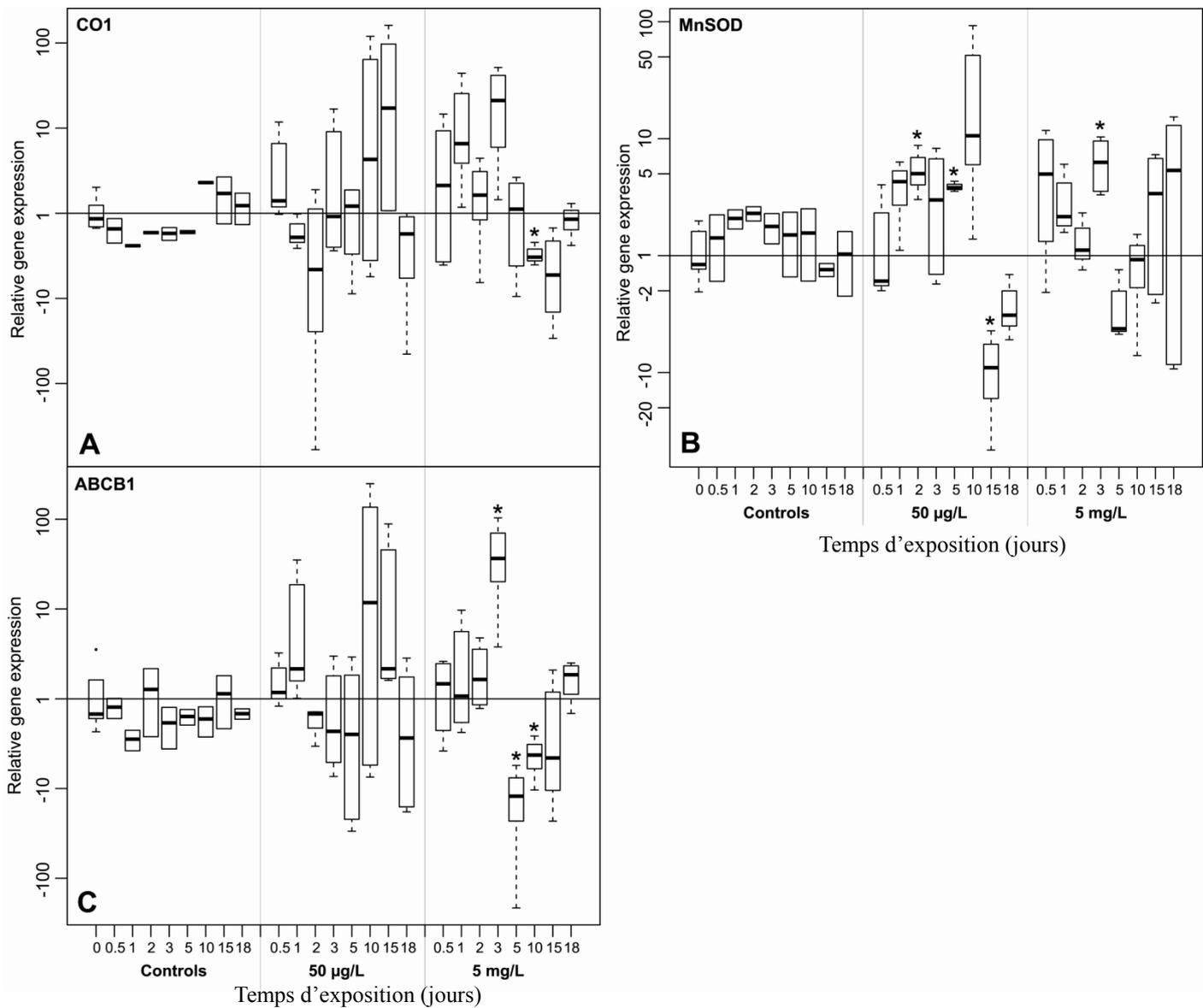


Figure 49 Profils d'expression des gènes COI (A) MnSOD (B) et ABCB1(C). Les différences de niveau d'expression (échelle logarithmique) sont exprimées par rapport aux contrôles au temps T0. Les différences significatives par rapport aux contrôles sont représentées par des astérisques ($p < 0,05$, test de Kolmogorov-Smirnov).

4. Analyse en composante principale

Pour mettre en évidence les relations entre les niveaux d'expression des 7 gènes, l'IC et la bioaccumulation des métaux (Cd, Cu, Zn et Ni), deux ACP ont été réalisées : la première considérant les coques contrôles et exposées à 50µg/L et la deuxième considérant les individus contrôles et exposés à 5mg/L (Figure 50). Les paires de corrélations ont été testées statistiquement et les résultats sont présentés dans les Tableaux 24 et 25.

Etude de l'impact d'une contamination par le cadmium sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque Cerastoderma glaucum

Dans l'ACP de 50µg/L, 58,3% de la variance totale est expliquée par les deux axes principaux représentés sur la figure 50-A. Des corrélations positives sont observées entre la bioaccumulation du Cd et l'expression des gènes MT, HSP70, CuZnSOD, CO1, CAT et ABCB1 (Figure 50-A et Tableau 24). Cependant, aucune corrélation n'a été observée entre ce groupe et l'expression de MnSOD ou l'IC. La projection des échantillons sur les deux axes principaux de l'ACP (Figure 50-C) indique que tous les échantillons contrôles sont groupés sur la droite de la figure avec une faible bioaccumulation de Cd et de bas niveaux d'expression des gènes HSP70, MT, CuZnSOD, CO1, CAT et ABCB1. Par contre, les coques exposées à 50µg/L de Cd se trouvent principalement groupées sur la gauche de la figure avec une forte bioaccumulation de Cd et des niveaux très hauts des biomarqueurs cités ci-dessus (Figure 50-C).

Dans l'ACP de 5mg/L (Figure 50-B), 61,4% de la variance totale est expliquée par les deux axes principaux. Une forte corrélation positive ($p < 0,05$; Tableau 25) est observée entre l'accumulation du Cd et l'expression des gènes CAT, HSP70, MT et CuZnSOD. Ce groupe est négativement corrélé à l'IC et à l'expression de la MnSOD mais se trouve non corrélé à l'expression des gènes COI et ABCB1 (Figure 50-B et Tableau 25). Les expressions des 2 gènes COI et ABCB1 sont par contre fortement corrélées l'une à l'autre (Figure 50-B et Tableau 25, $p < 0,05$). La projection des individus sur les deux axes principaux de l'ACP (Figure 50-D) indique que tous les animaux contrôles sont regroupés à droite de la figure avec une faible bioaccumulation du Cd et un faible niveau d'expression des gènes HSP70, MT, CuZnSOD et CAT, mais avec de forts IC et une forte expression de la MnSOD. Par contre, les coques exposées à 5 mg/L sont groupées à gauche de la figure avec une forte bioaccumulation du Cd et de forts niveaux d'expression des biomarqueurs précédemment cités (Figure 50-D). Cependant un animal exposé au Cd (5 mg/L) se mêle aux individus contrôles (quart inférieur droit de la figure) et deux individus exposés se retrouvent reliés au groupe « forte expression des gènes ABCB1 et COI » (Figure 50-D). Toutefois, ces deux derniers se distinguent nettement des individus contrôle et reflètent la forte variabilité inter-individuelle de ces paramètres.

Etude de l'impact d'une contamination par le cadmium sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque Cerastoderma glaucum

Tableau 24 Matrice de corrélation entre la bioaccumulation du Cd, les expressions relatives des différent gènes et l'IC des coques exposés à 50 µg/L de Cd et les contrôles.

	[Cd]	CAT	CuZnSOD	MT	HSP70	ABCB1	COI	MnSOD	CI
[Cd]	1	0,558	0,419	0,549	0,595	0,358	0,078	0,123	-0,222
CAT	0,558	1	0,522	0,472	0,463	0,551	0,285	0,440	0,066
CuZnSOD	0,419	0,522	1	0,361	0,638	0,439	0,292	0,135	-0,091
MT	0,549	0,472	0,361	1	0,571	0,330	0,530	0,142	-0,189
HSP70	0,595	0,463	0,638	0,571	1	0,187	0,259	-0,092	-0,289
ABCB1	0,358	0,551	0,439	0,330	0,187	1	0,604	0,301	-0,100
COI	0,078	0,285	0,292	0,530	0,259	0,604	1	0,011	-0,040
MnSOD	0,123	0,440	0,135	0,142	-0,092	0,301	0,011	1	0,240
CI	-0,222	0,066	-0,091	-0,189	-0,289	-0,100	-0,040	0,240	1

Les coefficients de corrélation dont la p-values<0.05 sont indiqués en gras.

Tableau 25 Matrice de corrélation entre la bioaccumulation du Cd, les expressions relatives des différent gènes et l'IC des coques exposés à 5mg/L Cd et les contrôles

	[Cd]	CAT	CuZnSOD	MT	HSP70	ABCB1	COI	MnSOD	CI
[Cd]	1	0,687	0,678	0,710	0,617	-0,053	-0,299	0,038	-0,286
CAT	0,687	1	0,586	0,704	0,719	-0,277	-0,145	-0,141	-0,178
CuZnSOD	0,678	0,586	1	0,640	0,509	0,014	0,097	-0,041	-0,307
MT	0,710	0,704	0,640	1	0,758	-0,040	0,100	-0,120	-0,300
HSP70	0,617	0,719	0,509	0,758	1	-0,139	0,050	-0,128	-0,232
ABCB1	-0,053	-0,277	0,014	-0,040	-0,139	1	0,628	0,188	-0,084
COI	-0,299	-0,145	0,097	0,100	0,050	0,628	1	-0,194	-0,026
MnSOD	0,038	-0,141	-0,041	-0,120	-0,128	0,188	-0,194	1	0,205
CI	-0,286	-0,178	-0,307	-0,300	-0,232	-0,084	-0,026	0,205	1

Les coefficients de corrélation dont la p-values<0.05 sont indiqués en gras.

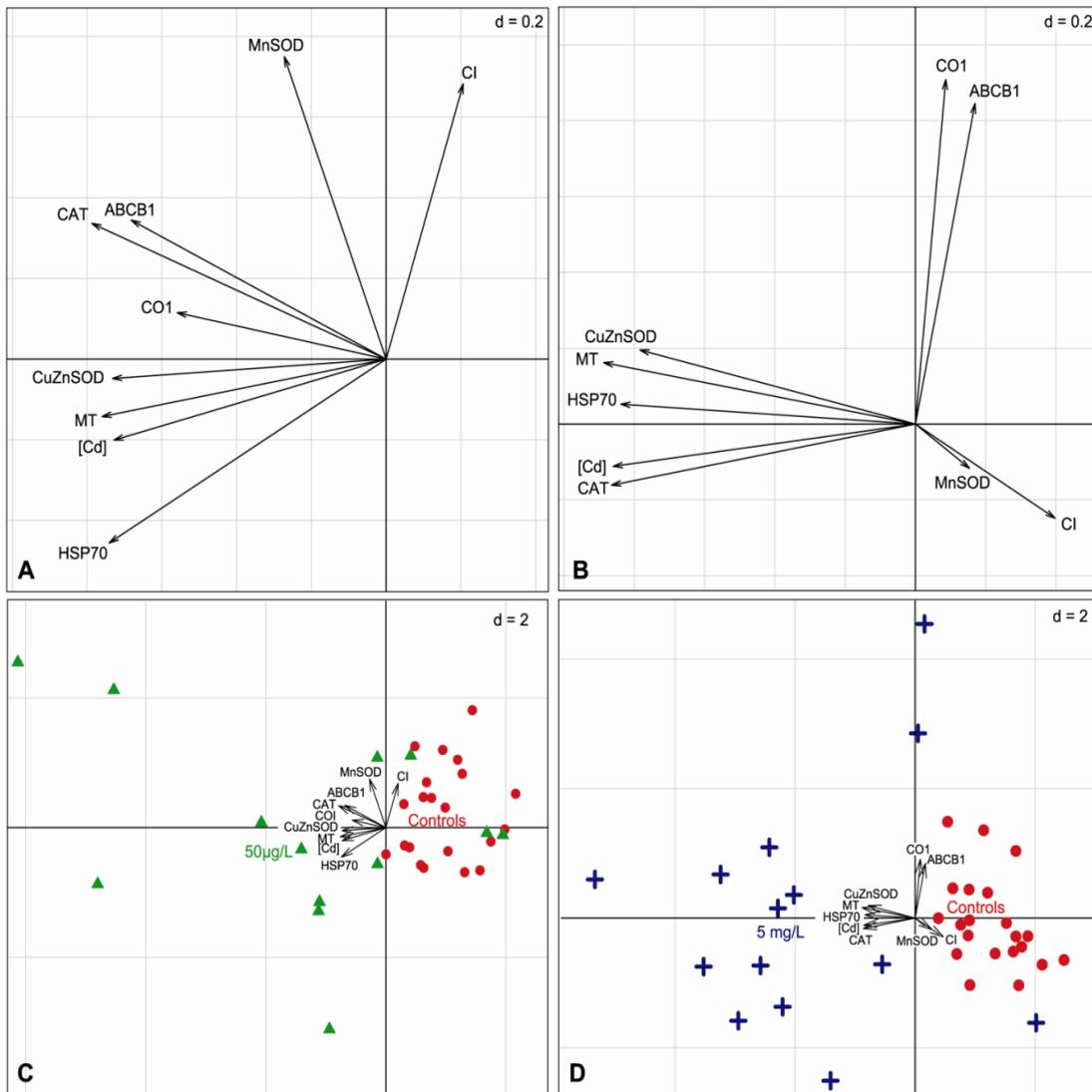


Figure 50 Analyse en composantes principales (ACP) de l'expression des gènes, la bioaccumulation du Cd et l'IC. (A) ACP effectuée sur les coques contrôles et exposées à 50µg/L; (B) ACP effectuée sur les individus contrôles et exposés à 5mg/L; (C) Projections des individus selon les données quantitatives présentées en (B) (exposition à la concentration de 50µg/L) (B) ACP effectuée sur les individus contrôles et exposés à 5mg/L; (D) Projections des individus selon les données quantitatives présentées en (B) (exposition à la concentration de 5 mg/L); IC, indice de condition; [Cd], bioaccumulation du Cd dans les tissus des coques; ●, contrôles ▲, exposées à 50 µg/L; +, exposées à 5 mg/L.

III. Discussion

La pollution métallique est un problème environnemental depuis des décennies et justifie la nécessité de comprendre les mécanismes de bioaccumulation et de toxicité des métaux chez les organismes aquatiques, en particulier les différents mécanismes de cytoprotection pouvant être mis en place au cours d'un stress par le Cd. Dans ce sens, l'objectif de notre travail était

Etude de l'impact d'une contamination par le cadmium sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque Cerastoderma glaucum

d'étudier plusieurs niveaux de réponses de la coque *C. glaucum* exposée au Cd, soit à une forte concentration (5mg/L) soit à plus une faible concentration (50 µg/L), au travers du suivi : (1) de l'état physiologique global des organismes, (2) de l'accumulation du Cd dans les tissus des coques, (3) des réponses au niveau transcriptionnel de plusieurs gènes impliqués dans différents types de stress et (4) des relations entre les réponses transcriptionnelles de ces gènes et le niveaux de bioaccumulation du Cd.

L'état physiologique des coques a été évalué durant l'expérience par (1) le test de stress-on-stress et par (2) la mesure de l'indice de condition. D'après Bayne (1986), le stress correspond à une altération de paramètres biochimiques et physiologiques induite par des facteurs environnementaux. Il se traduit par une réduction de la capacité des individus à s'adapter aux changements de leur environnement. Ce concept a été appliqué dans ce travail à travers l'expérience de stress-on-stress qui consiste à ajouter un second stress (exposition à l'air libre : facteur de stress naturel) à des animaux déjà perturbés par l'exposition au Cd (Viarengo et al. 1995). Les résultats obtenus (LT50) démontrent que l'exposition aux deux concentrations de Cd affecte significativement la capacité des coques à survivre sous anoxie. Cependant cette dernière peut aussi être affectée par les conditions expérimentales telles que la température qui est différente des conditions environnementales naturelles et peut donc constituer un autre facteur de stress (de Zwaan et Eertman 1996). Ces résultats reflètent donc une perturbation métabolique et une diminution de la tolérance des coques à l'anoxie suite à l'exposition au Cd. Nos résultats sont en accord avec plusieurs travaux sur les bivalves : *C. glaucum* (Ladhar-Chaabouni et al. 2008), *R. decussatus* (Hamza-Chaffai et al. 1998) et *Mytilus galloprovincialis* (Viarengo et al. 1995). Plus généralement, la tendance physiologique présentée dans ce travail peut suggérer une diminution de l'état de santé général des coques mais aussi des compromis énergétiques entre détoxification et survie des organismes.

Les mesures de l'indice de condition chez les bivalves sont considérées comme des indicateurs fiables de l'état de santé général et des réserves énergétiques. Un faible indice est généralement associé à une mauvaise alimentation et / ou à des conditions environnementales sévères et les mollusques avec un faible indice sont souvent sujets à une importante mortalité (Ruano et al. 2012). En particulier, Lannig et al. (2006) ont démontré des variations importantes de l'indice de condition chez les huîtres (*Crassostrea virginica*) après 20 jours d'exposition à la concentration de 50µg/L de CdCl₂ et à la température de 28°C. Les résultats

Etude de l'impact d'une contamination par le cadmium sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque Cerastoderma glaucum

obtenus dans notre travail ne montrent aucune différence de l'indice de condition entre les animaux contrôles et exposés. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que seulement 18 jours d'exposition pourraient ne pas être suffisants pour produire des variations visibles entre individus exposés et témoins.

Les résultats de bioaccumulation du Cd indiquent que cette dernière est nettement plus élevée chez les coques exposées dans les deux conditions de traitement par rapport aux contrôles. Ces résultats sont reliés au fait que les bivalves sont des organismes filtreurs capables d'accumuler de fortes concentrations en métaux (Paul-Pont et al. 2012). De plus, nos résultats démontrent pour les animaux exposés à 5 mg/L, la concentration en Cd augmente fortement avec le temps d'exposition. Ladhar Chaabouni et al. (2008) ont aussi démontré que la concentration en Cd chez la coque *C. glaucum* est dépendante du temps et de la dose pour une exposition au Cd allant de 50 à 150 µg/L. Cette capacité de bioaccumulation chez les bivalves exposés à la contamination métallique, que ce soit en milieu naturel ou en conditions contrôlées a déjà été mise en évidence chez plusieurs espèces tel que *C. edule* (Paul-Pont et al. 2012), *R. decussatus* (Bebiano et Langston 1993; Smaoui-Damak et al. 2004 ; Smaoui-Damak et al. 2003), *Corbicula fluminea* (Legeay et al. 2005) et *Dreissena polymorpha* (Marie et al. 2006a ; 2006b). Notre travail ajoute le fait que *C. glaucum* s'avère particulièrement tolérante à une concentration en Cd très élevée (5 mg/L) sans présenter d'effets dramatiques (un faible taux de mortalité a été enregistré dans cette condition, <10% après 18 jours d'exposition). Ce résultat indique une forte résistance des coques ainsi que des stratégies bien établies pour s'acclimater à l'exposition au Cd.

Les processus de protection et/ou de détoxification établis par les coques exposés au Cd peuvent être étudiés à différents niveaux dont le niveau transcriptionnel. Ce dernier présente un certain intérêt puisque les changements dans l'expression des gènes sont susceptibles de jouer un rôle critique dans l'adaptation et/ou l'acclimatation des organismes (Schulte 2004).

L'objectif de notre travail était de mettre en évidence les modifications dans l'expression de plusieurs gènes potentiellement impliqués dans la tolérance à l'exposition au Cd, à savoir les protéines impliquées dans la détoxification des xénobiotiques (MT, ABCB1), la protection contre le stress oxydant (MnSOD, CuZnSOD, CAT), le stress général (HSP70) et les altérations mitochondriales (COI). L'expression de ces gènes a été étudiée dans les branchies des coques puisque cet organe constitue une interface clé pour l'assimilation, le stockage et l'excrétion des métaux et a une grande capacité à synthétiser les protéines (Al Kaddissi et al.

2012 ; Marigomez et al. 2002 ; Navarro et al. 2011 ; Paul-Pont et al. 2010). Le premier point qui peut être souligné dans notre travail est la faible variation dans l'expression des gènes chez les individus contrôles, ce qui montre que l'expression de ces gènes n'est pas affectée par la procédure expérimentale. Cependant, une grande variabilité dans l'expression des gènes cibles est observée chez les coques exposées (50µg/L et 5 mg/L). La variabilité biologique reflète des variations naturelles des génotypes et des phénotypes entre individus (Bustin 2010). Par contre, la variabilité beaucoup plus élevée observée chez les individus exposés suggère l'existence de différents types de réponses chez les individus exposés au même contaminant. Cette hypothèse peut être confirmée par la projection des individus dans les ACP (Figures 50-C et 50-D). En effet, pour les deux concentrations de Cd, les individus témoins sont très regroupés alors que les individus exposés sont plus dispersés, certains d'entre eux sont même observés près des contrôles (Figures 50-C et 50-D).

Dans ce travail, l'exposition à 50µg/L et à 5mg/L conduit à une importante variation de l'expression de quatre gènes, MT, HSP70, CAT et CuZnSOD, parmi tous les gènes étudiés. Les MTs sont connues jouer des rôles biologiques très importants tels que l'homéostasie des métaux essentiels, la détoxification des ions traces métalliques et la protection contre les radicaux libres et les dommages oxydatifs intracellulaires (Amiard et al. 2006; Andrews 2000 ; Tanguy et al. 2001). Dans notre travail, une augmentation de l'expression du gène MT (dépendante du temps et de la dose) est observée suite à l'exposition aux deux concentrations de Cd ce qui montre que la transcription de ce gène est fortement corrélée à l'accumulation du Cd dans les tissus des coques dans le sens où les animaux qui accumulent le plus de Cd sont ceux qui présentent les plus hauts niveaux d'expression du gène MT. L'isoforme étudiée dans ce travail est la MT1 qui a été décrite comme spécifique de la contamination par le Cd (Gonzalez et al. 2006). La surexpression de ce gène est en accord avec d'autres études effectuées sur différents invertébrés suite à leur exposition à différents métaux (Al Kaddissi et al. 2012 ; Dondero et al. 2005 ; Lecoeur et al, 2004 ; Navarro et al. 2011 ; Zorita et al. 2007). Elle peut refléter le rôle important de la protéine MT dans la détoxification des métaux ainsi qu'en tant qu'antioxydant réagissant avec les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ROS), réduisant considérablement la toxicité des ROS et permettant la prévention des interactions avec les composantes cellulaires critiques tels que les enzymes, les protéines de structure, l'ADN et les lipides membranaires (Andrews 2000 ; Coyle et al. 2002 ; Ivanina et al. 2009).

Etude de l'impact d'une contamination par le cadmium sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque Cerastoderma glaucum

La réponse du gène HSP70 est presque similaire à celle de MT après l'exposition au Cd (dépendante du temps et de la dose) et aussi fortement corrélée à l'accumulation du Cd dans les tissus. Certaines études ont démontré que les HSP70s sont synthétisées de manière intensive dans la cellule en réponse à une variété de stimuli, notamment la température, les métaux (Pb^{2+} , Cd^{2+}), les contaminants organiques et d'autres facteurs de stress (Singer et al, 2005). Navarro et al. (2011) et Ivanina et al. (2008a) ont également démontré une forte augmentation de l'expression du gène HSP70 après une exposition au Cd chez la moule *D. polymorpha* et chez l'huître *Crassostrea virginica*. Une surexpression du gène HSP70 (379 et 366 fois plus élevée que le niveau moyen des contrôles pour les deux concentrations 50 µg/L et 5 mg/L respectivement) peut refléter son rôle de protection contre les dommages induits par le stress.

Plusieurs études ont démontré que le Cd peut induire un stress oxydatif dans les cellules (Shi et al. 2005 ; Wang et al. 2004). Ce métal peut se lier aux antioxydants ou encore à leurs substrats et, par conséquent, peut conduire à une altération du mécanisme de défense contre les ROS et donc à une augmentation de leur concentration (Cao et al. 2010). Ceci pourrait expliquer l'augmentation de l'expression des gènes qui codent pour les enzymes antioxydantes (CAT et CuZnSOD) que nous observons après exposition des coques aux deux concentrations de Cd. L'augmentation de l'expression de ces deux enzymes anti-oxydantes dans les branchies, en réponse à l'exposition au Cd, semble constituer une adaptation spécifique pour prévenir et/ou réparer les dommages induits par le métal (Fernandez et al. 2010). Des résultats similaires ont été décrits chez les larves de la palourde *Meretrix meretrix* chez lesquelles les activités de la SOD et de la CAT augmentent après une exposition à 25 µg/L de Cd (Wang et al. 2010). Par ailleurs, Jo et al. (2008) ont également démontré que les niveaux d'expression de la SOD et de la CAT ont augmenté significativement après 24h d'exposition à 0,1 ppm de Cd chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Dans notre travail, l'expression de la MnSOD (la forme mitochondriale de SODs) ne semble pas être influencée par l'exposition au Cd quelle que soit sa concentration et la réponse observée peut refléter des différences physiologiques naturelles entre les coques plutôt qu'une réponse à l'exposition au Cd. Ce résultat peut aussi être expliqué par la présence d'une concentration suffisante d'enzymes antioxydantes (CAT et CuZnSOD) pour protéger les coques contre le stress oxydant. Un dosage des activités enzymatiques SOD et CAT aurait permis de vérifier cette dernière hypothèse.

Plusieurs études ont démontré que le déséquilibre énergétique est impliqué dans le stress induit par le Cd. En particulier il est impliqué dans le dysfonctionnement mitochondrial qui conduit à une production d'ATP altérée, réduit la capacité aérobie et permet l'augmentation du stress oxydatif (Cherkasov et al. 2007 ; Sokolova et al. 2005). Nous nous sommes donc intéressés à l'expression du gène codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome-c oxydase (COI) de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le rôle de la cytochrome-c oxydase (ou complexe IV) est de transférer les électrons du cytochrome c à l'oxygène moléculaire et de contribuer, avec les complexes I et III, à la production d'un gradient électrochimique de protons à travers la membrane interne mitochondriale ce qui entraîne la synthèse de l'ATP (Capaldi et al. 1983 ; Capaldi 1990). Dans ce sens l'expression du gène COI peut être un biomarqueur intéressant de l'activité métabolique. Les résultats obtenus ici ont montré que l'expression de COI pourrait être corrélée à l'accumulation du Cd pour la concentration de 50 µg/L avec cependant une augmentation de l'expression qui s'avère non significative. Pour la concentration la plus élevée (5mg/L), aucune corrélation entre l'expression de COI et l'accumulation du Cd n'est observée. Au niveau de ce gène COI, il est donc difficile de conclure à un effet du Cd. Lerebours et al. (2010) ont montré que l'intensité de la réponse du gène peut ne pas être corrélée positivement avec les concentrations des toxiques et que différents profils d'expression peuvent être obtenus pour différentes concentrations d'exposition. En accord avec ce résultat, une modification du métabolisme énergétique pourrait se produire en présence de 50 µg/L de Cd et se traduire par une expression de COI ayant tendance à augmenter, alors que la concentration plus élevée de Cd serait sans effet visible. Cela pourrait être une stratégie cellulaire pour (1) compenser la diminution du nombre de mitochondries fonctionnelles en augmentant la production de l'ATP de manière à fournir suffisamment d'énergie pour les besoins cellulaires, notamment pour tolérer les métaux (Al Kaddissi et al. 2012) ou (2) pour consommer plus d'oxygène ce qui permettrait de limiter les dommages oxydatifs induits par le métal dans les cellules (Chen 2003 ; Wang et al. 2004). On peut noter aussi que le niveau d'expression du gène COI est bien corrélé à celui des deux enzymes antioxydantes CuZnSOD et CAT. Achard-Joris et al. (2006) ont trouvé le même profil de régulation de l'expression de COI chez trois autres mollusques (*C. fluminea*, *D. polymorpha* et *C. gigas*) après une exposition à la concentration de 23µg/L de Cd. Dans notre travail, ce profil n'est retrouvé que pour la concentration de 50 µg/L de Cd et l'exposition à la forte concentration de Cd (5 mg/L) semble conduire à une diminution progressive de

l'expression du gène COI, ce qui reflète une diminution potentielle de l'activité métabolique. Ce résultat indique une forte perturbation de l'équilibre énergétique cellulaire, avec des individus qui ne sont plus capables de compenser l'inhibition probable de la fonction des mitochondries. Des impacts négatifs sur les performances physiologiques et la survie des organismes sont aussi attendus (Sokolova et Lanning 2008). Ceci se confirme par le taux de mortalité plus élevé avec la concentration de 5 mg/L (0,9%, 2,7% et 9% de la mortalité détectée après 10, 15 et 18 jours d'exposition, respectivement) ainsi que par la LT50 (test de stress-on-stress) qui est plus faible aussi pour la concentration de 5mg/L. Des cas de diminution de l'expression et de l'activité de la COI ont également été enregistrés chez l'écrevisse *Procambarus clarkii* et chez *C. gigas* après exposition à des concentrations aiguës et chroniques de Cd (Al Kaddissi et al. 2012 ; Ivanina et al. 2008b).

L'expression du gène ABCB1 est significativement corrélée à l'accumulation du Cd pour la concentration de 50µg/L mais pas pour la concentration de 5mg/L. L'expression de ce gène présente une grande variation inter-individuelle tout au long de l'expérience. Toutefois, son expression semble augmenter (mais les différences ne sont pas significatives) avec le temps en réponse à l'exposition à 50 µg/L de Cd. Une augmentation est également visible au 3^{ème} jour en présence de 5 mg/L de Cd (et cette fois significative) mais elle est suivie par une sous-expression. La surexpression d'ABCB1 pourrait représenter une réponse rapide et de première intention (faible dose et/ou temps d'exposition court) mais se trouverait assez vite dépassée (fortes doses et/ou temps longs) laissant place à d'autres mécanismes. Cette hypothèse permettrait de réconcilier les résultats relativement contradictoires publiés dans la littérature (Minier et al. 1993 ; Bodin et al. 2004; Franzelliti et Fabbri 2006 ; Ivanina et Sokolova 2008 ; Zucchi et al. 2010; Della Torre et al. 2014 ; Rioult et al. 2014). Dans notre travail, cette grande variabilité d'expression ne permet pas de tirer de conclusions claires et tend à rejeter l'utilisation de ce gène comme biomarqueur d'une contamination au Cd chez la coque.

IV. Conclusion partielle

La tendance physiologique détectée dans notre travail chez *C. glaucum* après exposition au Cd à une forte (5mg/L) et relativement faible (50µg/L) concentrations suggère une diminution de l'état de santé général tout au long de l'expérience. Un suivi de l'expression de 7 gènes potentiellement impliqués dans la tolérance à l'exposition au Cd a montré que 4 d'entre eux (MT, HSP70, CuZnSOD et CAT) semblent être des biomarqueurs pertinents pour l'exposition

Etude de l'impact d'une contamination par le cadmium sur la survie, la physiologie et les réponses moléculaires de la coque Cerastoderma glaucum

au Cd en raison (1) de leur fort niveau d'expression chez les coques exposées et (2) de la corrélation significative entre leur expression et l'accumulation de Cd. La surexpression de ces gènes indique que la détoxification du Cd est favorisée ainsi que la protection contre les radicaux libres et les dommages oxydatifs intracellulaires. L'expression des gènes COI et ABCB1 donne des informations complémentaires sur le statut des coques exposées, en particulier au niveau de leur activité métabolique. Les mécanismes moléculaires mis en évidence dans ce travail impliquent des coûts énergétiques et pourraient donc expliquer la diminution de la tolérance de la coque à l'anoxie (stress-on-stress).

Chapitre V

Conclusion générale et perspectives

I. Récapitulatifs des principaux résultats

Cerastoderma glaucum, espèce clé présente dans plusieurs lagunes et estuaires, se caractérise par une aire de répartition étendue ainsi qu'une grande tolérance aux variations environnementales. Ces deux caractéristiques font de ce bivalve un modèle biologique de choix pour des études phylogéographiques et écotoxicologiques. Dans ce travail, la réponse adaptative de *C. glaucum* a été étudiée à différents niveaux de l'organisation biologique : populationnel (structure génétique), physiologique global (individuel, organe), cellulaire et moléculaire. Deux approches ont été utilisées (*in situ / in vivo*). La première approche a été réalisée **en milieu naturel** et a permis d'étudier la structure génétique de la métapopulation en méditerranée occidentale afin de vérifier la notion de rupture phylogéographique au nord de la Tunisie. Deux types de marqueurs (mitochondrial et nucléaire) ont été utilisés. Les résultats obtenus ont montré une grande diversité génétique inter- et intra-populationnelle qui peut être due à leur origine (la Méditerranée occidentale) qui a représenté une zone de refuge pendant la période glaciaire du Pléistocène. De plus, le marqueur mitochondrial a révélé une population distincte de toutes les autres (Ellouza, Sud de la Tunisie). Ce résultat nous a amené à effectuer une étude écotoxicologique sur des populations issues du site Ellouza et d'autres sites à proximité dans la région du golfe de Gabès. L'objectif étant de comparer les caractéristiques de plusieurs populations aux histoires de vie différentes et dans des environnements *a priori* bien contrastés afin de comprendre comment ces populations composent avec les stress présents. Une étude préliminaire était donc indispensable et nous a permis de sélectionner le site Ellouza comme site de référence et les sites Sidi Mansour et Gargour comme étant des sites respectivement intermédiaire et contaminé. Sur les trois sites retenus, une étude de la réponse adaptative des populations de la coque *C. glaucum* en milieu naturel a été réalisée. Cette réponse a été étudiée à différents niveaux de l'organisation biologique (individuel, organe, cellulaire et moléculaire). Les résultats obtenus ont montré que les paramètres étudiés au niveau individuel permettent de différencier les trois sites contrairement aux autres niveaux (organe, cellulaire et moléculaire) pour lesquels la présence de facteurs confondants amenait toujours des réponses diffuses. De plus, nous avons mis en évidence l'importance du métabolisme énergétique dans la réponse au stress, à travers la sur-expression du gène COI chez les coques issues du site le plus contaminé.

La deuxième approche a été effectuée **en conditions contrôlées**, deux expérimentations en laboratoire ont été réalisées : la première en utilisant un mélange de contaminants (les effluents industriels) et la deuxième en utilisant un contaminant pur (le cadmium). Les coques

utilisées pour les expérimentations ont été collectées à partir du site de référence Ellouza et l'étude à portée sur les niveaux individuel et moléculaire de l'organisation biologique. Pour être le plus proche possible du milieu naturel, une première contamination par des effluents a été réalisée dans un premier temps. Ces deniers ont été collectés au niveau de la SIAPE, l'industrie qui est à l'origine de l'activité industrielle la plus importante dans la région du golfe de Gabès. Les résultats les plus pertinents ont concerné le niveau moléculaire et ont montré que des mécanismes sont rapidement mis en place pour prévenir les dommages cellulaires par (1) la détoxification et l'expulsion des métaux hors de la cellule par la régulation de l'expression des gènes MT et ABCB1, (2) la réduction de la toxicité des ROS par la régulation de l'expression des enzymes antioxydantes (CAT, CuZnSOD et MnSOD), (3) la protection et/ou la réparation des protéines par la régulation de l'expression de la HSP70 et (4), peut-être le plus important, l'augmentation potentielle de la production d'ATP (à travers la régulation de l'expression du gène COI) afin de fournir l'énergie nécessaire aux cellules pour leur permettre de tolérer une exposition au stress. Dans un deuxième temps, une expérimentation utilisant le Cd comme contaminant a été réalisée, car celui-ci est un polluant majeur dans la région du golfe de Gabès. Pour cela, une forte concentration (5 mg/L) et une relativement faible (50 µg/L) concentration en Cd ont été utilisées. Les résultats obtenus suggèrent une diminution de l'état physiologique global de l'animal tout au long de l'expérience. Les gènes MT, HSP70, CuZnSOD et CAT semblent être des biomarqueurs pertinents pour l'exposition au Cd. L'expression des gènes COI et ABCB1 donnent des informations complémentaires sur le statut des coques exposées, en particulier au niveau de leur activité métabolique.

En conclusion, les études expérimentales et les explorations sur le terrain sont complémentaires ; la réalisation couplée de telles approches a permis de mieux comprendre les mécanismes de défense mis au point par la coque pour s'acclimater aux conditions de stress, que ce soit en milieu naturel ou en conditions contrôlées. Ces mécanismes impliquent des coûts énergétiques qui peuvent correspondre à des compromis entre reproduction ou croissance, détoxification ou survie, croissance et métabolisme énergétique ou encore entre reproduction et métabolisme énergétique. Enfin, nous avons pu mettre en évidence l'importance du métabolisme énergétique dans la réponse au stress quelque soit l'approche utilisée (*in situ* / expérimentale). Ceci a été confirmé par l'expression du gène COI qui est fortement lié à la demande d'énergie nécessaire pour compenser le stress. Ainsi le gène COI peut être retenu comme étant un marqueur pertinent pour *C. glaucum*.

II. Perspectives de recherche

Cette étude étant la première qui s'est intéressée à la structure génétique de *C. glaucum* en Méditerranée occidentale, les résultats obtenus sont très intéressants particulièrement en ce qui concerne la divergence du site Ellouza. Cependant, elle doit être complétée par d'autres analyses afin de confirmer ou d'infirmer ces résultats par d'autres marqueurs génétiques et d'autres populations sur le littoral de Méditerranée occidentale. En effet, l'application de nouveaux marqueurs génétiques sur *C. glaucum* serait d'un grand intérêt afin de résoudre le problème de différences dans la structure génétique entre le génome mitochondrial et nucléaire. Par exemple, l'analyse avec des marqueurs EPIC (Exon Primed Intron Crossing) qui sont des marqueurs nucléaires universels (Chenuil et al. 2010) pourrait donner une information nucléaire précise (séquences) sans l'homoplasie inhérente des ITS. De plus, d'autres populations méditerranéennes surtout Algériennes, Marocaines, Italiennes, Françaises et Catalanes seront indispensables pour donner une vision plus large sur la dispersion de cette espèce dans toute la Méditerranée occidentale. Des études complémentaires menées par les biologistes marins en coopération avec les ornithologues peuvent être aussi envisageables dans le but d'approfondir la question de la dispersion possible de *C. glaucum* par les oiseaux migrateurs.

Au niveau écotoxicologique, les études sur le terrain ont montré qu'il était parfois difficile de faire la part entre les modulations dues à la présence de polluants et celles liées aux facteurs confondants. Afin de mieux prendre en compte ces paramètres, il sera nécessaire à l'avenir de mieux caractériser les sites d'études. Pour cela, les conditions hydroclimatiques (température, salinité, cycle des marées, disponibilité de la nourriture...) doivent être définies avec précision. Des dosages d'autres polluants (HAP, PCB, pesticides...) doivent également être réalisés sur les coques et les sédiments des sites échantillonnés. Les expérimentations peuvent également être reprises en tenant compte de l'augmentation du temps de contamination pour l'expérimentation par les effluents afin de mieux comprendre la réponse des coques exposées aux effluents. De même, des dosages des métaux présents dans le sédiment et dans l'eau doivent être effectués en parallèle avec le dosage des métaux dans les tissus des coques afin d'avoir une idée complète sur la répartition des métaux entre sédiment, eau de mer et tissus des coques tout au long des expériences. Ce travail est le premier à avoir permis, de séquencer en partie plusieurs gènes d'intérêts impliqués dans différentes voies métaboliques ou de détoxification chez *C. glaucum*, Ces séquences ont servi à l'étude par PCR quantitative de leur expression en milieu naturel et en conditions contrôlées. Les résultats obtenus ont conduit à

retenir le gène COI comme étant un marqueur pertinent pour des études d'écotoxicologie avec comme modèle biologique *C. glaucum* quelque soit l'approche utilisée (in situ / expérimentale). Nous envisageons donc, comme perspective à ce travail, d'étudier chez la coque l'expression d'autres gènes impliqués dans le métabolisme énergétique tel que celui de la succinate déshydrogénase, de la fumarate déshydrogénase, de l'isocitrate déshydrogénase, ou de la sous-unité 6 de l'ATP-synthase.

Il serait, de même, intéressant dans l'avenir de coupler ces analyses de transcriptomique à des analyses de protéomique puisque les acteurs moléculaires de la cellule sont les protéines et non pas les ARN messagers, et qu'il n'existe pas toujours une corrélation positive entre transcription et traduction. De plus, des mesures d'activité enzymatique peuvent également être envisagées sur des protéines identifiées à la fois en transcriptomique et en protéomique. Ainsi, l'analyse des réponses des organismes à la fois à l'échelle génétique, protéique et enzymatique constitue l'approche la plus rigoureuse et la plus fiable.

Finalement, les outils développés dans le cadre de cette thèse nous ont permis d'apporter des informations originales concernant les réponses génétiques, physiologiques et moléculaires de la coque *C. glaucum* au stress en milieu naturel ainsi qu'en condition contrôlées, ce qui devrait améliorer les futures stratégies de bio-surveillance ainsi que l'utilisation de la coque *C. glaucum* comme espèce sentinelle. Ce travail devra cependant être couplé au développement d'analyses de protéomique qui permettront d'approfondir la compréhension des mécanismes adaptatifs mis en place par la coque pour s'acclimater au stress.

Références bibliographiques

A

- Aarab N (2004) Les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves : de l'exposition à l'effet du laboratoire au terrain. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux 1. France, 276 p.
- Achard-Joris M (2005) Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux 1. France, 266 p.
- Achard-Joris M, Gonzalez P, Marie V, Baudrimont, M, Bourdineaud, JP (2006) Cytochrome c oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 19, 237-244.
- Al Kaddissi S, Legeay A, Elia AC, Gonzalez P, Florian M, Cavalie I, Massabuau JC, Gilbin R, Simon O (2012) Mitochondrial gene expression, antioxidant responses, and histopathology after cadmium exposure. *Environmental Toxicology*, *in press*.
- Al Kaddissi S (2012) Comparaison de la réponse (en termes d'accumulation, d'impacts cellulaires et génétiques) de l'écrevisse *Procambarus clarkii* après exposition à un polluant métallique (cadmium) et un polluant radiologique (uranium 238 et 233). Thèse de doctorat. Université de Bordeaux 1. 357 p.
- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin, J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their uses as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160-202.
- Amiard JC, Amiard-Triquet C (2008) Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Tec et Doc. Ed. Lavoisier. Paris, 375 p.
- Andrews GK (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology* 59, 95-104.
- Arini A (2011) Décontamination métallique et capacités de récupération de deux composantes biologiques d'un hydrosystème naturel- biofilms diatomiques et bivalves filtreurs-après remédiation d'un site industriel. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux 1. 378 p.
- Atli G, Canli M (2007) Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 145, 282-287.
- Atli G, Canli M (2010) Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicol Environ Saf* 73, 1884-1889.
- Atli G, Canli M (2013) Metals (Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺) affect ATPase activity in the gill, kidney, and muscle of freshwater fish *oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures. *Environmental Toxicology* 28, 707-717.
- Avery S, Howlett N, Radice S (1996) Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: Dependence on plasma membrane fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3960-3966.

B

- Bachy C (2012) Phylogénie, diversité et dynamique temporelle chez les ciliés tintinnidés marins. Thèse de doctorat. Université de Paris –Sud (Paris 11), 264 p.
- Bay LK, Crozier RH, Caley MJ (2006) The relationship between population genetic structure and pelagic larval duration in coral reef fishes on the Great Barrier Reef. *Marine Biology* 149, 1247-1256.
- Barhoumi S, Messaoudi I, Deli T, Said K, Kerkeni A (2009) Cadmium bioaccumulation in three benthic fish species, *Salaria basilisca*, *Zosterisessor ophiocephalus* and *Solea vulgaris* collected from the Gulf of Gabes in Tunisia. *Journal of Environmental Sciences (China)* 21, 980-984.
- Barnes RSK (1980) Coastal lagoons. Cambridge University Press, Cambridge, 103 p.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37-48
- Bayne BL (1986) Measuring the effects of pollution at the cellular and organism level, in: Kulleberg, G. (Ed.), *The role of the Oceans as a Waste Disposal Option*. Springer, Netherlands, pp. 617-634.
- Bebianno MJ, Langston WJ (1991) Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Mar. Bio* 108, 91–96.
- Bebianno MJ, Langston WJ (1993) Turnover rate of metallothionein and cadmium in *Mytilus edulis*. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 6, 239-244.
- Belabed W, Kestali N, Semsari S, Gaid A (1994) Toxicity study of some heavy metals with daphnia test. *Techniques Sciences Méthodes* 6, 331-336.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2008) GenBank. *Nucleic Acids Research*. 36, 25–30.
- Bercquet V (2011) Evaluation des capacités adaptatives du bivalve *Macoma balthica* (L.) dans un contexte de changement global. Analyse comparée des processus neutres et soumis à sélection. Thèse de doctorat. Université de la Rochelle France, 250 p.
- Beukema JJ, Cadée GC, (1996) Consequences of the sudden removal of nearly all mussels and cockles from the Dutch Wadden Sea. *Marine Ecology* 17, 279–289.
- Bigot A, Doyen P, Vasseur P, Rodius F (2009) Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 382-387
- Bocquené G, Galgani F, Walker CH (1997) Les cholinesterases, biomarqueurs de neurotoxicité. In: *Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris. pp. 209-/240.
- Bocquené G (1996) L'acétylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité. Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins. Thèse, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 250 p.

- Bodin N, Burgeot T, Stanisière JY, Bocquené G, Menard D, Minier C, Boutet I, Amat A, Cherel Y, Budzinski H (2004) Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 138, 411-427.
- Bouaziz H (2002) Induction et réversibilité du fluorure de sodium sur la fonction thyroïdienne et sur la maturation de l'os chez de jeunes souris en période d'allaitement. Diplôme des études approfondies d'écologie générale. Faculté des Sciences de Sfax. 80 p.
- Boutet I, Tanguy A, Rousseau S, Auffret M, Moraga D (2003) Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress & Chaperones* 8, 76-85.
- Bowen BW, Bass AL, Muss A, Carlin J, Robertson DR (2006) Phylogeography of two Atlantic squirrelfish (Family Holocentridae): exploring links between pelagic larval duration and population connectivity. *Marine Biology* 149, 899-913
- Boyden CR (1971) A comparative study of the reproductive cycle of the cockles *Cerastoderma edule* and *C. glaucum*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 51, 605-622.
- Bowden J, Heppell D (1968) Revised list of British mollusca. *Unionacea-Cardiaceae*. *Journal of Conchology* 26, 237-272.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Chem* 72, 249-251.
- 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.
- Brock V (1978) Morphological and biochemical criteria for separation of *Cardium glaucum* (Bruguière) from *Cardium edule* (L.). *Ophelia* 17, 207-214.
- Brock V (1991) An Interdisciplinary Study of Evolution in the Cockles *Cardium* (*Cerastoderma*) *edule*, *C. glaucum* and *C. lamarcki*. Vestjyds, Vinderup, Denmark.
- Brouwer M, Hoexum BT, Grater W, Brown-Peterson N (2003) Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. *Biochem. J* 374, 219-228
- Brokordt KB, Guderley H (2004) Energetic requirements during gonad maturation and spawning in scallops: sex differences in *Chlamys islandica* (Muller 1776). *Journal of Shellfish Research* 23, 25-32.
- Brooks BW, Stanley JK, White JC, Turner PK, Wu KB, La Point TW (2004) Laboratory and field responses to cadmium: an experimental study in effluent dominated stream mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC* 23, 1057-1064.
- Bustin SA (2010) Why the need for qPCR publication guidelines? The case for MIQE. *Methods* (San Diego, Calif.) 50, 217-226.

C

- Castellanos GJ (2012) Structure génétique des populations de trois espèces de poissons de récifs cubains: *Stegastes partitus*, *Haemulon flavolineatum* et *Acanthurus tractus*. Thèse de doctorat. Université Paris-Sud 11. 138 p.
- Callejón R, De Rojas M, Feliú C, Balao F, Marrugal A, Henttonen H, Guevara D, Cutillas C (2012) Phylogeography of *Trichuris* populations isolated from different Cricetidae rodents. *Parasitology* 139, 1795-1812.
- Cao L, Huang W, Liu J, Yin X, Dou S (2010) Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* 151,386-392.
- Canli M, Atli G (2008) Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *oreochromis niloticus* following metal exposures, *Environmental Toxicology and pharmacology* 25, 33-38.
- Canli M, Atli G (2010) Response of antioxidant system of freshwater fish *oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73,1884-1889.
- Capaldi RA, Malatesta F, Darley-Usmar VM (1983) Structure of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 726, 135-148.
- Capaldi RA (1990) Structure and Function of Cytochrome c Oxidase. *Annual Review of Biochemistry* 59, 569-596.
- Cassens I, Van Waerebeek K, Best PB, Crespo EA, Reyes J, Milinkovitch MC (2003) The phylogeography of dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*): a critical examination of network methods and rooting procedures. *Molecular Ecology* 12, 1781-1792.
- Chan KMA, Levin SA (2005) Leaky prezygotic isolation and porous genomes: rapid introgression of maternally inherited DNA. *Evolution* 59, 720–729.
- Chen Q (2003) Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry* 278, 36027-36031.
- Cheng W, Tung YH, Chiou TT, Chen JC (2006) Cloning and characterisation of mitochondrial manganese superoxide dismutase (mtMnSOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol* 21, 453–466
- Chenghua Li, Jingjing He, Xiurong Su, Taiwu Li (2011) A manganese superoxide dismutase in blood clam *Tegillarca granosa*: Molecular cloning, tissue distribution and expression analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 159, 64–70.
- Cherkasov AA, Overton RA, Sokolov EP, Sokolova IM (2007) Temperature dependent effects of cadmium and purine nucleotides on mitochondrial aconitase from a marine ectotherm, *Crassostrea virginica*: a role of temperature in oxidative stress and allosteric enzyme regulation. *Journal of Experimental Biology* 210, 46-55.
- Chora S, Starita-Geribaldi M, Samsond M, Roméob M, Bebianno MJ (2009) Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. *Aquatic Toxicology* 94, 300–308.

- Choura M (2008) Evaluation environnementale de l'activité de transformation de phosphate dans la zone côtière sud du grand Sfax. Perspectives d'aménagement et réhabilitation. Projet SMAP III. Tunisie (2006-2008). Stratégie de gestion intégrée de la zone côtière sud du grand Sfax.
- Chenuil A (2006) Choosing the right molecular markers for studying biodiversity from molecular evolution to practical aspects, *Genetica* 127, 101–120.
- Chenuil A, Hoareau G, Egea E, Penant G, Rocher C, Aurelle D, Mokhtar-Jamai K, Bishop J, Patti F, Diaz A, Boissin E, Krakau M, Luttkuizen PC, Blavet N, Mousset S (2010) An efficient method to find universal population genetic markers, applied in metazoans.
- Choi CY, An KW, Nelson ER, Habibi HR (2007) Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in gold fish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* 145, 595-600.
- Choi YK, Jo PG, Choi CY (2008) Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147, 286-292.
- Ciacci C, Barmo C, Gallo G, Maisano M, Cappello T, D'Agata A, Leonzio C, Mauceri A, Fasulo S, Canesi L (2012) Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 121, 109-118.
- CIESM (2008) The Messinian Crisis from mega-deposits to microbiology- A consensus report. N°33. In: *CIESM Workshop Monographs* (ed. Briand F), Monaco, 168 p.
- CLEMAM (2009) Check List of European Marine Molluscs. Muséum National d'Histoire. Department of Systematics and Evolution, Paris, France Réalisé par J. Le Renard (Current URL: <http://www.somali.asso.fr/clemam/biotaxis.php>).
- Couillard Y, Campbell PGC, Pellerin-Massicotte J, Auclair JC (1995) Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and link to effect at high level of biological organization. *Can. J. Fish. Aquat. Sci* 52, 703-715.
- Cong M, Wu H, Liu X, Zhao J, Wang X, Lv J, Hou L (2012) Effects of heavy metals on the expression of a zinc-inducible metallothionein-III gene and antioxidant enzyme activities in *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology* 21, 1928-1936.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002) Metallothionein: the multi purpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 627-647.
- Cossu C, Doyotte A, Babut M, Exinger A, Vasseur P (2000) Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediment. *Ecotoxicol. Environ. Saf* 45, 106-121.
- Crozier R (1990) From population genetics to phylogeny: uses and limits of mitochondrial DNA. *Australian Systematic Botany*, 3, 111–124.

Cupit M, Larsson O, de Meeus C, Eduljee GH, Hutton M (2002) Assessment and management of risks arising from exposure to cadmium in fertilisers--II. *The Science of the Total Environment* 291, 189-206.

D

David E (2007) Reponses ecophysiologiques et génétiques de l'huitre creuse *crassostrea gigas* aux stress environnementaux, en milieu contrôlé et en milieu naturel. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale. 316 p.

Day KE, Scott IM (1990) Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquatic Toxicology* 18, 101-114.

De Zwaan A, Eertman RHM (1996) Anoxic or aerial survival of bivalves and other euryoxic invertebrates as a useful response to environmental stress – a comprehensive review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 113, 299-312.

Denis F, Ravallec R, Pavillon JP, Van Wormhoudt A (2009) Genetic differentiation of atlantic populations of the intertidal copepod *Tigriopus brevicornis*. *Scientia Marina* 73, 579-587.

Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J (2010) How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50, 227-230.

Derbali A, Jarboui O, Ghorbel M (2009) Reproductive biology of the cockle *Cerastoderma glaucum* (Mollusca: Bivalvia) from the north coast of Sfax (Gulf of Gabes, Tunisia). *Cienc. Mar.* 35, 141-152.

Derbali A, Elhasni K, Jarboui O, Ghorbel M (2012) Distribution, abundance and biological parameters of *Cerastoderma glaucum* (Mollusca: Bivalvia) along the Gabes coasts (Tunisia, central Mediterranean). *ACTA ADRIAT* 53, 363-374.

Dedourge-Geffard O, Palais F, Biagianti-Risbourg S, Geffard O, Geffard A (2009) Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An *in situ* experiment. *Chemosphere* 77, 1569-1576.

Della Torre C, Bocci E, Focardi SE, Corsi I (2014) Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Marine Environmental Research* 93, 56-63.

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases* 15, 316–328.

Dellali M, Gnassia Barelli M, Romeo M, Aissa P (2001) The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130C, 227-235.

Dondero F, Piacentini L, Banni M, Rebelo M, Burlando B, Viarengo A (2005) Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene* 345, 259-270.

Donker MH (1992) Energy reserves and distribution of metals in populations of the isopod *Porcelio scaber* from metal-polluted sites. *Funct Ecol* 6, 445–454.

Douxflis J, Mandiki R, Silvestre F, Bertrand A, Leroy D, Thome JP, Kestemont P (2007) Do sewage treatment plant discharges substantially impair fish reproduction in polluted rivers? *The Science of the Total Environment* 372, 497-514.

Dridi S, Romdhane MS, Elcafsi M (2007) Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizerte lagon, Tunisia *Aquaculture* 263, 238-248.

Durou C., Mouneyrac C., 2007. Linking steroid hormone levels to sexual maturity index and energy reserves in *Nereis diversicolor* from clean and polluted estuaries. *General and Comparative Endocrinology*, 150, p106-113.

E

Edwards KP, Hare JA, Werner FE (2008) Dispersal of black sea bass (*Centropristis striata*) larvae on the southeast US continental shelf: results of a coupled vertical larval behavior - 3D circulation model. *Fisheries Oceanography* 17, 299-315.

Eisma D (1965) Shell characteristics of *Cardium edule* L. as indicators of salinity. *Netherlands Journal of Sea Research* 2, 493–540.

Ellman GL, Courtney KD, Andreas V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochemistry and Pharmacology* 7, 88-95.

Enríquez-Díaz MR (2004) Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l’huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat. Université de Bretagne occidentale. 216 p.

Excoffier L, Lisher HEL (2010) "ARLEQUIN suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows." *Molecular Ecology Resources* 10, 564-567.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479–491.

F

Féral JP (2002) How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 268,121–145.

Fernandez B, Campillo JA, Martinez-Gomez C, Benedicto J (2010) Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. *Aquatic Toxicology* 99, 186-197.

Folmer O, Black M, Hoeh WR, Lutz RA, Vrijenhoek RC (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech* 3, 294-299.

Forbes VE (2000) Is hormesis an evolutionary expectation? *Functional Ecology* 14, 12-24.

Franzellitti S, Fabbri E (2006) Cytoprotective responses in the Mediterranean mussel exposed to Hg²⁺ and CH₃Hg⁺. *Biochem Biophys Res Commun* 351,719-725.

Frydman J (2001) Folding of newly translated proteins *in Vivo*: the role of molecular chaperons. *Annu. Rev. Biochem* 70:603–647.

Frings CS, Fendley TW, Dunn RT, Queen CA (1972) Improved determination of total lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clin. Chem* 18, 673-674.

Fu YX, Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133, 693–709.

G

Gagné F, Andre C, Cejka P, Hausler R., Fournier M, Blaise C (2008) Immunotoxic effects on freshwater mussels of a primary-treated wastewater before and after ozonation: a pilot plant study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 366-373.

Gaillard JM, Testud AM (1980) Comparative study of quaternary and present-day lagoon populations of *Cardium glaucum* (syn. *Cerastoderma glaucum*) Bruguière, Mollusca, Bivalvia. In: *The Geology of Libya Vol. 3* (eds Salem MJ, Busrewil MT). Academic, London, United Kingdom pp. 809–813.

Gaines SD, Bertness MD (1992) Dispersal of juveniles and variable recruitment in sessile marine species. *Nature* 360, 579 – 580.

Gao A, Wang L, Yuan H (2012) Expression of metallothionein cDNA in a freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense*, exposed to cadmium. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64, 253-258.

Garrigues P, Narbonne J-F, Budzinski H, Morin B, Augagneur S, Mora P, Clerandau C (2002) Etude de la contamination chimique de l'estuaire de la Seine par l'utilisation de biomarqueurs, de Bioessais et couplage avec ces analyses chimiques. Université de Bordeaux I. 40 p.

Gargouri D, Azri C, Serbaji MM, Jedoui Y, Montacer M (2011) Heavy metal concentrations in the surface marine sediments of Sfax Coast, Tunisia. *Environmental Monitoring and Assessment* 175, 519-530.

Gašparič MB, Cankar K, Žel J, Gruden K (2008) Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology* 8, 26.

Gautier-Clerc S, Pellerin J, Blaise C, Gagné F (2002) Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay Fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors? *Comp.Biochem. Physiol. C* 131, 457-467.

Gaylord B, Gaines SD (2000) Temperature or transport? Range limits in marine species mediated solely by flow. *American Naturalist*, 155, 769–789.

Geffard A, Sartelet H, Garric J, Biagianti-Risbourg S, Delahaut L, Geffard O (2010) Subcellular compartmentalization of cadmium, nickel, and lead in *Gammarus fossarum*: Comparison of methods. *Chemosphere* 78, 822-829.

Géffard O (2001) Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : Evaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux 1. 367 p.

Gérard K (2008) Phylogéographie et génétique des populations des Mytilidae de l'archipel des Kerguelen: Influence de l'environnement austral sur les capacités de dispersion. Thèse de doctorat. Université de la méditerranée. 164 p.

Geret F, Manduzio H, Company R, Leboulenger R, Bebianno, MJ, Danger JM (2004) Molecular cloning of superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) from aquatic molluscs. *Marine Environmental Research* 58, 619–623.

Giguère A, Couillard Y, Campbell PGC, Perceval O, Hare L, Pinel-Alloul B, Pellerin J (2003) Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligand and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 64, 185-200.

Gilliers, C., R. Amara, J.P. Bergeron and O. Le Pape. – 2004. Comparison of growth and condition indices of flatfish juvenile (sole, dab and plaice) in different coastal nursery grounds. *Envir. Biol. Fishes*, 71, 189-198.

Gismondi E (2012) Étude des systèmes de défenses antitoxiques chez l'amphipode *Gammarus roeselii*: effets du parasitisme et d'une exposition au cadmium. Thèse de doctorat. Université de Lorraine. 310 p.

Gonzalez P, Baudrimont M, Boudou A, Bourdineaud JP (2006) Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 19, 225-235.

Grosberg RK, Levitan DR (1992) For Adults Only? Supply-side Ecology and the History of Larval Biology. *Tree* 7, 130-133.

Grassé P (1960) *Traité de zoologie. Mollusques Lamellibranches*. Tome V. Masson et Cie Eds, Paris, 2219 p.

Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC (1991) Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352, 255–257.

H

Hajem B, Hamzaoui H, M'nif A (2007) Chemical interaction between industrial acid effluents and the hydrous medium. *Desalination* 206, 154-162

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.

Hamza-Chaffai A, Cosson R, Amiard-Triquet C, El Abed A (1996) Physico-chemical form of storage of metal (Cd, Cu and Zn) and metallothionein-like proteins in gills and liver of marine fish from the Tunisian coast: ecotoxicological consequences. *Comp Biochem Physiol* 111, 329–341.

- Hamza-Chaffai A, Amiard, JC, Pellerin J, Joux L, Berthet B (2000) The potential use of metallothionein in the clam (*Ruditapes decussatus*) as a biomarker of in situ metal exposure. *Comp Biochem Physiol* 127,185–197
- Hamza-Chaffai A, Pellerin J, Amiard JC (2003) Health assessment of a marine bivalve *Ruditapes decussatus* from the Gulf of Gabes (Tunisia). *Environment International* 28, 609-617.
- Hamza-Chaffai A., Romeo M, Gnassia-Barelli M, El Abed A (1998) Effect of copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 61, 397-404.
- Hamza-Chaffai A (2014) Usefulness of bioindicators and biomarkers in pollution biomonitoring. *International Journal of Biotechnology for wellness and industry* 3, 19-26.
- Handy RD, Sims DW, Giles A, Campbell HA, Musonda MM (1999) Metabolic trade off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquatic Toxicology* 47, 23-41.
- Handy RD, Sims DW, Giles A, Campbell HA, Musonda MM (1999) Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquatic Toxicology* 47, 23-41.
- Hartl F, Hayer-Hartl M (2002) Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science* 295, 1852-1856.
- Hattab T, Lasram F, Albouy C, Romdhane MS, Jarboui O, Halouani C, Cury P, Le Loc'h F (2013) An ecosystem model of an exploited southern Mediterranean shelf region (Gulf of Gabes, Tunisia) and a comparison with other Mediterranean ecosystem model properties. *Journal of Marine Systems* 128, 159-174.
- 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. *Marine Pollution Bulletin* 34, 326-331.
- Høpner Petersen G (1958) Notes on the growth and biology of the different *Cardium* species in Danish brackish water areas. *Meddelelser fra Danmarks Fiskeri-og Havundersøgelser*, 2, 1–31.
- Høpner Petersen G, Russell PJC (1973) The nomenclature and classification of some European shallow water *Cardium* species. *Malacologia*, 14, 233–234.
- Huan-Huan Xu, Hui Ma, Bao-Qing Hu, Douglas B, Lowrie Xiao-Yong Fan, Chun-Gen Wen (2010) Molecular cloning, identification and functional characterization of a novel intracellular Cu Zn superoxide dismutase from the freshwater mussel. *Cristariaplicata Fish & Shellfish Immunology* 29, 615-622.
- Hubby JL, Lewontin RC (1966) A Molecular Approach to Study of Genic Heterozygosity in Natural Populations .I. Number of Alleles at Different Loci in *Drosophila Pseudoobscura*. *Genetics* 54, 577-590.

Hummel H, Wołowicz M, Bogaards RH (1994) Genetic variability and relationships for populations of *Cerastoderma edule* and of the *C. glaucum* complex. *Netherlands Journal of Sea Research*, 33, 81–89.

I

Illou S (1999) Impact des rejets telluriques d'origines domestiques et industrielles sur les environnements côtiers : cas du littoral Nord de la ville de Sfax (Tunisie). Doctorat de spécialité, Université de Tunis II, Tunisie 259 p.

Inza B, Ribeyre F, Maury-Brachet R, Boudou A (1997) Tissue distribution of inorganic mercury, methylmercury and cadmium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to the contamination levels of the water column and sediment. *Chemosphere* 35, 2817-2836.

Insua A, López-Piñón MJ, Freire R, Méndez J (2003) Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae). *Genome* 46, 595-604

Ishaque, AB, Johnson L, Gerald T, Boucaud D, Okoh J, Tchounwou PB (2006) Assessment of individual and combined toxicities of four non-essential metals (As, Cd, Hg and Pb) in the microtox assay. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 3, 118-120.

Issartel J, Boulo V, Wallon S, Geffard O, Charmantier G (2010) Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Chemosphere* 81, 701-710.

Ivanina AV, Cherkasov AS, Sokolova IM (2008a) Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Journal of Experimental Biology* 211, 577-586.

Ivanina AV, Habinck E, Sokolova IM (2008b) Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* 148, 72-79.

Ivanina AV, Taylor C, Sokolova IM (2009) Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquatic Toxicology* 91, 245-254.

Ivanina AV, Sokolova IM (2008) Effects of cadmium exposure on expression and activity of P-glycoprotein in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquatic Toxicology* 88, 19-28.

Ivell R (1979) The biology and ecology of a brackish lagoon bivalve, *Cerastoderma glaucum* Bruguière, in Lago Lungo, Italy. *Journal of Molluscan Studies* 45, 364–382.

J

Jadeja RN, Tewari A (2007) Effect of soda ash industry effluent on bioaccumulation of metals by seaweeds of coastal region of Gujarat, India. *Journal of Hazardous Materials* 147, 148-154.

Javied S, Mehmood T, Chaudhry MM, Tufail M, Irfan N (2009) Heavy metal pollution from phosphate rock used for the production of fertilizer in Pakistan. *Microchemical Journal* 91, 94-99.

Jo PG, Choi YK, Choi CY (2008) Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology 147, 460-469.

JORF (1995) Arrêté du 25 Juillet 1995 relatif au classement de salubrité et à la surveillance des zones de production et des zones de reparcage des coquillages vivants.

Jung Y, Nowak TS, Zhang S, Hertel LA, Loker ES, Adema CM (2005) Manganese superoxide dismutase from *Biomphalaria glabrata*. J. Invertebr. Pathol 90, 59–63.

K

Kamel N, Jebali J, Banni M, Ben Khedher S, Chouba, L, Boussetta H (2012) Biochemical responses and metals levels in *Ruditapes decussatus* after exposure to treated municipal effluents. Ecotoxicology and Environmental Safety 82, 40-46.

Karray S, Smaoui-Damak W, Rebai T, Hamza-Chaffai A (2015) Reproductive Cycle, Condition Index and Glycogen Reserves of the Cockles *Cerastoderma glaucum* from the Gulf of Gabès (Tunisia). Environmental Science and Pollution Research (*in press*). DOI: 10.1007/s11356-015-4337-6.

Kawecki TJ, Ebert D (2004) Conceptual issues in local adaptation. Ecology letters 7,1225-1241.

Keen AM (1969) Superfamily Cardiacea Lamarck, 1809. In: Treatise on Invertebrate Paleontology, Part N, Mollusca 6, Bivalvia (ed. Moore RC). Geological Society of America and the University of Kansas Press, Lawrence, Kansas. pp 583–594.

Kerambrun E (2011) Evaluation des effets biologiques des contaminants chimiques sur les juvéniles de poisson marin: approche multibiomarqueur en conditions expérimentale et *in situ*. Thèse de doctorat. Université Du Littoral Cote D'Opale. 357p.

Kessabi K, Navarro A, Casado M, Said K, Messaoudi I, Pina B (2010) Evaluation of environmental impact on natural populations of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* by quantitative RNA biomarkers. Marine Environmental Research 70, 327-333.

Ketata I, Smaoui-Damak W, Guermazi F, Rebai T, Hamza-Chaffai A (2007) *In situ* endocrine disrupting effects of cadmium on the reproduction of *Ruditapes decussatus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 146, 415-430.

Ketata I (2008) Etude *in situ* de la perturbation endocrinienne par les métaux toxiques (Cd, Pb et Hg) chez la palourde *Ruditapes decussatus* issue de la région du golfe de Gabès. Thèse de doctorat, Université de Sfax. Tunisie. 258 p.

Kim KY, Lee SY, Cho YS, Bang IC, Kim KH, Kim DS, Nam YK (2007) Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc- and manganese-superoxide dismutases in disk abalone, *Haliotis discus discus*. Fish Shellfish Immunol 23, 1043–1059.

Kingston P (1974) Studies on the reproductive cycles of *Cardium edule* and *C. glaucum*. Marine Biology, 28, 317–323.

Kinlan BP, Gaines SD, Lester SE (2005) Propagule dispersal and the scales of marine community process. Diversity and Distributions 11, 139-148.

Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S (1999) Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 39, 267-294.

Klaper R, Carter BJ, Richter CA, Drevnick PE, Sandheinrich MB, Tillitt DE (2008) Use of a 15 k gene microarray to determine gene expression changes in response to acute and chronic methylmercury exposure in the fathead minnow *Pimephales promelas* Rafinesque. *Journal of Fish Biology* 72, 2207-2280.

Kolbe JJ, Glor RE, Rodriguez Schettino L, Lara AC, Larson A, Losos JB (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* 431, 177–181.

Köhler HR, Bartussek C, Eckwert H, Farian K, Gränzer S, Knigge T, Kunz N (2001) The hepatic stress protein (hsp70) response to interacting abiotic parameters in fish exposed to various levels of pollution. *J. Aquat. Ecosys. Stress Rec* 8, 261-279

L

Labourg PJL, Lasserre G (1980) Dynamique des populations de *Cerastoderma glaucum* dans une lagune aménagée de la région d'Arcachon. *Marine Biology* 60, 147–157.

Labrot F, Ribera D, Scient-Denis M, Narbonne JF (1996) *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and Uranium contamination : Lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non – mammalian species, *Biomarkers* 1, 21-28.

Ladhar-Chaabouni R, Mokdad-Gargouri R, Denis F, Hamza-Chaffai A (2008) Cloning and characterization of cDNA probes for the analysis of metallothionein gene expression in the Mediterranean bivalves: *Ruditapes decussatus* and *Cerastoderma glaucum*. *Molecular Biology Reports* 36, 1007-1014.

Ladhar-Chaabouni R (2009a) Utilisation et mise au point au niveau moléculaire de biomarqueurs pour étudier la répartition spatiale de la contamination au voisinage d'une source de pollution. Thèse de doctorat. Université de Sfax. 233 p.

Ladhar-Chaabouni R, Machreki-Ajmi M, Hamza-Chaffai A (2012) Use of metallothioneins as biomarkers for environmental quality assessment in the Gulf of Gabès (Tunisia). *Environmental Monitoring and Assessment* 184, 2177-2192.

Ladhar-Chaabouni R, Machreki-Ajmi M, Hamza-Chaffai A (2009b) Spatial distribution of cadmium and some biomarkers in *Cerastoderma glaucum* living in a polluted area. *Marine Biology Research* 5, 478-486.

Ladhar-Chaabouni R, Smaoui-Damak W, Hamza-Chaffai A (2010) *In vivo* variation of some biomarkers with time and cadmium concentration in the cockle *Cerastoderma glaucum*. *Marine Biology Research* 5, 487-495.

Lagadic LCT, Amiard JC (1998) Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In : Lagadic L, Caquet T, Amiard JC and Ramade F (Eds.), *Biomarqueurs en Ecotoxicologie. Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris, 1-9.

- Lannig G, Flores JF, Sokolova IM (2006) Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquatic Toxicology* 79, 278-287.
- Lango-Reynoso F (1999) Détermination de la sexualité chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Doctoral Thesis, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France. 176 pp.
- Latire T, Le Pabic C, Mottin E, Mottier A, Costil K, Koueta N, Lebel JM, Serpentine A (2012) Responses of primary cultured haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride. *Aquatic Toxicology* 109, 213-221.
- Lecoeur S, Videmann B, Berny P (2004) Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environmental Research* 94, 184-191.
- Legeay A, Achard-Joris M, Baudrimont M, Massabuau JC, Bourdineaud JP (2005) Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Aquatic Toxicology* 74, 242-253.
- Lemaire N, Pellerin J, Fournier M, Girault L, Tamigneaux E, Cartier S, Pelletier E (2006) Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *mytilus* spp. from farm sites of eastern Quebec. *Aquaculture* 261, 729–751.
- Lerebours A, Adam-Guillermin C, Brèthes D, Frelon S, Floriani M, Camilleri V, Garnier-Laplace J, Bourdineaud JP (2010) Mitochondrial energetic metabolism perturbations in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium. *Aquatic Toxicology* 100, 66-74.
- Lewis S, Handy RD, Cordi B, Billingham Z, Depledge MH (1999) Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* 8, 351–368.
- Liang CH, De-Quan X, Ting-Ting W, Ping MX, Hong-Ju JI, Zhi-Guo D (2006) Study on Sequences of Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers of Clams Belonging to the Veneridae Family (Mollusca: Bivalvia).
- Librado P, Rozas J (2009) DNAsp v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Li L, Binghui Z, Lusan L (2010) Biomonitoring and Bioindicators Used for River Ecosystems: Definitions, Approaches and Trends. *Procedia Environmental Sciences* 2, 1510–1524.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Livingstone DR (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine pollution bulletin* 42, 656-666.
- Lobel PB, Bajdik CD, Belkhole SP, Jackson SE, Longrich HP (1991) Improved protocol for collecting mussel watch specimens taking into account sex, size, condition, shell shape, and chronological age. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21, 409-414.

Long ER, MacDonald DD, Smith SL, Calder FD (1995) Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management* 19, 81–87.

Lubet P, Choquet C (1971) Cycle et rythmes sexuels chez les mollusques bivalves et gastéropodes. Influence du milieu et étude expérimentale. *Haliotis* 1, 129-149.

Luoma SN, Rainbow PS (2005) Why is metal bioaccumulation so variable? *Biodynamics as a unifying concept*. *Environmental Science and Technology* 39, 1921-1931.

Lykkesfeldt J (2007) Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica chimica acta* 380, 50–58.

M

Machreki-Ajmi M (2009) Validation des biomarqueurs de pollution chez le mollusque bivalve *Cerastoderma glaucum* issu du golfe de Gabès: Etude *in situ* et transplantation *in vivo*. Thèse de doctorat. Université de Sfax. 205 p.

Machreki-Ajmi M, Hamza-Chaffai (2006) Accumulation of cadmium and lead in *Cerastoderma glaucum* originating from the Gulf of Gabes, Tunisia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76, 529-537.

Machreki-Ajmi M, Hamza-Chaffai A (2008) Assessment of sediment/water contamination by *in vivo* transplantation of the cockles *Cerastoderma glaucum* from a non contaminated to a contaminated area by cadmium. *Ecotoxicology* 17, 802-810.

Machreki-Ajmi M, Ketata I, Ladhar-Chaabouni R, Hamza-Chaffai A (2009) The effect of *in situ* cadmium contamination on some biomarkers in *Cerastoderma glaucum*. *Ecotoxicology* 17, 1-11.

Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209–220.

Marie V, Baudrimont M, Boudou A (2006a). 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.

Marie V, Gonzalez P, Baudrimont M, Bourdineaud JP, Boudou A.(2006b) Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 19, 399-407.

Marin MG, Rigato S, Ricciardi F, Matozzo V (2008) Lethal and estrogenic effects of 4- nonylphenol in the cockle *Cerastoderma glaucum*. *Marine Pollution Bulletin* 57, 552-558.

Marigomez I, Soto M, Cajaraville MP, Angulo E, Giamberini L (2002) Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique* 56, 358-392.

Matozzo V, Rova G, Marin MG (2007) Haemocytes of the cockle *Cerastoderma glaucum*: morphological characterisation and involvement in immune responses. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 732-746.

Mar SS, Okazaki M, (2012) Investigation of Cd contents in several phosphate rocks used for the production of fertilizer. *Microchemical Journal* 104, 17-21.

Marigomez I, Soto M, Cajaraville MP, Angulo E, Giamberini L (2002) Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique* 56, 358-392.

Mathieu M, Lubet P (1993) Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves- a brief review. *Invertebrate Reproduction and Development* 23, 123-129.

Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 670-684.

Minier C, Abarnou A, Jaouen-Madoulet A, Le Guellec AM, Tutundjian R, Bocquene G, Leboulenger F (2006) A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC* 25, 112-119.

Minier C, Akcha F, Galgani F (1993) P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. *Comp Biochem Physiol B* 106, 1029-1036.

Millot C, Taupier-LETAGE I (2005) Circulation in the Mediterranean Sea, the Mediterranean Sea 5K, 29-66.

Mirbahai L, Chipman JK (2013) Epigenetic memory of environmental organisms: A reflection of life time stressor exposures. *Mutation Research*, in press (doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.10.003).

Moore N, Depledge M, Readmana J, Paul DR (2004) An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Journal of Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552, 247-258.

Morin S, Vivas-Nogues M, Duong TT, Boudou A, Coste M, Delmas F (2007) Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie* 168, 179-187.

Mora P, Michel X, Narbonne JF (1999) Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environ. Toxicol. Pharmacol* 7, 253-260.

Moukrim A (2002) Réponse de certains paramètres biochimiques chez la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* à la pollution métallique. Metal and radionuclide bioaccumulation in marine organisms. *Ancona (Italia)* 19, 27- 30.

Muss A, Robertson DR, Stepien CA, Wirtz P, Bowen BW (2001). Phylogeography of *Ophioblennius*: the role of ocean currents and geography in reef fish evolution. *Evolution* 55, 561

N

Naimo TJ (1995) A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology* 4, 341-362.

Navarro A, Faria M, Barata C, Pina B (2011) Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environmental Pollution* 159, 100-107.

Navarro A, Quiros L, Casado M, Faria M, Carrasco L, Benejam L, Benito J, Diez S, Raldua D, Barata, C, Bayona JM, Pina B (2009) Physiological responses to mercury in feral carp populations inhabiting the low Ebro River (NE Spain), a historically contaminated site. *Aquatic Toxicology* 93, 150-157.

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and a genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583–590.

Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, United States of America.

Nei M, Miller JC (1990) A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics*, 125, 873–879.

Nikula, R., Väinölä, R. 2003. Phylogeography of *Cerastoderma glaucum* (Bivalvia: Cardiidae) across Europe: a major break in the Eastern Mediterranean. *Marine Biology*, 143, 339–350.

O

Oliveira GT, Rossi IC, Kucharski LC, Da Silva RSM (2004). Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* 137, 383–390.

Ovenden JR, Kashiwagi T, Broderick D, Giles J, Salini J (2009) The extent of population genetic subdivision differs among four co-distributed shark species in the Indo-Australian archipelago. *Bmc Evolutionary Biology* 9.

Oyieyi OHM (2010) Congruence entre différenciation morphologique et moléculaire (Barcode moléculaire) pour sept espèces de la famille des Phytoseiidae (*Acari* : *Mesostigmata*). Thèse de doctorat. Université de Montpellier cedex France. 297 p.

P

Pain, S, Parant M (2003) Response of multixenobiotic defence mechanism in *Dreissena polymorpha* exposed to environmental stress. *Chemosphere* 52, 1105-1113.

Pain S, Parant M (2007) Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissenapolyomorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. *Chemosphere* 67, 1258-1263.

Palais F (2011) Potentiel informatif des réponses enzymatiques digestives dans l'évaluation. Des effets d'un stress toxique sur l'état physiologique des invertébrés aquatiques. Etude de cas chez un bivalve d'eau douce: *Dreissena polymorpha*. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne. 236p.

Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25, 547–572.

Paul-Pont I, Gonzalez P, Baudrimon M, Nili H, de Montaudouin X (2010) Short-term metallothionein inductions in the edible cockle *Cerastoderma edule* after cadmium or mercury exposure: Discrepancy between mRNA and protein responses. *Aquatic Toxicology* 97, 260-267.

Paul-Pont I, Gonzalez P, Montero N, de Montaudouin X, Baudrimont M (2012) Cloning, characterization and gene expression of a metallothionein isoform in the edible cockle *Cerastoderma edule* after cadmium or mercury exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75, 119-126.

Pearson C (2003) The Genetic Population Structure of the Lagoon Specialists *Nematostella vectensis*, *Cerastoderma glaucum* and *Gammarus insensibilis* from Populations Along the Southern and Eastern Coasts of the United Kingdom. PhD thesis, University of Southampton, United Kingdom.

Pelletier E, Campbell PGC, Denzeau F (2004) Ecotoxicologie moléculaire. Principes fondamentaux et perspectives de développement. 449 p.

Pérez-Tomas R (2006) Multidrug resistance : Retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment, Current Medicinal Chemistry 13, 1859- 1876.

Perez-Camacho A, Delgado M, Fernandez-Reiriz U, Labarta MJ (2003) Energy balance, gonad development and biochemical composition in the clam *Ruditapes decussatus*. Marine Ecology Progress Series 25, 133-145.

Perceval O, Pinel-Alloul B, Méthot G, Couillard Y, Giguère A, Campbell PGC, Hare L (2001) Cadmium accumulation and metallothionein synthesis in freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*): relative influence of the metal exposure gradient versus limnological variability. Environ. Pollut 118, 5-17.

Petala M, Kokokiris L, Samaras P, Papadopoulos A, Zouboulis A (2009) Toxicological and ecotoxic impact of secondary and tertiary treated sewage effluents. Water Research 43, 5063-5074.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters 26, 509-515.

Pinot F, Kreps SE, Bachelet M, Hainaut P, Bakonyi M, Polla BS (2000) Cadmium in the environment: sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. Reviews on Environmental Health 15, 299-323.

Plaistow SJ, Troussard JP, Cézilly F (2001). The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. Int J Parasitol 31, 346-351.

Plouviez S (2009) Phylogéographie comparée des espèces hydrothermales de la dorsale du pacifique oriental. These de doctorat. Université de Pierre et Marie Curie. 341 p.

Poutier JM (1987) Use Bivalves: 371-512 in Fishier W, Schneider M, Bouchot ML (1987) Fiches d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Vol 1. Végétaux et Invertébrés. F.A.O. Rome. 760 p.

Poynton HC, Loguinov AV, Varshavsky JR, Chan S, Perkins EJ, Vulpe CD (2008) Gene expression profiling in *Daphnia magna* part I: concentration-dependent profiles provide support for the No Observed Transcriptional Effect Level. Environmental Science and Technology 42, 6250-6256.

R

Radlowska M, Pempkowiak J (2002) Stress-70 as indicator of heavy metals accumulation in blue mussel *Mytilus edulis*. Environ. Int 27, 605–608.

Ramade F (2007) Introduction à l'écotoxicologie. Fondements et applications. 583 p, lavoisier.

Ray DA (2007) SINEs of progress: Mobile element applications to molecular ecology. Molecular Ecology 16, 19-33.

- Riedel GF, Abbe GR, Sanders JG (1998) Temporal and spatial variations of trace metal concentrations in oysters from the Patuxent River, Maryland. *Estuaries* 21, 423-434.
- Riginos C, Henzler CM (2008) Patterns of mtDNA diversity in North Atlantic populations of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 155, 399-412.
- Riout D, Pasquier J, Boulangé-Lecomte C, Poret A, Abbas I, Marin M, Minier C, Le Foll F (2014) The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. *Aquatic Toxicology* 153, 98-109.
- Roesijadi G (1992) Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 22, 81-113.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution* 9, 552-569.
- Rosa R Nunes ML (2003) Biochemical composition of deep-sea decapod crustaceans with two different benthic life strategies off the Portuguese south coast. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 50, 119-130.
- Ruano F, Ramos P, Quaresma M, Bandarra NM, Pereira da Fonseca I (2012) Evolution of fatty acid profile and Condition Index in mollusc bivalves submitted to different depuration periods. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 111, 75-84.
- Ruggieri G (1967) The Miocene and later evolution of the Mediterranean Sea. In: *Aspects of Tethyan Biogeography* (eds Adams CG, Ager DV), pp. 283-290. The Systematic Association, London, United Kingdom.
- Ruiz Y, Suarez P, Alonso A, Longo E, Villaverde C, San Juan F (2011) Environmental quality of mussel farms in the Vigo estuary: pollution by PAHs, origin and effects on reproduction. *Environmental Pollution* 159, 250-265.
- Russell PJC (1971) A reappraisal of the geographical distributions of the cockles *Cardium edule* L. and *C. glaucum* Bruguière. *Journal of Conchology* 27, 225-234.
- Russell PJC (1972) Biological studies on *Cardium glaucum*, based on some Baltic and Mediterranean populations. *Marine Biology* 16, 290-296.
- Rygg B (1970) Studies on *Cerastoderma edule* (L.) and *Cerastoderma glaucum* (Poiret). *Sarsia*, 43, 65-80.

S

- Sabatini SE, Rocchetta I, Luquet CM, Guido MI, de Molina MdCR (2011) Effects of sewage pollution and bacterial load on growth and oxidative balance in the freshwater mussel *Diplodon chilensis*. *Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters* 41, 356-362.
- Salo HM, Hebert N, Dautremepuits C, Cejka P, Cyr DG, Fournier M (2007) Effects of Montreal municipal sewage effluents on immune responses of juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 84, 406-414.

- Sánchez MI, Green AJ, Amat F, Castellanos EM (2007) Transport of brine shrimps via the digestive system of migratory waders: dispersal probabilities depend on diet and season. *Marine Biology* 151, 1407–1415.
- Sánchez MI, Green AJ, Castellanos EM (2006) Internal transport of seeds by migratory waders in the Odiel marshes, south-west Spain: consequences for long-distance dispersal. *Journal of Avian Biology*, 37, 201–206.
- Sancey B, Trunfio G, Charles J, Minary JF, Gavaille S, Badot PM, Crini G (2011) Heavy metal removal from industrial effluents by sorption on cross-linked starch: Chemical study and impact on water toxicity. *Journal of Environmental Management* 92, 765-772.
- Santos Yabe, M.J, de Oliveira E (2003) Heavy metals removal in industrial effluents by sequential adsorbent treatment. *Advances in Environmental Research* 7, 263-272
- Sanni B, Williams K, Sokolov EP, Sokolova IM (2008) Effects of acclimation temperature and cadmium exposure on mitochondrial aconitase and LON protease from a model marine ectotherm, *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 147, 101-112.
- Sarà G (2007) Sedimentary and particulate organic matter: mixed sources for cockle *Cerastoderma glaucum* in a shallow pond, Western Mediterranean, *Aquatic Living Resources* 20, 271–277.
- Sazaki T, Mastay S, Sonae A (1972) Effect of acetic acid concentration on the colour reaction in the O-toluidine boric acid method for blood glucose estimation. *Rinsho. Kagaku* 1, 346.
- Scarlato OA, Starobogatov VA (1972) Klass dvusvorchatye mollyuski- Bivalvia. In: *Opredelitel Fauny Chernogo i Azovskogo Morei, v. III Svobodnozhivushchie Bespozvonochnye* 249 p. Naukova Dumka, Kiev.
- Serafim A, Bebianno MJ (2007) Kinetic model of cadmium accumulation and elimination and metallothionein response in *Ruditapes decussatus*. *Environ Toxicol Chem* 26, 960-969.
- Serbaji MM (2000) Utilisation d'un SIG multi sources pour la compréhension et la gestion intégrée de l'écosystème côtier de la région de Sfax (Tunisie). Thèse de Doctorat. Université de Tunis II .223 p.
- Schill RO, Köhler HR (2004) Energy reserves and metal-storage granules in the hepatopancreas of *Oniscus asellus* and *Porcellio scaber* (Isopoda) from a metal gradient at Avonmouth, UK. *Ecotoxicology* 13, 787-796.
- Schlenk D (1999) Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin* 39, 48-53.
- Schulte PM (2001) Environmental adaptations as windows on molecular evolution. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 128, 597-611.
- Schulte PM (2004) Changes in gene expression as biochemical adaptations to environmental change: a tribute to Peter Hochachka. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 139, 519-529.

- Shen P, Zhou H, Gu JH (2012) Novel polymorphism of internal transcribed spacers (ITS) and their utilization in phylogenetic analysis of *Neanthes glandicincta* (Annelida: Polychaeta: *Nereididae*). *Ecotoxicology* 21, 1717–1725.
- Shi H, Sui Y, Wang X, Luo Y, Ji L (2005) Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* 140, 115-121.
- Shulman MJ, Bermingham E (1995) Early life histories, Ocean currents, and the population genetics of Caribbean reef fishes. *Evolution* 49, 897-910.
- Sim CH, Quek BS, Shutes RB, Goh KH (2013) Management and treatment of landfill leachate by a system of constructed wetlands and ponds in Singapore. *Water Science and Technology* 68, 1114-1122.
- Singer C, Zimmermann S, Sures B (2005) Induction of heat shock proteins (hsp70) in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to platinum group metals (platinum, palladium and rhodium): comparison with lead and cadmium exposures. *Aquatic Toxicology* 75, 65-75.
- Smaoui-Damak W (2005) Effet de la contamination *in situ* par le cadmium sur le potentiel reproducteur de la palourde *Ruditapes decussatus* (golfe de Gabès) et sur la synthèse des metallothionéines. Thèse de doctorat, Université de Sfax. Tunisie.
- Smaoui-Damak W, Hamza-Chaffai A, Bebianno MJ, Amiard JC (2004) Variation of metallothioneins in gills of the clam *Ruditapes decussatus* from the Gulf of Gabes (Tunisia). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* 139, 181-188.
- Smaoui-Damak, W, Hamza-Chaffai A, Berthet B, Amiard JC (2003) Preliminary study of the clam *Ruditapes decussatus* exposed *in situ* to metal contamination and originating from the Gulf of Gabes, Tunisia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71, 961-970.
- Smaoui-Damak W, Rebai T, Berthet B, Hamza-Chaffai A (2006) Does cadmium pollution affect reproduction in the clam *Ruditapes decussatus*? A one-year case study. *Comp. Biochem. Physiol.* C143, 252-261.
- Smolders R, Bervoet, L, De Coen W, Blust R (2004). Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution* 129, 99–112.
- Snape JR, Maund SJ, Pickford DB, Hutchinson TH (2004) Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 6, 143-154.
- Sokolova IM, Sokolov EP, Ponnappa KM (2005) Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquatic Toxicology* 73, 242-255.
- Sokolova IM, Lanning G (2008) Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Res* 37, 181–201.
- Sparkes TC, Keogh DP, Pary RA (1996) Energetic costs of mate guarding behavior in male stream-dwelling isopods. *Oecologia* 106, 166-171.

Steiner S, Anderson NL (2000) Expression profiling in toxicology: potentials and limitations. *Toxicology Letters* 112-113, 467-471.

St Clair DK, Oberley TD, Muse KE, St Clair WH (1994) Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. *Free Radic. Biol. Med* 16,275–282.

Sunderman FW, Marzouk A, Hopfer SM, Zaharia O, Reid MC (1985) Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 15, 229-236. Sokolova IM, Lanning G (2008) Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research* 37, 181-201.

Szefer P, Wolowicz M, Kusak A, Deslous-Paoli J, Czarnowski W, Frelek K, Belzunce M (1999) Distribution of mercury and other trace metals in the cockle *Cerastoderma glaucum* from the Mediterranean Lagoon Etang de Thau. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36, 56-63.

T

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.

Tanguy A, Mura C, Moraga D (2001) Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*(CgMT1). *Aquatic Toxicology* 55, 35-47.

Tarnowska K, Chenuil A, Nikula R, Féral JP, Wolowicz M (2010) Complex genetic population structure of the bivalve *Cerastoderma glaucum* in a highly fragmented lagoon habitat. *Marine Ecology Progress Series* 406, 173–184.

Tarnowska K (2010) Genetic structure and physiological variation of a widespread European lagoon specialist *Cerastoderma glaucum* (Bivalvia) living in extreme environmental conditions. Thèse de doctorat. Université de la méditerranée France.

Tatonova YV, Chelomina GN, Besprosvannykh VV (2012) Genetic diversity of nuclear ITS1–5.8S–ITS2 rDNA sequence in *Clonorchis sinensis* *Cobbold, 1875* (Trematoda: Opisthorchidae) from the Russian Far East. *Parasitology International* 61, 664–674.

Tarnowska K, Krakau M, Jacobsen S, Wolowicz M, Féral P, Chenuil A (2012) Comparative phylogeography of two sister (congeneric) species of cardiid bivalve: Strong influence of habitat, life history and post-glacial history. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 107, 150-158.

Tayibi H, Choura M, López FA, Alguacil FJ, López-Delgado A (2009) Environmental impact and management of phosphogypsum. *Journal of Environmental Management* 90, 2377-2386.

Taylor MS, Hellberg ME (2006) Comparative phylogeography in a genus of coral reef fishes: biogeographic and genetic concordance in the Caribbean. *Molecular Ecology* 15, 695-707.

Tedengren M, Olsson B, Bradley B, Zhou L (1999) Heavy metal uptake, physiological response and survival of the blue mussel *Mytilus edulis* from marine and brackish waters in relation to the induction of heat-shock protein 70. *Hydrobiologia* 393, 261-269.

Thaker AA, Haritos AA (1989) Cadmium bioaccumulation and effects on soluble peptides, proteins and enzyme in the hepatopancreas of the shrimp *Callinassa thyrrhena*. *Comp. Biochem. Physiol* 94C, 63 - 70.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22, 4673–4680.

Thornton I (1992) Sources and pathways of cadmium in the environment. IARC Scientific Publications, 149-162.

Tlili S, Métais I, Ayache N, Boussetta H, Mouneyrac C (2011) Is the reproduction of *Donax trunculus* affected by their sites of origin contrasted by their level of contamination? *Chemosphere* 84, 1362–1370

Trevisan R, Flesch S, Mattos JJ, Milani MR, Bainy ACD, Dafre AL (2014) Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 159, 22-30.

Trigui-El Mnif N (1995) La palourde *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) des côtes tunisiennes : Biométrie, reproduction et impact de l'environnement sur la bioaccumulation en métaux traces. Thèse de troisième cycle en biologie Marine et Océanographie. Faculté des Sciences de Tunis. Université de Tunis II. 261 p.

Trotta P, Cordisco CA (1998) Gonadal maturation, conditioning and spawning in the laboratory and maturation cycle in the wild of *Cerastoderma glaucum* Bruguière. *Journal of Shell fish Research*. 17, 919-923.

Tulkki P (1961) *Cardium lamarcki* Reeve in Norwegian waters. *Sarsia* 4, 55–66.

V

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.

Van Straalen NM, Hoffman AA (2000) Review of experimental evidence for physiological costs of tolerance to toxicants, in: Kammenga, J., Laskowski, R. (Eds.), *Demography in Ecotoxicology*. John Wiley & Sons pp. 147-161.

Veldhoena N, Lowe CJ, Davis C, Mazumder A, Helbinga CC (2009) Gene expression profiling in the deep water horse mussel *Modiolus modiolus* (L.) located near a marine municipal wastewater outfall. *Aquatic Toxicology* 93, 116–124.

Véronique M (2005) Etude de la réponse des métallothionéines chez les bivalves, *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas*, après exposition au cadmium et au zinc - Approches *in situ* et expérimentales. Thèse de doctorat. Université de bordeaux 1. 461 p.

Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Mancinelli G, Accomando A, Smaalb AC, Orunesu M (1995) Stress on Stress Response: A Simple Monitoring Tool in the Assessment of a General Stress Syndrome in Mussels. *Marine Environmental Research* 39, 245-248.

Viarengo A, Nott JA (1993) Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol* 104, 355-372

Voets J, Talloen W, de Tender T, van Dongen S, Covaci A, Blust R, Bervoets L (2006). Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters. *Aquatic toxicology* 79, 213-225.

Voisin M, Engel C, Viard F (2005) Differential shuffling of native genetic diversity across introduced region in a brown alga: aquaculture vs. maritime traffic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5432-5437.

W

Wang, Q, Wang X, Yang H, Liu B (2010) Analysis of metallothionein expression and antioxidant enzyme activities in *Meretrix meretrix* larvae under sublethal cadmium exposure. *Aquatic Toxicology* 100, 321-328.

Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine* 36, 1434-1443.

Wang L, Song L, Ni D, Zhang H, Liu W (2009) Alteration of metallothionein mRNA in bay scallop *Argopecten irradians* under cadmium exposure and bacteria challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 50-57.

Ward JE, Levinton JS, Shumway SE, Cucci T (1997) Site of particle selection in a bivalve molluscs. *Nature* 390, 131-132.

Weisiger RA, Fridovich I (1973) Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* 248, 4793-4796.

Winnepenninckx B, Backeljau T, de Wachter R (1993). Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends Genet* 9, 407.

Wołowicz M (1991) Geograficzne zróżnicowanie populacji *Cardium glaucum* Bruguière Bivalvia). Hipotezy dotyczące pochodzenia i dróg migracji gatunku. Uniwersytet Gdański, Gdańsk, Poland.

Wołowicz M, Sokołowski A, Bawazir AS, Lasota R (2006) Effect of eutrophication on the distribution and ecophysiology of the mussel *Mytilus trossulus* (Bivalvia) in southern Baltic Sea (the Gulf of Gdańsk), *Limnology and Oceanography* 52 (1, part 2), 580-590.

Wolstenholme D (1992) Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology* 141, 173-216.

Z

Zaja R, Klobucar R S, Smital T (2007) Detection and functional characterization of Pgp1 (ABCB1) and MRP3 (ABCC3) efflux transporters in the PLHC-1 fish hepatoma cell line, *Aquatic Toxicology*, 81, 365-376.

- Zaouali J (1974) La faune malacologique du lac de Tunis (parties Nord et Sud) et de ses canaux (Canal Central, Canal Nord et Canal Sud). *Haliotis* 4, 179–186.
- Zardi GI, McQuaid CD, Teske PR, Barker NP (2007) Unexpected genetic structure of mussel populations in South Africa: indigenous *Perna perna* and invasive *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 337, 135-144.
- Zaouali J (1979) Contribution à l'étude malacologique de la mer de Bou Grara (Tunisie meridionale). Premières données biométriques sur *Cerastoderma glaucum* Poiret 1789 (Bivalvia, Eulamellibranchia, Cardiidae). *Archives de L'Institut Pasteur de Tunis* 56, 403–424.
- Zaouali J. 1980. Étude du cycle sexuel de *Cerastoderma glaucum* (Poiret, 1789) (Bivalvia, Eulamellibranchia, Cardiidae) dans la mer de Bou Ghrara (Tunisie). *Archs. Inst. Pasteur Tunis*, 57 : 281-295.
- Zhang Q, Li F, Wang B, Zhang J, Liu Y, Zhou Q, Xiang J (2007) The mitochondrial manganese superoxide dismutase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: cloning, distribution and expression. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 429–440.
- Zhu B, Gao KS, Wang KJ, Ke CH, Huang HQ (2012) Gonad differential proteins revealed with proteomics in oyster (*Saccostrea cucullata*) using alga as food contaminated with cadmium. *Chemosphere* 87, 397-403.
- Zorita I, Bilbao E, Schad A, Cancio I, Soto M, Cajaraville MP (2007) Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by *in situ* hybridization and RT-PCR. *Toxicology and Applied Pharmacology* 220, 186-196.
- Zouros E, Freeman K, Ball A, Pogson G (1992) Direct evidence for extensive parental mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature* 359, 412–414.
- Zouros E, Ball A, Saavendra C, Freeman K (1994) An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 7463–7467.
- Zucchi S, Corsi I, Luckenbach T, Bard SM, Regoli F, Focardi S (2010) Identification of five partial ABC genes in the liver of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* and sensitivity of ABCB1 and ABCC2 to Cd exposure. *Environmental Pollution* 158, 2746-2756.
- Zuykov M, Pelletier E, Harper DA (2013) Bivalve mollusks in metal pollution studies: from bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93, 201-208.

Annexes

**Article1 : publié dans
Environnemental Science and
Pollution Research
DOI 10.1007/s11356-014-3971-8**

**Transcriptional response of stress-regulated
genes to cadmium exposure in the cockle
Cerastoderma glaucum from the gulf of
Gabès area (Tunisia)**

**Sahar Karray, Justine Marchand, Brigitte Moreau,
Emmanuelle Tastard, Stanislas Thiriet-Rupert, Alain
Geffard, Laurence Delahaut, Françoise Denis, Amel
Hamza-Chaffai and Benoît Chénais**

Transcriptional response of stress-regulated genes to cadmium exposure in the cockle Cerastoderma glaucum from the gulf of Gabès area (Tunisia)

Sahar Karray, Justine Marchand, Brigitte Moreau, Emmanuelle Tastard, Stanislas Thiriet-Rupert, Alain Geffard, Laurence Delahaut, et al.

Environmental Science and Pollution Research

ISSN 0944-1344

Environ Sci Pollut Res
DOI 10.1007/s11356-014-3971-8



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Transcriptional response of stress-regulated genes to cadmium exposure in the cockle *Cerastoderma glaucum* from the gulf of Gabès area (Tunisia)

Sahar Karray · Justine Marchand · Brigitte Moreau · Emmanuelle Tastard · Stanislas Thiriet-Rupert · Alain Geffard · Laurence Delahaut · Françoise Denis · Amel Hamza-Chaffai · Benoît Chénais

Received: 15 August 2014 / Accepted: 8 December 2014
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract This study investigates cadmium effects on key messenger RNA (mRNA) expression (MT, MnSOD, CuZnSOD, CAT, ABCB1, HSP70, and CO1) by qPCR in the cockle *Cerastoderma glaucum* after chronic exposure to two high but environmentally relevant concentrations of CdCl₂ (50 µg/L and 5 mg/L) for 12 h to 18 days. Cd accumulation measured in cockles' tissues is significantly higher in both treatment conditions compared to controls and in a dose-dependent manner. Stress on stress tests performed at different times of the experiment clearly demonstrated that exposure to both concentrations of Cd significantly affects cockle survival time in air. Important changes in gene transcription were also highlighted. In particular, MT, HSP70, CAT, and CuZnSOD seem to be relevant biomarkers of Cd

exposure because (1) their mRNA levels increase upon exposure and (2) they are highly correlated to Cd accumulation in tissues. Results may be useful for control strategies and for the use of cockles as sentinel organisms.

Keywords Cockle · Cadmium · Stress response · Gene transcription · qPCR · Detoxication · Oxidative stress

Introduction

Cadmium is released in the aquatic environment from both anthropogenic and natural sources (Choi et al. 2007). It is one of the most toxic metals principally obtained as a by-product in zinc refining (Pinot et al. 2000) and found in phosphate fertilizers (Cupit et al. 2002). Cadmium can enter the aquatic food chain through direct consumption of water or biota and has the potential to accumulate at each level of the food chain so that human may amass large quantity of Cd through diet (Zhu et al. 2012). Therefore, Cd is considered as a serious environmental health threat. Major programs of freshwater safeguard have studied the deleterious impacts of Cd at the ecosystem, community, or population levels of organization (Brooks et al. 2004; Al Kaddissi et al. 2012).

Many aquatic organisms are of potential interest as ecologically sensitive targets of metallic pollution. Among them, bivalves are regularly used as bioindicators of water metal pollution because of their high bioaccumulation capacities for heavy metals (Inza et al. 1997) and because they are well represented in aquatic ecosystems. Responses to Cd exposure have been largely investigated in different bivalve species such as cockles (Ladhar-Chaabouni et al. 2008; Paul-Pont et al. 2012), zebra mussels (Navarro et al. 2011), oysters (Ivanina et al. 2008a, b; Sanni et al. 2008), bay scallops (Wang

Responsible editor: Philippe Garrigues

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11356-014-3971-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Karray · J. Marchand (✉) · B. Moreau · E. Tastard · S. Thiriet-Rupert · F. Denis · B. Chénais
 Université du Maine - Le Mans, EA 2460 Mer Molécules Santé, Institut Universitaire Mer et Littoral - FR3473 CNRS, 72085 Le Mans Cedex, France
 e-mail: justine.marchand@univ-lemans.fr

S. Karray · A. Hamza-Chaffai
 Laboratoire d'Ecotoxicologie Marine et Environnementale, Université de Sfax, Sfax, Tunisia

A. Geffard · L. Delahaut
 EA 4689 Interactions Animal Environnement, Université de Reims-Champagne Ardenne, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

F. Denis
 UMR 7208 CNRS-MNHN-IRD-UPMC Biologie des Organismes et des Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), Concarneau, France

et al. 2009), clams (Wang et al. 2010), and freshwater bivalves (Bigot et al. 2009). To highlight the response to Cd exposure, authors used different biomarkers at various biological organization levels, i.e., biochemical, transcriptional, proteomic, and histochemical. These studies showed that Cd exposure could inhibit the activity of some mitochondrial enzymes and usually induces expression of detoxification and other defense genes, but their regulation remains complex. In Tunisia, the Gulf of Gabès was shown to be contaminated by trace metals, especially Cd, which originated from the crude phosphate treatment from plants (Hamza-Chaffai et al. 2003; Smaoui-Damak et al. 2003). Cadmium concentrations in bivalves collected from some localities along this area exceeded the consumption safety level currently authorized by the World Health Organization (Smaoui-Damak et al. 2003; Machreki-Ajmi and Hamza-Chaffai 2006).

The cockle *Cerastoderma glaucum* is widely distributed from the Baltic to the Mediterranean Sea in a wide range of ecological conditions (Derbali et al. 2012) and has been validated as a bioindicator organism reflecting the pollution state of the coast. This sedentary and filter-feeding species lives in the superficial sediment and is known to be suitable for toxicology and risk assessment studies since it tends to accumulate large amounts of pollutants and especially metals such as Cd (Szefer et al. 1999; Cheggour et al. 2001; Machreki-Ajmi et al. 2008). Cockles are major preys for diverse animal groups such as crustaceans, fishes, and wading birds (Paul-Pont et al. 2010a), and they may also contribute to reduce the particulate organic load (Derbali et al. 2012). Beyond these ecological roles, they are also commercially important resources (Paul-Pont et al. 2010a). Some investigators have recently focused on the biology of *Cerastoderma glaucum* and the responses to different biochemical, immunotoxicological, and endocrine disruptors were studied using biomarkers that have been employed for the analysis of pollution impacts in estuaries and toxicity risk assessment of specific contaminants (Matozzo et al. 2007; Machreki-Ajmi and Hamza-Chaffai 2008; Marin et al. 2008). The qRT-PCR analysis of gene transcription has become one of the most robust tools of molecular biology. Changes in gene expression are likely to play a critical role in both acclimation and adaptation to environmental changes (Schulte 2004). Key changes in gene expression are also thought to precede the manifestation of strong functional alterations, giving expression profiling a great potential for early detection of alterations (Steiner and Anderson 2000; Schulte 2001; Mirbahai and Chipman 2014).

The present work aims to unravel the modifications of key messenger RNA (mRNA) expression underlying physiological responses of the cockle *Cerastoderma glaucum* to Cd exposure. The mRNA transcripts used for this analysis encode proteins involved in diverse pathways such as metal and xenobiotic detoxification (metallothionein, MT; ATP-binding

cassette xenobiotic transporter, ABCB1), protection against oxidative stress (superoxide dismutases, MnSOD and CuZnSOD; catalase, CAT), general stress (heat shock protein, HSP70), and mitochondrial alterations (cytochrome c oxidase 1, CO1). In this study, gills were chosen for gene transcription monitoring. This organ constitutes a key interface for the uptake of dissolved metal ions from water and therefore was considered as the main target organ in metal exposure studies (Marigomez et al. 2002; Paul-Pont et al. 2010b).

Two concentrations of cadmium were used during an experimentation of 18 days: the lowest CdCl₂ dose employed in this study (50 µg/L) is a high environmentally relevant concentration since it has been found in several contaminated sites (Blackmore 1998; Serafim and Bebianno 2007; Zhang et al. 2011; Zhao et al. 2014). The highest CdCl₂ dose employed (5 mg/L) is less encountered, but it might be found in very highly polluted sites and especially during accidental pollution (Henry et al. 1984; Belabed et al. 1994). Survival rates of *Cerastoderma glaucum* and stress on stress tests (survival to air exposure) were assessed. Cd bioaccumulation levels were examined in the same individuals, and relationships between gene transcription and Cd levels were further examined in an attempt to highlight an mRNA expression pattern in cockles exposed in vivo to Cd.

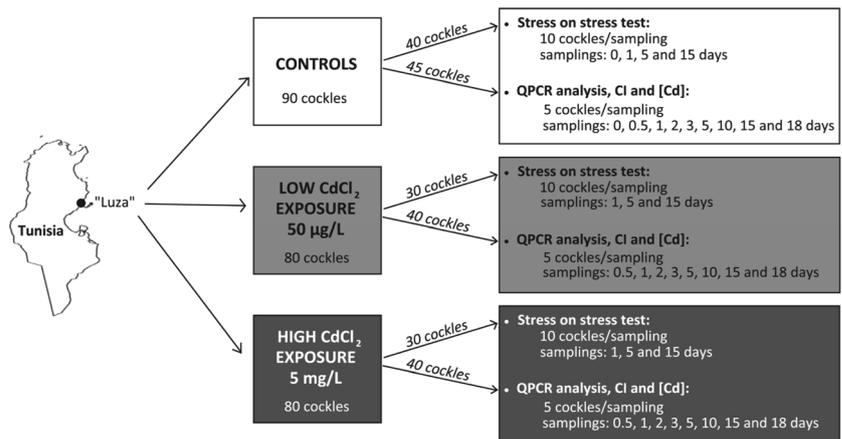
Materials and methods

Animals and treatments

Cockles (*Cerastoderma glaucum*) (28–32 mm) were collected from the “Luza” site (located 45 km in the north of Sfax, Tunisia; Fig. 1), which is considered as a reference site with a low pollution level (Barhoumi et al. 2009; Kessabi et al. 2010). After an acclimation period of 24 h, cockles were assigned to three polyethylene tanks (30×30×20 cm), each one containing a layer of autoclaved sediment collected from the Luza site and 6 L of aerated seawater. The first tank contained seawater without CdCl₂ (control), the second tank contained seawater with 50 µg/L of CdCl₂ (low concentration), and the third tank contained seawater with 5 mg/L of CdCl₂ (high concentration). Eighty to 90 cockles were held in each tank (experimental design schematized in Fig. 1), and exposure time varied between 12 h and 18 days (Fig. 1). During the experiment, seawater and CdCl₂ were renewed twice a week.

Verification of metal content in the sediment used for the experimentation

A lyophilized sediment (0.5 g) from the Luza site was placed in glass tubes previously washed with hydrochloric acid (10 %) and then mineralized using 5 mL of nitric acid

Fig. 1 Sampling and experimental exposure of cockles

(HNO₃) and 3 mL of hydrochloric acid (HCl). Ten milliliters of hydrochloric acid is then added to the dry residue. Determination of trace concentrations of Cd, Cu, Zn, Ni, Cr, Mn, and Pb was performed using inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometry (ICP AES, Thermo Scientific iCAP 6000 series) (Geffard et al. 2001).

Stress on stress test

Ten animals of each condition (controls and CdCl₂ contaminations) were sampled after 0, 1, 5, and 15 days of exposure and submitted to anoxia by air exposure at 15 °C (Fig. 1). Survival was assessed daily according to the method of Viarengo et al. (1995). Death symptoms were considered to be open valves and absence of muscular activity. Lethal time corresponding to 50 % of dead animals (LT₅₀) was measured.

Condition index of cockles

Condition index (CI) was calculated individually on five cockles at each sampling time (Fig. 1). Before dissection, all cockles were weighted (total and soft weight), and the CI was expressed as a percentage of the ratio of fresh weight of soft tissues to total weight (Lobel et al. 1991).

Determination of cadmium content in cockles

Measurement of Cd concentration in cockles was carried out as previously described (Geffard et al. 2010) by electrothermic atomic absorption spectrophotometry with Zeeman correction, using a graphite furnace (SpectrAA Zeeman 220). The measure was done individually on five cockles at each sampling time (Fig. 1) on the remaining animal tissues including digestive gland, muscle, mantle, and foot.

RNA extraction and cDNA synthesis

Gene transcription analyses were carried out individually on the same five individuals for which Cd concentration and CI were measured and at each sampling time (Fig. 1). Gills of each sample were dissected, conserved in RNA later (Sigma-Aldrich), and stored at -20 °C. Total RNA was isolated from 100 mg of gills using Tri-Reagent (Invitrogen). RNA concentration and quality were determined using the Experion system (Bio-Rad). Three micrograms of total RNA was added to dTrace primer (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTT TTTTTTTTTTTTTT-3') and nuclease free water in a final volume of 12.25 µL. A denaturation at 70 °C was carried out for 5 min and the mixture kept on ice. First-strand cDNAs were then synthesized using dTrace, RNAsin (Promega), and MMLV reverse transcriptase (Promega) in a final volume of 25 µL for 90 min at 42 °C.

Real-time quantitative PCR

Real-time PCR reactions were performed using a StepOnePlus apparatus (Applied Biosystems) with Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers (Table S1 and S2 in Supplementary data) designed on the basis of previously characterized sequences as described in details in Supplementary Data. The best housekeeping gene was selected among four genes tested using the Bestkeeper Software (Pfaffl et al. 2004), and the relative expression was determined by the comparative Ct method (Livak and Schmittgen 2001) using control cockles at time 0 (T₀) as calibrator (cf Supplementary Data).

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the R statistical Software version 2.14.1. In the stress on stress experiment, influence of Cd concentration and exposure time on ability to

survive under anoxia was analyzed using the SURVREG function (survival package, R; Lumley and Therneau 2003). To test for significant differences, *t* tests were used for bioaccumulation values and Kolmogorov-Smirnov tests for gene transcription values. After normalization of the data by $\log(x+1)$ transformation and stabilization of their variances by square-root transformation, influences of Cd treatment and exposure time on gene transcription, Cd bioaccumulation, and CI were assessed by independent ANOVA significance tests. Principal component analyses (PCAs) were performed and correlations were tested statistically using Pearson's method to highlight correlations between gene transcription, Cd bioaccumulation, and CI.

Results

Heavy metal content analyzed from the sediment used for the experimentation showed that all the concentrations (Cd 0.109, Cu 0.941, Zn 7.082, Ni 0.727, Cr 2.717, Mn 6.301, Pb 1.654 $\mu\text{g/g}$ of dry weight) were considerably below the maximum levels authorized by the Tunisian and French norms (T.N 106.002 and French Ministerial Decree of 22 February 1998).

Survival, stress on stress response, and CI

Survival rates of *Cerastoderma glaucum* were assessed for each exposure time, and the Cd-induced mortality remain below 10 % for each concentration and time point. Survival under anoxia (i.e., stress on stress assay) is significantly affected by Cd exposure (Fig. 2). Indeed, a significant decrease of lethal time (LT_{50}) values is observed with the increase of Cd concentration ($p < 0.001$; SURVREG function, R) and exposure time ($p < 0.001$; Fig. 2). LT_{50} of controls reaches 8 days while decreasing from 8 days (after 1 day of exposure) to 2 days (after 15 days of exposure) for the concentration of 50 $\mu\text{g/L}$ and from 6 days (at day 1) to 1 day (at day 15) for the concentration of 5 mg/L.

Neither low nor high exposure to CdCl_2 affected the condition index (CI) of *Cerastoderma glaucum* after 18 days. No significant difference was observed comparing the mean CI for control (9.14 ± 2.42) and exposed groups (50 $\mu\text{g/L}$, 7.39 ± 1.75 ; 5 mg/L, 8.39 ± 1.98).

Cd bioaccumulation in cockles' tissues

Cadmium concentration remains low and relatively constant in tissues of control cockles (Fig. 3). Following exposure to 50 $\mu\text{g/L}$ of CdCl_2 , the tissue cadmium concentration was significantly increased to about 0.5 $\mu\text{g/g}$ and displayed no significant variation in time

($p > 0.05$). On the contrary, the treatment with 5 mg/L of CdCl_2 resulted in a dramatic accumulation of Cd that increased with exposure time ($p < 0.001$) up to $35.9 \pm 10.850 \mu\text{g/g}$ at day 18 (Fig. 3).

Effect of Cd on relative gene transcription

Relative expression of the seven stress-regulated genes is represented as box plots with respect to the calibrator (controls at time 0) in Figs. 4 and 5. The global comparison of the gene transcriptions indicates a lower variability within sampling points in controls compared to exposed cockles (either 50 $\mu\text{g/L}$ and 5 mg/L) for all the target genes studied (Figs. 4 and 5). However, exposition to CdCl_2 globally led to an increase in gene transcription for CuZnSOD, CAT, MT, and HSP70 (up to +243, +49, +44, and +379 fold the mean expression level of control samples respectively; Fig. 4a–d, Table 1). Gene transcription was dependent of exposure time in some cases. In particular, gene transcription globally increased with exposure time for CuZnSOD, HSP70, and MT in cockles exposed to 50 $\mu\text{g/L}$ of CdCl_2 and for CAT and MT in cockles exposed to 5 mg/L of CdCl_2 (Fig. 4a–d, Table 1). However, variation was rarely linear: Gene transcriptions of HSP70 and MT at Cd concentration of 50 $\mu\text{g/L}$ and MT at Cd concentration of 5 mg/L first decreased to a minimum (–3, –19, and –47 fold the mean expression level of control samples respectively, after 1 to 3 days of exposure) and then increased (up to +379, +16, and +44 fold the mean expression level of control samples respectively; Fig. 4c, d). Concerning CO1, MnSOD, and ABCB1, expression was not influenced by the CdCl_2 treatment in itself, but some of them were influenced by exposure time. Gene transcription globally decreased with time for MnSOD in cockles exposed to 50 $\mu\text{g/L}$ of CdCl_2 and for CO1 in cockles exposed to 5 mg/L of CdCl_2 (Table 1). As previously, this decrease was nonlinear; expression first increased to a maximum, decreased abruptly, and slightly increased again (Fig. 5a, b).

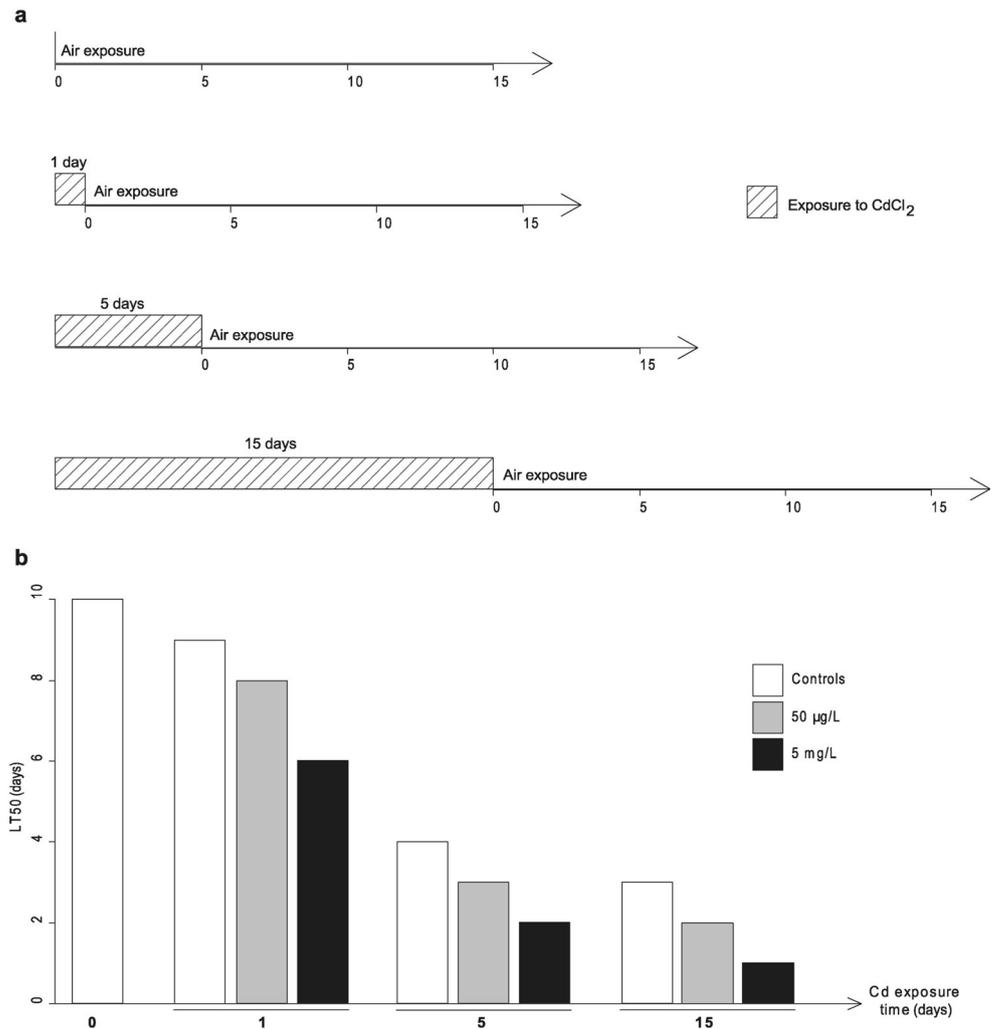
PCAs

To highlight relationships between mRNA levels ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{sample}} - \text{Ct}_{\text{HKG}}$), CI, and Cd bioaccumulation, two different PCAs were carried out, one considering controls and cockles exposed to 50 $\mu\text{g/L}$ and the other one considering controls and cockles exposed to 5 mg/L (Fig. 6). All pair-wise correlations were tested statistically (Pearson's correlation test), and the results are presented in Supplementary data (Tables S2 and S3).

In the 50 $\mu\text{g/L}$ analyses (Fig. 6a, c), 58.3 % of the total variance is explained by the two main axes. Positive

Fig. 2 Protocol and results of the stress on stress test. Some cockles were exposed to anoxia after 0, 1, 5, or 15 days of exposure to either 0, 50 $\mu\text{g/L}$, or 5 mg/L of CdCl_2 . Survival under anoxia was followed, and the median lethal time (LT50) was recorded for each combination of treatment and exposure time. **a**

Experimental conditions: the length of the hatched bar indicates the time of cadmium exposure. The arrow figures the following of survival under anoxia after cadmium exposure. **b** Results: median lethal time (in days) of cockles submitted to anoxia after cadmium exposure for each treatment and exposure time



correlations are observed between Cd bioaccumulation and MT, HSP70, CuZnSOD, CO1, CAT, and ABCB1 mRNA levels (Fig. 6a, Table S3). No correlation is found between this cluster and MnSOD and CI (Fig. 6a and Table S3). The projection of the samples on the two main axes (Fig. 6c) indicates that all the control samples are found quite grouped on the right of the figure with the lowest Cd bioaccumulation and the lowest mRNA levels of HSP70, MT, CuZnSOD, CO1, CAT, and ABCB1. On the contrary, the cockles exposed to 50 $\mu\text{g/L}$ of CdCl_2 are found mostly on the left of the figure with the highest Cd bioaccumulation and the highest mRNA expression of the biomarkers cited above (Fig. 6c).

In the 5 mg/L analysis (Fig. 6b, d), 61.4 % of the total variance is explained by the two main axes represented in the figure. Strong positive correlations ($p < 0.05$, Table S4) are observed between Cd bioaccumulation, CAT, HSP70, MT, and CuZnSOD mRNA levels (Fig. 6b). This cluster is negatively correlated to MnSOD and CI while not correlated to CO1 and ABCB1 (Fig. 6b, Table S4). CO1 and ABCB1 are

however clearly correlated with each other (Fig. 6b, Table S4, $p < 0.05$). The projection of the samples on the two main axes (Fig. 6d) indicates that all the control samples are found quite grouped on the right of the figure with the lowest Cd bioaccumulation and the lowest mRNA levels of HSP70, MT, CuZnSOD, and CAT and the highest CI and mRNA levels of MnSOD. On the contrary, the cockles exposed to 5 mg/L of CdCl_2 are found mostly on the left of the figure with the highest Cd bioaccumulation and the highest mRNA expression of the biomarkers cited above (Fig. 6d). Two of the exposed samples are closely related to the CO1/ABCB1 cluster.

Discussion

The global physiological state of cockles was assessed along experiments by performing stress on stress tests and

measuring condition index. According to Bayne (1986), stress results in a reduced capacity of individuals to adapt to changes in their environment. This concept was applied in this study through the surimposition of exposure to air (a natural stressor) over the effect of Cd stress (stress on stress tests) (Viarengo et al. 1995). The LT50 data demonstrates that exposure to both concentrations of CdCl₂ significantly affects cockle survival time in air. Such trend probably reflects metabolic perturbations following CdCl₂ exposure and a decrease of anoxia tolerance in accordance with previous data obtained on bivalves (Viarengo et al. 1995; Hamza-Chaffai et al. 1998; Ladhar-Chaabouni et al. 2008). This may suggest a decreased general health status among cockles exposed to CdCl₂ and imply potential “trade-offs”, e.g., physiological allocations between detoxification and other processes linked to the survival of the organism, as previously described (Handy et al. 1999; Forbes 2000; Van Straalen and Hoffman 2000).

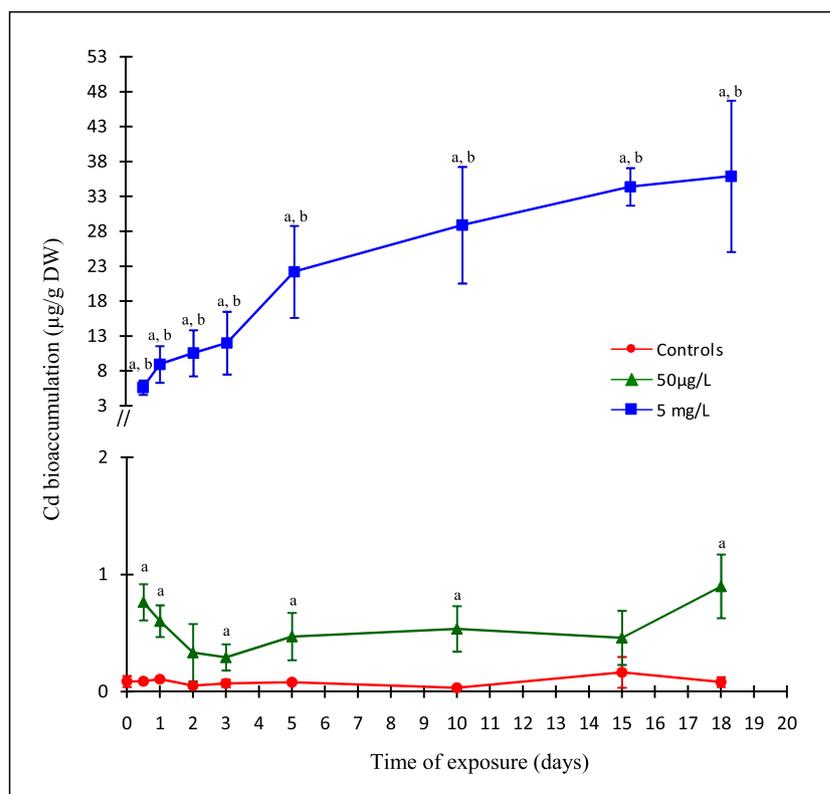
Measures of bivalve's condition based on weight are thought to be reliable indicators of the energetic health status and energy reserves in mollusks. Lannig et al. (2006) found significant variations in condition index in oysters (*Crassostrea virginica*) after 20 days of exposure to both CdCl₂ (50 µg/L) and temperature (28 °C). The results obtained in our study do not show any difference in the condition index between controls and exposed cockles. This finding probably highlights that this parameter is too much integrative and that only 18 days of

exposure might not be enough to perceive or to produce variations between exposed cockles and control ones.

Because bivalves are filter-feeding organisms able to accumulate high concentrations of metals (Paul-Pont et al. 2012), a dose-dependent Cd accumulation in treated cockles was an expected result. Moreover, our study indicates that at a high level of CdCl₂ exposure (5 mg/l), Cd accumulation is time-dependent. Ladhar-Chaabouni et al. (2008) also demonstrated in *Cerastoderma glaucum* that Cd accumulation was time- and dose-dependent for concentrations ranging from 50 to 150 µg/L, giving this species a great potential for long-term ecotoxicological studies. This bioaccumulation capacity of bivalves exposed to metallic contaminations was already highlighted in several species such as *Cerastoderma edule* (Paul-Pont et al. 2012), *Ruditapes decussatus* (Bebianno and Langston 1993; Smaoui-Damak et al. 2003, 2004), *Corbicula fluminea* (Legeay et al. 2005), and *Dreissena polymorpha* (Marie et al. 2006a, b). The present study adds the fact that *Cerastoderma glaucum* are particularly tolerant to higher cadmium concentration (5 mg/L) without exhibiting dramatic effects, indicating a strong resistance and the establishment of effective acclimation strategies.

The protection and/or detoxification processes probably settled by cockles may be studied at different levels and especially at the transcriptional level. Indeed, changes in gene expression are likely to play critical roles in acclimation of organisms (Schulte 2004). The aim of our study was to

Fig. 3 Cd bioaccumulation [µg/g (DW)] in cockles unexposed (controls) and exposed to 50 µg/L or to 5 mg/L. Data are expressed as means±SD (n=4). DW dry weight. Significant differences (p<0.05) are indicated with letters (a, b); statistical comparisons per time point between treated cockles and controls (a), and statistical comparisons per time point between cockles exposed to 50 µg/L and cockles exposed to 5 mg/L (b)



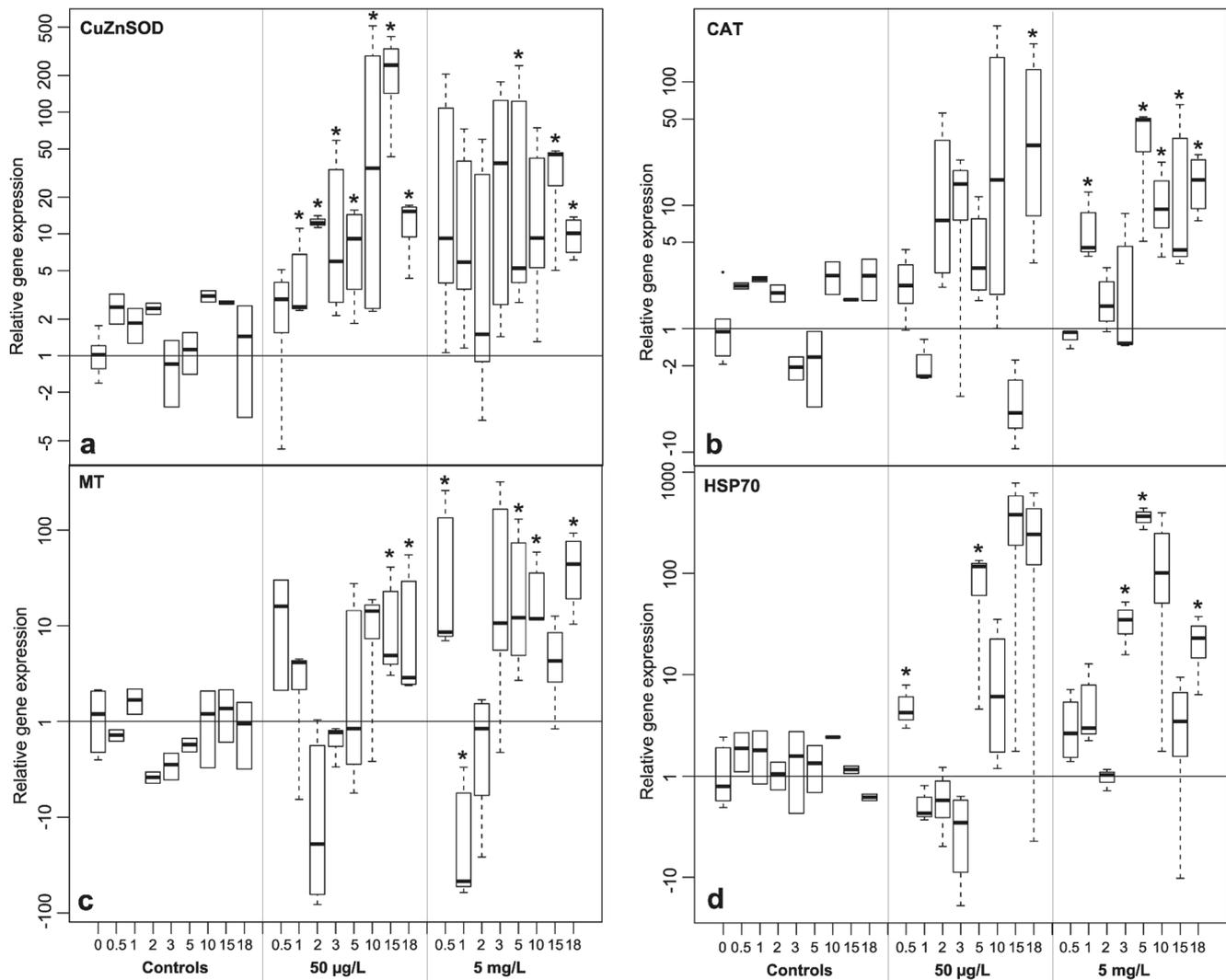


Fig. 4 Relative gene expression profiles for **a** CuZnSOD, **b** CAT, **c** MT, and **d** HSP70. Fold differences (log scale) are expressed relatively to controls at time 0. Significant differences from controls are indicated by an *asterisk* ($p < 0.05$, Kolmogorov-Smirnov test)

highlight modifications in mRNA expression of several genes involved in the tolerance to Cd exposure. Defense proteins involved in xenobiotic detoxification (MT, ABCB1), protection against oxidative stress (MnSOD, CuZnSOD, CAT), general stress (HSP70), and mitochondrial alterations (CO1) were chosen because their functions make them primary candidates for cellular protection against stress and because modifications of their gene expression had already been shown in invertebrates (Achard-Joris et al. 2006; Ivanina et al. 2008a, b; Navarro et al. 2011; Al Kaddissi et al. 2012).

A relatively low variation is observed in gene transcription along the experiment in control cockles indicating that mRNA expression is not affected by the experimental procedure. A high variability of gene transcription is observed for all target genes in exposed cockle biological variability that reflects the natural genotypic and phenotypic variation among individuals (Bustin 2010), but the much higher variability observed in

exposed individuals suggests the existence of different types of response among individuals exposed to the same contaminant. Elements confirming this hypothesis may be found with the projections of individuals into the PCAs (Fig. 6c, d). For both concentrations of CdCl₂, control individuals are found quite grouped, while exposed individuals are more scattered, some even found close to the controls (Fig. 6c, d).

Exposure to 50 µg/L and 5 mg/L resulted in important variations in the mRNA expression of four genes (MT, HSP70, CAT, and CuZnSOD). A time-dependent increase of MT mRNA abundance is observed after exposure to the two levels of Cd toxicity. MT gene transcription is highly correlated to Cd accumulation in the cockles' tissues, meaning that individuals that accumulate the most Cd are also the ones with the highest MT mRNA levels. The MT isoform studied here is the MT1 that has been reported to be specific to Cd contamination (Gonzalez et al. 2006). The upregulation of this gene is

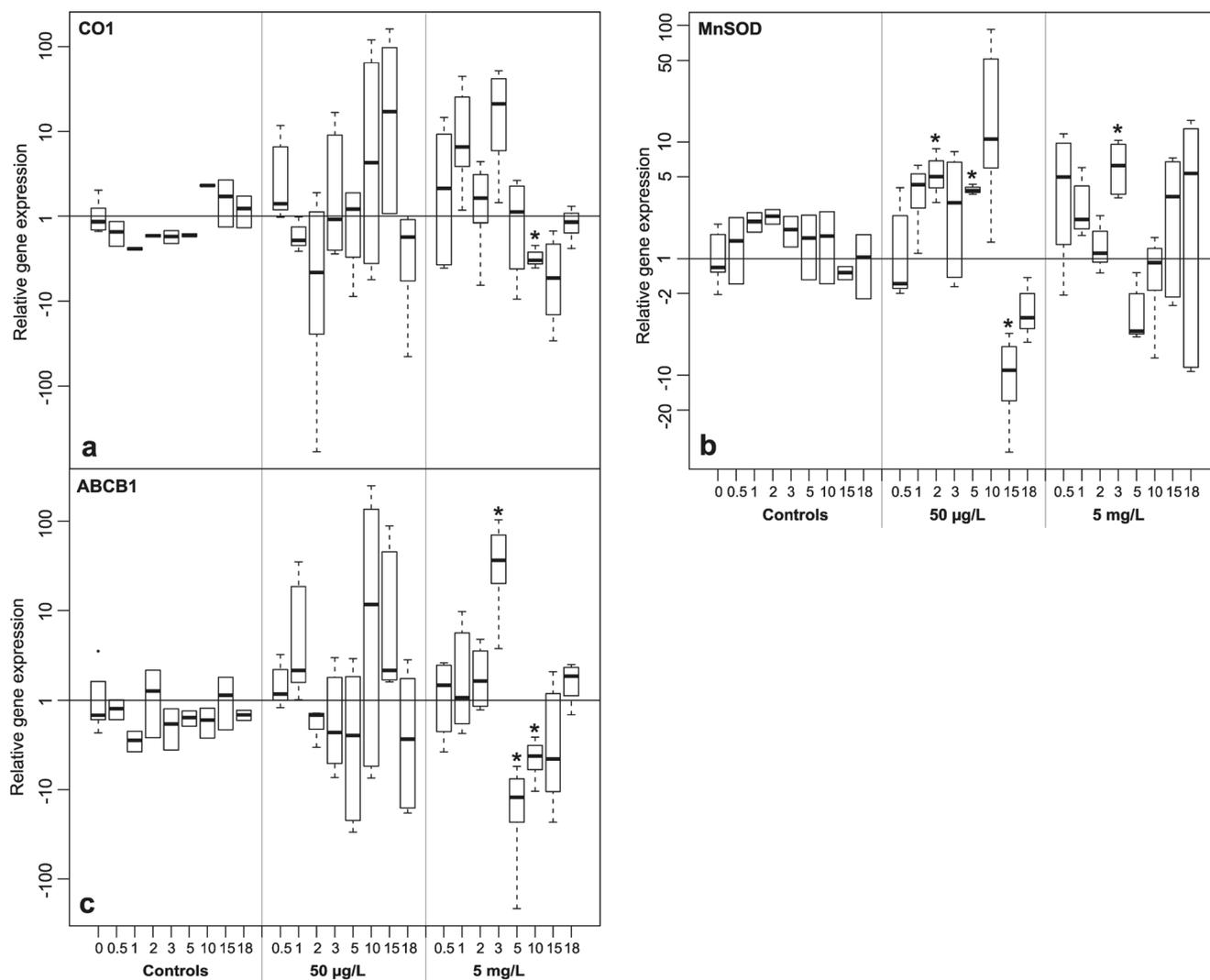


Fig. 5 Relative gene expression profiles for **a** CO1, **b** MnSOD, and **c** ABCB1. Fold differences (log scale) are expressed relatively to controls at time 0. Significant differences from controls are indicated by an *asterisk* ($p < 0.05$, Kolmogorov-Smirnov test)

in accordance with previous experiments performed with different invertebrates following metal exposure (Lecoeur et al. 2004; Dondero et al. 2005; Zorita et al. 2007; Navarro et al. 2011; Al Kaddissi et al. 2012). It may reflect the role of MTs in uptake and handling of metals, as well as antioxidants

reacting with free radicals and reactive oxygen species (ROS), preventing interactions with critical cellular components such as enzymes, structural proteins, DNA, and membrane lipids (Andrews 2000; Amiard et al. 2006). The response of HSP70 is quite similar to that of MT after CdCl₂ exposure and also

Table 1 Influence of treatment and of exposure time on relative gene expression for each Cd treatment versus control samples: sense of the effect and significance level

		CuZnSOD	CAT	MT	HSP70	CO1	MnSOD	ABCB1
50 µg/L Cd	Influence of treatment	+ ^a ***	+*	+*	+*	/	/	/
	Influence of exposure time	+**	/	+**	+***	/	-***	/
5 mg/L Cd	Influence of treatment	+***	+***	+***	+***	/	/	/
	Influence of exposure time	/	+***	+**	/	-***	/	/

^a global effect, + positive effect (increased expression), - negative effect (decreased expression), / no significant effect ($p > 0.05$)

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

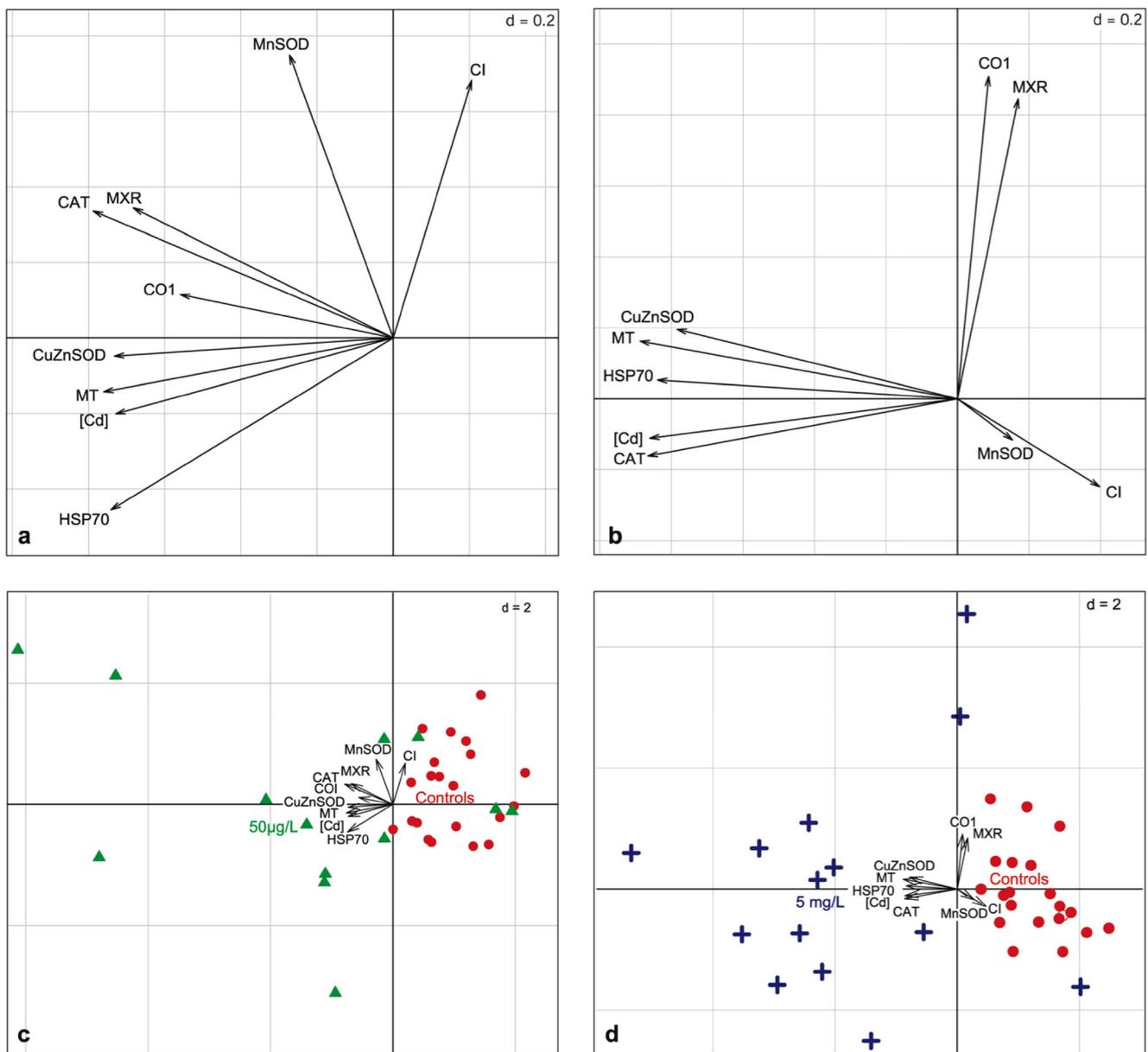


Fig. 6 Principal component analysis (PCA) on gene expressions, Cd bioaccumulation, and CI. **a** PCA performed on controls and cockles exposed to 50 µg/L of Cd. **b** PCA performed on controls and cockles exposed to 5 mg/L of Cd. **c** Projections of samples according to the

different quantitative data presented in **a**. **d** Projections of samples according to the different quantitative data presented in **b**. CI condition index, [Cd] Cd bioaccumulation in cockles. Red circles indicate control samples, green triangles indicate 50 µg/L, and blue cross indicate 5 mg/L

highly correlated to Cd accumulation in tissues. Some studies have shown that HSP70s are synthesized intensively in the cell in response to a variety of harmful stimuli, including heat, heavy metals (Pb^{2+} , Cd^{2+}), organic contaminants, injuries, diseases, and other stressors (Singer et al. 2005). Navarro et al. (2011) and Ivanina et al. (2008a) also showed a strong increase in the response of this gene after Cd exposure in *D. polymorpha* and in *Crassostrea virginica*, respectively. HSP70 are involved in folding/refolding of newly synthesized and damaged proteins as well as in sequestering and

degradation of proteins that are damaged beyond repair (Mayer and Bukau 2005). A strong upregulation of its gene (reaching +379 and +366 fold the mean expression level of controls for 50 µg/L and 5 mg/L of $CdCl_2$, respectively) reflects a mechanism highly settled to protect cells against stress-induced damage. However, variations in expression of genes coding for MT and HSP70 were not completely linear (with a decrease in gene transcription following the first increase), reflecting a potential time-lag between gene and protein regulation. Analyses

of protein concentrations would be particularly useful to give complementary data and to disentangle more precisely the regulation.

Several investigations have shown that Cd can indirectly promote oxidative stress in cells. This metal can bind to antioxidants or to their substrates. Consequently, impairment of the defense mechanism against ROS leads to an increase in ROS concentration (Wang et al. 2004; Cao et al. 2010). This fact could explain the increase in gene transcription of the antioxidant enzymes CAT and CuZnSOD following high and low CdCl₂ exposure and their correlation to Cd accumulation in tissues. CuZnSOD (the cytosolic form of SODs) is known to catalyze the dismutation of superoxide anion into hydrogen peroxide, which is in turn reduced by CAT into water and molecular oxygen. The increase of these antioxidant enzymes in response to Cd exposure constitutes an adaptation in gills to prevent and repair metal-induced damage in cellular component (Fernandez et al. 2010). Similar results were reported for the clam larvae *Meretrix meretrix*; the SOD and CAT activities increased after exposure to 25 µg/L of Cd (Wang et al. 2010). Jo et al. (2008) also found that SOD and CAT mRNA expression levels increased significantly after 24 h of exposure to 0.1 ppm of Cd in the oyster *Crassostrea gigas*. In our study, the expression of MnSOD (the mitochondrial form of SODs) is not influenced by the CdCl₂ treatment whatever its concentration and reflects natural physiological differences between cockles rather than a response to Cd. It can also be explained by the presence of sufficient basal concentration of antioxidant enzymes to protect cockles against oxidative stress.

Earlier studies have shown that energy misbalance is implicated in Cd-induced stress and toxicity in aquatic organisms, especially mitochondrial dysfunctions that lead to impaired ATP production, reduced aerobic capacity, and elevated oxidative stress (Sokolova et al. 2005; Cherkasov et al. 2007). As part of the mitochondrial respiratory chain, CO1 expression may be an interesting biomarker of the metabolic activity. Results showed that the CO1 mRNA expression is correlated to Cd accumulation at the concentration of 50 µg/L of CdCl₂ with however no clear pattern along the 18 days of the experiment (an increase in expression might be observed but not significant). At the concentration of 5 mg/L of CdCl₂, no correlation between CO1 expression and Cd accumulation was observed, and a downregulation of this gene along the experiment is even observed. The expression of CO1 thus appears to be modulated by the level of Cd concentration. Lerebours et al. (2010) previously stated that the intensity of gene response may not correlate positively with toxicant concentrations and that different gene expression patterns are expected for different concentrations of exposure. This is in concordance with our findings and tends to indicate that a modification in the metabolism might occur. Low concentration of Cd exposure tends to increase the level of CO1 mRNA and thus the mitochondrial metabolism. This could be a

cellular strategy (1) to compensate for the decrease in the number of functional mitochondria by increasing ATP production, so as to provide enough energy for cellular needs, especially to tolerate Cd (Al Kaddissi et al. 2012), and (2) to efficiently consume O₂ to limit Cd-induced oxidative damage in cells (Wang et al. 2004). It has to be noted that the transcription level of CO1 correlated well with those of CuZnSOD and CAT. Achard-Joris et al. (2006) found the same upregulation of the CO1 gene in three mollusk species following high Cd exposure. In contrast, in our study, exposure to the high concentration of CdCl₂ (5 mg/L) led to a progressive decrease of the CO1 mRNA content, reflecting a potential decrease in the metabolic activity. This result tends to indicate a strong disturbance of cellular energy balance, with individuals no more able to compensate for the probable inhibition of the mitochondria function. Negative impacts on physiological performances and survival of organisms are expected (Sokolova and Lanning 2008). This is partially observed with the mortality rate higher in the 5 mg/L tank compared to the others and the LT₅₀ (stress on stress) lower in this condition. Cases of repression/decrease of CO1 mRNA/activity were also recorded in the crayfish *Procambarus clarkii* and in *Crassostrea gigas* after acute and medium-term Cd exposure (Ivanina et al. 2008b; Al Kaddissi et al. 2012).

The ATP-binding cassette xenobiotic transporter ABCB1 gene transcription is significantly correlated to Cd accumulation at the concentration of 50 µg/L of CdCl₂ but not at the concentration of 5 mg/L. However, it does not exhibit a clear pattern along the experiments. This protein, which acts by transporting toxic compounds out of the cell (Minier et al. 2006), seems to be an actor of the response to the medium exposure to CdCl₂ (50 µg/L), but a strong variability in expression between individuals reduces the power of this biomarker.

In conclusion, the physiological trend detected in *Cerastoderma glaucum* exposed to low and high concentration of CdCl₂ suggests a general decreased health status along the experiment. Gene transcription monitoring performed on seven genes potentially involved in the tolerance to Cd exposure showed that MT, HSP70, CuZnSOD, and CAT are relevant biomarkers of Cd exposure because of (1) their relative gene transcription higher in exposed individuals compared to controls and (2) their significant correlation to Cd accumulation. The upregulation of these genes indicates that Cd detoxification is promoted as well as protection against free radicals and intracellular oxidative damage. Following the mRNA expression of CO1 and ABCB1 gives complementary information on the status of exposed individuals, in particular their metabolic activity, but these biomarkers do not seem to be relevant with a chronic exposure. The molecular mechanisms underlined in this study imply energetic costs and therefore might explain the reduced tolerance of cockles to anoxia

(stress on stress). The influence of contaminants other than metals of the environment from which the cockles were harvested as well as the influence of the experiment itself should however not be discarded. The tools developed may be useful both for future control strategies and for the use of the cockle *Cerastoderma glaucum* as a sentinel species. However, future investigations should be performed to validate these biomarkers in field conditions. Moreover, parallel biochemical, physiological, immunological, and morphological/pathological data should complement this study to better assess Cd toxicity and its mechanism of action.

Acknowledgments This research was supported by the European Program FP7 PEOPLE-IRSES GENERA (use of genomic and proteomic tools for the development of contaminant-specific biomarkers for the environmental risk assessment of aquatic ecosystems).

References

- Achard-Joris M, Gonzalez P, Marie V, Baudrimont M, Bourdineaud JP (2006) Cytochrome c oxidase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *Biometals* 19:237–244
- Al Kaddissi S, Legeay A, Elia AC, Gonzalez P, Floriani M, Cavalie I, Massabuau JC, Gilbin R, Simon O (2012) Mitochondrial gene expression, antioxidant responses, and histopathology after cadmium exposure. *Environ Toxicol*. doi:10.1002/tox.21817
- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76:160–202
- Andrews GK (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* 59:95–104
- Barhoumi S, Messaoudi I, Deli T, Said K, Kerkeni A (2009) Cadmium bioaccumulation in three benthic fish species, *Salaria basilisca*, *Zosterisessor ophiocephalus* and *Solea vulgaris* collected from the Gulf of Gabes in Tunisia. *J Environ Sci* 21:980–984
- Bayne BL (1986) Measuring the effects of pollution at the cellular and organism level. In: Kulleberg G (ed) *The role of the oceans as a waste disposal option*. Springer, Netherlands, pp 617–634
- Bebiano MJ, Langston WJ (1993) Turnover rate of metallothionein and cadmium in *Mytilus edulis*. *Biometals* 6:239–244
- Belabed W, Kestali N, Semsari S, Gaid A (1994) Toxicity study of some heavy metals with daphnia test. *Tech Sci Methods* 6:331–336
- Bigot A, Doyen P, Vasseur P, Rodius F (2009) Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:382–387
- Blackmore G (1998) An overview of trace metal pollution in the coastal waters of Hong Kong. *Sci Total Environ* 214:21–48
- Brooks BW, Stanley JK, White JC, Tumer PK, Wu KB, La Point TW (2004) Laboratory and field responses to cadmium: an experimental study in effluent-dominated stream mesocosms. *Environ Toxicol Chem* 23:1057–1064
- Bustin SA (2010) Why the need for qPCR publication guidelines?—The case for MIQE. *Methods* 50:217–226
- Cao L, Huang W, Liu J, Yin X, Dou S (2010) Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 151:386–392
- Cheggour M, Chafik A, Langston WJ, Burt GR, Benbrahim S, Texier H (2001) Metals in sediments and the edible cockle *Cerastoderma edule* from two Moroccan Atlantic lagoons: Moulay Bou Selham and Sidi Moussa. *Environ Pollut* 115:149–160
- Cherkasov AA, Overton RA, Sokolov EP, Sokolova IM (2007) Temperature-dependent effects of cadmium and purine nucleotides on mitochondrial aconitase from a marine ectotherm, *Crassostrea virginica*: a role of temperature in oxidative stress and allosteric enzyme regulation. *J Exp Biol* 210:46–55
- Choi CY, An KW, Nelson ER, Habibi HR (2007) Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Carassius auratus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 145:595–600
- Cupit M, Larsson O, de Meeus C, Eduljee GH, Hutton M (2002) Assessment and management of risks arising from exposure to cadmium in fertilisers—II. *Sci Total Environ* 291:189–206
- Derbali A, El Hasni K, Jarboui O, Ghorbel M (2012) Distribution, abundance and biological parameters of *Cerastoderma glaucum* (Mollusca: Bivalvia) along the Gabes coasts (Tunisia, Central Mediterranean). *Acta Adriat* 53(3):363–374
- Dondero F, Piacentini L, Banni M, Rebelo M, Burlando B, Viarengo A (2005) Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene* 345:259–270
- Fernandez B, Campillo JA, Martinez-Gomez C, Benedicto J (2010) Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. *Aquat Toxicol* 99:186–197
- Forbes VE (2000) Is hormesis an evolutionary expectation? *Funct Ecol* 14:12–24
- Geffard O, Budzinski H, Augagneur S, Seaman M, His E (2001) Assessment of sediment contamination by spermotoxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*). *Environ Toxicol Chem* 20(7):1605–1611
- Geffard O, Sartelet H, Garric J, Biagianti-Risbourg S, Delahaut L, Geffard O (2010) Subcellular compartmentalization of cadmium, nickel, and lead in *Gammarus fossarum*: comparison of methods. *Chemosphere* 78:822–829
- Gonzalez P, Baudrimont M, Boudou A, Bourdineaud JP (2006) Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Biometals* 19:225–235
- Hamza-Chaffai A, Romeo M, Gnassia-Barelli M, El Abed A (1998) Effect of copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussatus*. *Bull Environ Contam Toxicol* 61:397–404
- Hamza-Chaffai A, Pellerin J, Amiard JC (2003) Health assessment of a marine bivalve *Ruditapes decussatus* from the Gulf of Gabes (Tunisia). *Environ Int* 28:609–617
- Handy RD, Sims DW, Giles A, Campbell HA, Musonda MM (1999) Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquat Toxicol* 47:23–41
- Henry M, Huang W, Cornet C, Belluau M, Durbec JP (1984) Accidental contamination by cadmium of the mollusc *Ruditapes deeussatus*: bioaccumulation and toxicity (LD 50, 96 H). *Oceanol Acta* 7(3):329–336
- Inza B, Ribeyre F, Maury-Brachet R, Boudou A (1997) Tissue distribution of inorganic mercury, methylmercury and cadmium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to the contamination levels of the water column and sediment. *Chemosphere* 35:2817–2836
- Ivanina AV, Cherkasov AS, Sokolova IM (2008a) Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *J Exp Biol* 211:577–586
- Ivanina AV, Habinck E, Sokolova IM (2008b) Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 148:72–79

- Jo PG, Choi YK, Choi CY (2008) Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147:460–469
- Kessabi K, Navarro A, Casado M, Said K, Messaoudi I, Pina B (2010) Evaluation of environmental impact on natural populations of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* by quantitative RNA biomarkers. *Mar Environ Res* 70:327–333
- Ladhar-Chaabouni R, Mokdad-Gargouri R, Denis F, Hamza-Chaffai A (2008) Cloning and characterization of cDNA probes for the analysis of metallothionein gene expression in the Mediterranean bivalves: *Ruditapes decussatus* and *Cerastoderma glaucum*. *Mol Biol Rep* 36:1007–1014
- Lannig G, Flores JF, Sokolova IM (2006) Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquat Toxicol* 79:278–287
- Lecoeur S, Videmann B, Bery P (2004) Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environ Res* 94:184–191
- Legeay A, Achard-Joris M, Baudrimont M, Massabuau JC, Bourdineaud JP (2005) Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Aquat Toxicol* 74:242–253
- Lerebours A, Adam-Guillermin C, Brêthes D, Frelon S, Floriani M, Camilleri V, Garnier-Laplace J, Bourdineaud J-P (2010) Mitochondrial energetic metabolism perturbations in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium. *Aquat Toxicol* 100:66–74
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25:402–408
- Lobel PB, Bajdik CD, Belkhole SP, Jackson SE, Longrich HP (1991) Improved protocol for collecting mussel watch specimens taking into account sex, size, condition, shell shape, and chronological age. *Arch Environ Contam Toxicol* 21:409–414
- Lumley T, Therneau T (2003) The survival package. The Comprehensive R Archive Network
- Machreki-Ajmi M, Hamza-Chaffai A (2006) Accumulation of cadmium and lead in *Cerastoderma glaucum* originating from the Gulf of Gabes, Tunisia. *Bull Environ Contam Toxicol* 76:529–537
- Machreki-Ajmi M, Hamza-Chaffai A (2008) Assessment of sediment/water contamination by in vivo transplantation of the cockles *Cerastoderma glaucum* from a non contaminated to a contaminated area by cadmium. *Ecotoxicology* 17:802–810
- 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
- Marie V, Baudrimont M, Boudou A (2006a) 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
- Marie V, Gonzalez P, Baudrimont M, Bourdineaud JP, Boudou A (2006b) Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *Biometals* 19:399–407
- Marigomez I, Soto M, Cajaraville MP, Angulo E, Giamberini L (2002) Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc Res Tech* 56:358–392
- Marin MG, Rigato S, Ricciardi F, Matozzo V (2008) Lethal and estrogenic effects of 4-nonylphenol in the cockle *Cerastoderma glaucum*. *Mar Pollut Bull* 57:552–558
- Matozzo V, Rova G, Marin MG (2007) Haemocytes of the cockle *Cerastoderma glaucum*: morphological characterisation and involvement in immune responses. *Fish Shellfish Immunol* 23:732–746
- Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62:670–684
- Minier C, Abamou A, Jaouen-Madoulet A, Le Guellec AM, Tutundjian R, Bocquene G, Le Boulenger F (2006) A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environ Toxicol Chem* 25:112–119
- Mirbahai L, Chipman JK (2014) Epigenetic memory of environmental organisms: a reflection of lifetime stressor exposures. *Mutat Res* 13:157–171
- Navarro A, Faria M, Barata C, Pina B (2011) Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ Pollut* 159:100–107
- Paul-Pont I, Gonzalez P, Baudrimont M, Jude F, Raymond N, Bourrasseau L, Le Goïc N, Haynes F, Legeay A, Paillard C, de Montaudouin X (2010a) Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the marine bivalve *Cerastoderma edule*. *Mar Pollut Bull* 60(4):515–525
- Paul-Pont I, Gonzalez P, Baudrimont M, Nili H, de Montaudouin X (2010b) Short-term metallothionein inductions in the edible cockle *Cerastoderma edule* after cadmium or mercury exposure: discrepancy between mRNA and protein responses. *Aquat Toxicol* 97:260–267
- Paul-Pont I, Gonzalez P, Montero N, de Montaudouin X, Baudrimont M (2012) Cloning, characterization and gene expression of a metallothionein isoform in the edible cockle *Cerastoderma edule* after cadmium or mercury exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 75:119–126
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26:509–515
- Pinot F, Kreps SE, Bachelet M, Hainaut P, Bakonyi M, Polla BS (2000) Cadmium in the environment: sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. *Rev Environ Health* 15:299–323
- Sanni B, Williams K, Sokolov EP, Sokolova IM (2008) Effects of acclimation temperature and cadmium exposure on mitochondrial aconitase and LON protease from a model marine ectotherm, *Crassostrea virginica*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147:101–112
- Schulte PM (2001) Environmental adaptations as windows on molecular evolution. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 128:597–611
- Schulte PM (2004) Changes in gene expression as biochemical adaptations to environmental change: a tribute to Peter Hochachka. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 139:519–529
- Serafim A, Bebianno MJ (2007) Kinetic model of cadmium accumulation and elimination and metallothionein response in *Ruditapes decussatus*. *Environ Toxicol Chem* 26:960–969
- Singer C, Zimmermann S, Sures B (2005) Induction of heat shock proteins (hsp70) in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to platinum group metals (platinum, palladium and rhodium): comparison with lead and cadmium exposures. *Aquat Toxicol* 75:65–75
- Smaoui-Damak W, Hamza-Chaffai A, Berthet B, Amiard JC (2003) Preliminary study of the clam *Ruditapes decussatus* exposed in situ to metal contamination and originating from the Gulf of Gabes, Tunisia. *Bull Environ Contam Toxicol* 71:961–970
- Smaoui-Damak W, Hamza-Chaffai A, Bebianno MJ, Amiard JC (2004) Variation of metallothioneins in gills of the clam *Ruditapes decussatus* from the Gulf of Gabes (Tunisia). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 139:181–188
- Sokolova IM, Lanning G (2008) Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Res* 37:181–201
- Sokolova IM, Sokolov EP, Ponnappa KM (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

- Steiner S, Anderson NL (2000) Expression profiling in toxicology: potentials and limitations. *Toxicol Lett* 112–113:467–471
- Szefer P, Wolowicz M, Kusak A, Deslous-Paoli J, Czarnowski W, Frelek K, Belzunce M (1999) Distribution of mercury and other trace metals in the cockle *Cerastoderma glaucum* from the Mediterranean Lagoon Etang de Thau. *Arch Environ Contam Toxicol* 36:56–63
- Van Straalen NM, Hoffman AA (2000) Review of experimental evidence for physiological costs of tolerance to toxicants. In: Kammenga J, Laskowski R (eds) *Demography in Ecotoxicology*. John Wiley & Sons, pp 147–161
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Mancinelli G, Accomando A, Smaalb AC, Orunesu M (1995) Stress on stress response: a simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Mar Environ Res* 39:245–248
- Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36:1434–1443
- Wang L, Song L, Ni D, Zhang H, Liu W (2009) Alteration of metallothionein mRNA in bay scallop *Argopecten irradians* under cadmium exposure and bacteria challenge. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 149:50–57
- Wang Q, Wang X, Yang H, Liu B (2010) Analysis of metallothionein expression and antioxidant enzyme activities in *Meretrix meretrix* larvae under sublethal cadmium exposure. *Aquat Toxicol* 100:321–328
- Zhang L, Liu X, Zhou D, Yu J, Zhao J, Wu H (2011) Toxicological effects induced by cadmium in gills of Manila clam *Ruditapes philippinarum* using NMR-based metabolomics. *Clean Soil Air Water* 39:989–995
- Zhao L, Zhang Y, Liang J, Xu X, Wang H, Yang F, Yan X (2014) Environmental cadmium exposure impacts physiological responses in Manila clams. *Biol Trace Elem Res* 159:241–253
- Zhu B, Gao KS, Wang KJ, Ke CH, Huang HQ (2012) Gonad differential proteins revealed with proteomics in oyster (*Saccostrea cucullata*) using alga as food contaminated with cadmium. *Chemosphere* 87:397–403
- Zorita I, Bilbao E, Schad A, Cancio I, Soto M, Cajaraville MP (2007) Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by in situ hybridization and RT-PCR. *Toxicol Appl Pharmacol* 220:186–196

**Article2 : publié dans
Environnemental Science and
Pollution Research**

**Transcriptional response of stress-regulated
genes to industrial effluent exposure in the
cockle *Cerastoderma glaucum***

**Sahar Karray, Emmanuelle Tastard, Brigitte Moreau,
Laurence Delahaut, Alain Geffard, Emmanuel Guillon,
Françoise Denis, Amel Hamza-Chaffai, Benoît Chénais
and Justine Marchand**

*Transcriptional response of stress-regulated genes to industrial effluent exposure in the cockle *Cerastoderma glaucum**

**Sahar Karray, Emmanuelle Tastard,
Brigitte Moreau, Laurence Delahaut,
Alain Geffard, Emmanuel Guillon,
Françoise Denis, et al.**

**Environmental Science and Pollution
Research**

ISSN 0944-1344

Environ Sci Pollut Res
DOI 10.1007/s11356-015-4108-4



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Transcriptional response of stress-regulated genes to industrial effluent exposure in the cockle *Cerastoderma glaucum*

Sahar Karray · Emmanuelle Tastard · Brigitte Moreau · Laurence Delahaut · Alain Geffard · Emmanuel Guillon · Françoise Denis · Amel Hamza-Chaffai · Benoît Chénais · Justine Marchand

Received: 15 August 2014 / Accepted: 11 January 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract This study assessed the responses of molecular biomarkers and heavy metal levels in *Cerastoderma glaucum* exposed for 1 week to two industrial effluents (1 %) discharged into the Tunisian coastal area, F₁ and F₂, produced by different units of production of a phosphate treatment plant. A significant uptake of metals (Cd, Cu, Zn, and Ni) was observed in exposed cockles compared to controls, with an uptake higher for F₁ than for F₂. A decrease in LT50 (stress on stress test) was also observed after an exposure to the effluent

F₁. Treatments resulted in different patterns of messenger RNA (mRNA) expression of the different genes tested in this report. Gene transcription monitoring performed on seven genes potentially involved in the tolerance to metal exposure showed that for both exposures, mechanisms are rapidly and synchronically settled down to prevent damage to cellular components, by (1) handling and exporting out metal ions through the up-regulation of ATP-binding cassette xenobiotic transporter (ABCB1) and metallothionein (MT), (2) increasing the mRNA expression of antioxidant enzymes (catalase (CAT), superoxide dismutases, CuZnSOD and MnSOD), (3) protecting and/or repairing proteins through the expression of heat shock protein 70 (HSP70) mRNAs, and (4) increasing ATP production (through the up-regulation of cytochrome c oxidase 1 (CO1)) to provide energy for cells to tolerate stress exposure. The tools developed may be useful both for future control strategies and for the use of the cockle *C. glaucum* as a sentinel species.

Responsible editor: Philippe Garrigues

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11356-015-4108-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Karray · E. Tastard · B. Moreau · F. Denis · B. Chénais · J. Marchand (✉)
EA 2460 Mer Molécules Santé, Institut Universitaire Mer et Littoral - FR3473 CNRS, Université du Maine - Le Mans, 72085 Le Mans Cedex, France
e-mail: justine.marchand@univ-lemans.fr

S. Karray · A. Hamza-Chaffai
Laboratoire d'Ecotoxicologie Marine et Environnementale, Université de Sfax, Sfax, Tunisia

L. Delahaut · A. Geffard
UMR-I 02 Stress Environnementaux et Biosurveillance des Milieux aquatiques (SEBIO), Université de Reims Champagne-Ardenne, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

E. Guillon
UMR 7312 CNRS-URCA Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR) Groupe Chimie de Coordination, Université de Reims Champagne-Ardenne, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

F. Denis
UMR 7208 CNRS-MNHN-IRD-UPMC, Biologie des Organismes et des Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), Concarneau, France

Keywords *Cerastoderma glaucum* · Industrial effluent · Gene expression · qPCR · Heavy metals · Phosphate treatment plant

Introduction

With the rapid development of modern industry, various contaminants have been discharged into marine environments and have caused instability and disorder of ecosystems (Cong et al. 2012; Ladhari-Chaabouni et al. 2012). Among these contaminants, effluents are continuously discharged from municipal and industrial treatment plants and have progressively affected more and more ecosystems (Jadeja and Tewari 2007). Treated or not, these effluents can release many

pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons, pharmaceuticals, and heavy metals (Sim et al. 2013). The latter are deemed to be serious pollutants because of their toxicity, persistence, and non-degradability in the environment (Gargouri et al. 2011). In general, exposure to effluents is known to cause a variety of stress-related changes in aquatic organism health such as immunotoxicity (Gagne et al. 2008; Salo et al. 2007), neurotoxicity and oxidative stress (Kamel et al. 2012), and physiological alterations (Douxflis et al. 2007). The impact of effluents on marine environments is often assessed by the measurement of pollutant body burdens in marine organisms (Haynes et al. 1997). This assessment can be done by passive biomonitoring (sampling organisms living in the investigated area) or by active biomonitoring (transplantation of organisms or laboratory experiments). However, laboratory experiences remain an alternative approach to evaluate the potential toxicity effects of a mixture of pollutants (effluents) to aquatic organisms. Using this methodology, it is possible to quantify the effects of contaminant in controlled conditions with precision. In Tunisia, the gulf of Gabès (localized on the southeastern coast) is influenced by an important industrial activity, especially a phosphate treatment plant (SIAPE: Société des Industries d'Acide Phosphoriques et d'Engrais), exposing coastal waters and marine organisms to increasing contamination (Ladhar-Chaabouni et al. 2009a). The main activity of this industry is the transformation of the crude phosphate to fertilizers. This activity generates wastewaters (effluent) rich in sulfate, fluoride, phosphorus, and heavy metals that will be discharged in the marine environment. Consequently, marine ecosystems around the crude phosphate treatment plant have been completely destroyed, and high levels of toxic metals were observed in the sediment and in bivalve species (Javied et al. 2009; Ketata et al. 2007; Mar and Okazaki 2012; Tayibi et al. 2009). *Cerastoderma glaucum* is one of the bivalves widely distributed in the gulf of Gabès, and this species has been validated as a bioindicator organism reflecting the pollution state of the Tunisian coast (Machreki-Ajmi and Hamza-Chaffai 2006; Szefer et al. 1999). This sedentary and filter-feeding organism lives in the superficial sediment and is known to be suitable for toxicology and risk assessment studies in the field (Ladhar-Chaabouni et al. 2009a; Machreki-Ajmi and Hamza-Chaffai 2006, 2008) or in laboratory experiments (Ladhar-Chaabouni et al. 2009b, c). Cockles are major preys for diverse animal groups such as crustaceans, fishes, and wading birds (Paul-Pont et al. 2010), and they may also contribute to reduce the particulate organic load (Derbali et al. 2012). Beyond these ecological roles, they are also commercially important resources (Paul-Pont et al. 2010). Studies carried out on this species typically focused on biochemical parameters (metal bioaccumulation and biomarker measures). In addition, experiments performed were usually conducted using a single contaminant (e.g., cadmium) (Ladhar-Chaabouni et al. 2009b, c).

The originality of the present study consists of using molecular biomarkers to assess the response of cockles to a natural mixture of contaminants (effluent) of the gulf of Gabès. Given that the initial interaction between contaminant and aquatic organisms occurs at the cellular level, the molecular level is suitable for the early and sensitive detection of contaminant exposure and may allow the prediction of biological effects at higher biological organization levels. Moreover, changes in gene expression are likely to play critical roles in acclimation and/or adaptation of organisms (Schulte 2004).

The purpose of this study was therefore to investigate the responses of cockles' *C. glaucum* exposed to two different effluents originated from the SIAPE of the gulf of Gabès, through the study of (1) metal bioaccumulation in cockles' tissues, (2) the global physiological state of organisms, (3) the responses at the transcriptional level of several key genes, and (4) the relationships between gene expression and metal contents. The messenger RNA (mRNA) transcripts used encode proteins involved in diverse pathways such as metal and xenobiotic detoxification (metallothionein, MT; ATP-binding cassette xenobiotic transporter, ABCB1), protection against oxidative stress (superoxide dismutases, MnSOD and CuZnSOD; catalase, CAT), general stress (heat shock protein 70, HSP70), and mitochondrial alterations (cytochrome c oxidase 1, CO1). All transcriptional responses were measured in gills because this organ constitutes a key interface for the uptake, storage, and excretion of metals and has a high capacity to synthesize proteins (Al Kaddissi et al. 2012; Marigomez et al. 2002; Navarro et al. 2011; Paul-Pont et al. 2010). In contrast to most mRNA analyses that are performed on sample pools (Ciacci et al. 2012; Navarro et al. 2009), the present report analyzes gene expression at the individual scale to highlight all the variability between cockles experiencing the same exposition.

Materials and methods

Animals and treatments

Cockles (*C. glaucum*) (28–32 mm) were collected in October from the “Luza” site (located 45 km in the north of Sfax, Tunisia; Fig. 1), which can be considered as a reference site with a low pollution level (Barhoumi et al. 2009; Kessabi et al. 2010). After a period of acclimation of 24 h, cockles were distributed in three polyethylene tanks (30×30×20 cm), each one containing a layer of autoclaved sediment and 6 l of aerated seawater. The first tank contained seawater from the reference site Luza (controls), the second tank contained seawater with the F₁ effluent, and the third tank contained seawater with the effluent F₂ (F₁ and F₂ effluents were collected at the exit of the SIAPE). Both F₁ and F₂ effluents were diluted to a final concentration of 1 % (sub-lethal concentration

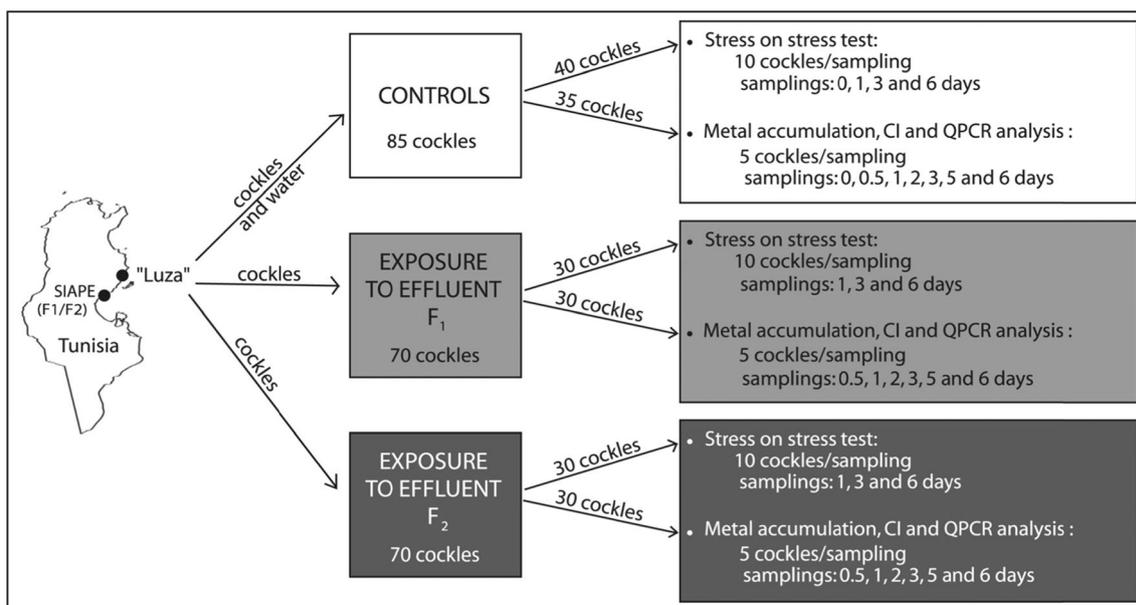


Fig. 1 Sampling and experimental exposure of cockles

determined following a preliminary set of toxicity experiments, pers. comm.). Seventy to eighty-five cockles were held in each tank (experimental design schematized in Fig. 1), and exposure time varied between 12 h and 6 days. During the experiment, effluents were renewed twice a week.

Stress on stress test

Ten animals of each of the three conditions of the experiment (controls, F₁ and F₂ groups) and at different times of exposure (after 0, 1, 3, and 6 days of exposure) were sampled and submitted to anoxia by air exposure at 15 °C (Fig. 1). For each sample, survival was assessed daily according to the method of Viarengo et al. (1995). Death symptoms were considered to be open valves and absence of muscular activity. Lethal time corresponding to 50 % of dead animals (LT₅₀) was measured and the results expressed in days for each condition and at the four different times of exposure (0, 1, 3, and 6 days).

Condition index of cockles

Condition index was calculated individually on five cockles at each sampling time (Fig. 1). Before dissection, all cockles were weighted (total and soft weight), and the condition index (CI) was expressed as a percentage of the ratio of fresh weight of soft tissues to total weight (Lobel et al. 1991).

Determination of metal contents

Heavy metal analyses (Cd, Cu, Ni, and Zn) were carried out (1) on effluent waters directly from the effluent sampling site and (2) individually on five cockles from the laboratory

experiment at each sampling time (Fig. 1) on the remaining animal tissues (including digestive gland, muscle, mantle, and foot). The determination of trace element concentration in effluent waters was performed using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-AOS, Thermo Scientific iCAP 6300 DUO), and measurement of metal concentrations in cockles was carried out as previously described (Dedourge-Geffard et al. 2009; Geffard et al. 2010) by flameless (Cd, Cu, and Ni) or flame (Zn) atomic absorption spectrophotometry with Zeeman correction, using a graphite furnace (SpectrAA Zeeman 220).

RNA extraction and cDNA synthesis

Gene transcription analyses were carried out individually on the same five individuals for which metal analyses and CI were measured and at each sampling time (Fig. 1). The gills of each sample were dissected, conserved in RNA later (Sigma-Aldrich), and stored at -20 °C. Total RNA was isolated from 100 mg of gills using Tri-Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined spectrophotometrically at 260 nm, and RNA quality was checked using the Experion system (Bio-Rad). Three micrograms of total RNA were added to dTRace primer (5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTT TTTTT-3') and nuclease free water in a final volume of 12.25 µl. A denaturation at 70 °C was carried out for 5 min and then the mixture was kept on ice. First strand complementary DNAs (cDNAs) were then synthesized using dTRace, dNTPs, MMLV reverse transcriptase (Promega), RNAsin (Promega), and nuclease-free water in a final volume of 25 µl for 90 min at 42 °C.

Real-time quantitative PCR

Real-time PCR reactions were performed using a Step One plus apparatus (Applied Biosystems) with Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers designed (Table S1 in Supplementary Data) on the basis of previously characterized sequences as described in details in [Supplementary Data](#). The best housekeeping gene was selected among four genes tested using the Bestkeeper Software (Pfaffl et al. 2004), and the relative expression was determined by the comparative Ct method (Livak and Schmittgen 2001) using control cockles at time 0 (T_0) as a calibrator (cf [Supplementary Data](#)).

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the R statistical Software version 2.14.1. In the stress on stress experiment, influence of metal concentration and exposure time on ability to survive under anoxia was analyzed using the SURVREG function (survival package, R). To test for significant differences between mRNA expression values, Kolmogorov-Smirnov tests were used ($p < 0.05$). After normalization of the data by $\log(x+1)$ transformation and stabilization of their variances by square root transformation, influences of effluent treatment and exposure time on mRNA expression, metal bioaccumulation, and CI were assessed by independent ANOVA significance tests. A principal component analysis (PCA) was performed for each treatment on mRNA expression, metal bioaccumulation, and CI, and correlations between all these variables were tested statistically using Pearson's test.

Results

Effects of effluents on the global physiological state

During the experiment, no mortality was recorded in the three groups of cockles. Survival under anoxia (i.e., stress on stress assay) is significantly affected by treatment ($p < 0.05$), with exposure causing a decrease in survival time in air relative to controls (significant for F_1 with $p < 0.05$ but not significant for F_2 ; Fig. 2). No difference in CI is observed with treatment (controls 11.7 ± 2.6 ; F_1 12.1 ± 1.9 ; F_2 13.3 ± 2.2) nor with time of exposure (data not shown).

Metal concentrations in F_1 and F_2 effluents and metal accumulation in cockles' tissues

As indicated in Table 1, heavy metal concentrations are higher in F_1 effluent than in F_2 : Cu (63-fold), Cd (29-fold), Cr (24-fold), Mn (13-fold), Ni (10-fold), Zn (6-fold), and Pb (5-fold).

The concentration of Cd, Cu, Zn, and Ni in cockles' soft tissues was also investigated during the time of the experiment (Fig. 3). Cd, Cu, Zn, and Ni concentrations (expressed with respect to dry weight) remain low and relatively constant in tissues of control cockles. Accumulation varied among metals; relative to their respective concentrations in the effluents, Cd was much less accumulated than the other metals (up to 100-fold). Their accumulation in treated cockles is dependent of the effluent treatment ($p < 0.05$), i.e., cockles exposed to F_1 accumulate more Cd, Cu, Ni, and Zn than those exposed to F_2 but only about 1.5-fold, except for Cd (about 24-fold). For Cu, Ni, and Zn, a similar bioaccumulation pattern is observed between cockles exposed to F_1 and F_2 . The bioaccumulation of Ni and Zn is not time dependent. On the contrary, Cu accumulation is time dependent for both effluent experiments, i.e., treated cockles accumulate Cu between 1 and 3 days (bioaccumulation higher in F_1 compared to F_2). A similar pattern is also observed for Cd (for F_1 only), with low variation during the two first days, followed by an increase in Cd concentration. This increase is quite moderate for F_2 , reaching 0.224 ± 0.106 $\mu\text{g/g}$ dry weight (DW) after 5 days of exposure, while strong for F_1 , with a maximum value of 6.181 ± 1.276 $\mu\text{g/g}$ DW after 6 days of exposure.

Effect of F_1 and F_2 effluent on relative gene expression

Relative expression of the seven stress-regulated genes with respect to the calibrator (controls at time 0) is represented as box plots in Figs. 4 and 5. In cockles exposed either to F_1 or to F_2 , mRNA expression was globally higher than in controls for all the studied genes. The variability (represented by quartiles in boxplots) is also significantly higher in exposed cockles than controls ($p < 0.001$, Fligner-Killeen test of homogeneity of variances; Figs. 4 and 5).

For MT, CO1, and HSP70, expression increased with exposure time quite linearly in cockles exposed to F_1 (Fig. 4; Table 2). In cockles exposed to F_2 , exposure time had no significant influence on mRNA expression for these genes. Despite fluctuations, the expression of ABCB1 is higher in treated cockles compared to controls, but exposure time has no significant influence on its expression whatever the effluent (Table 2). Concerning the enzymes involved in the response to oxidative stress (Fig. 5), mRNA expression increased with exposure time for MnSOD and CAT in cockles exposed to F_1 . In particular, the expression of these genes remained close to that of controls during the first two days of exposure and then expression increased strongly on the third day (+9- and +43-fold, the mean expression level of control samples for MnSOD and CAT, respectively) and remained high until the sixth day (Fig. 5). Exposure time has no significant influence on CuZnSOD mRNA expression (Fig. 5; Table 2). In cockles exposed to F_2 , on the contrary, the expression of the genes involved in response to oxidative

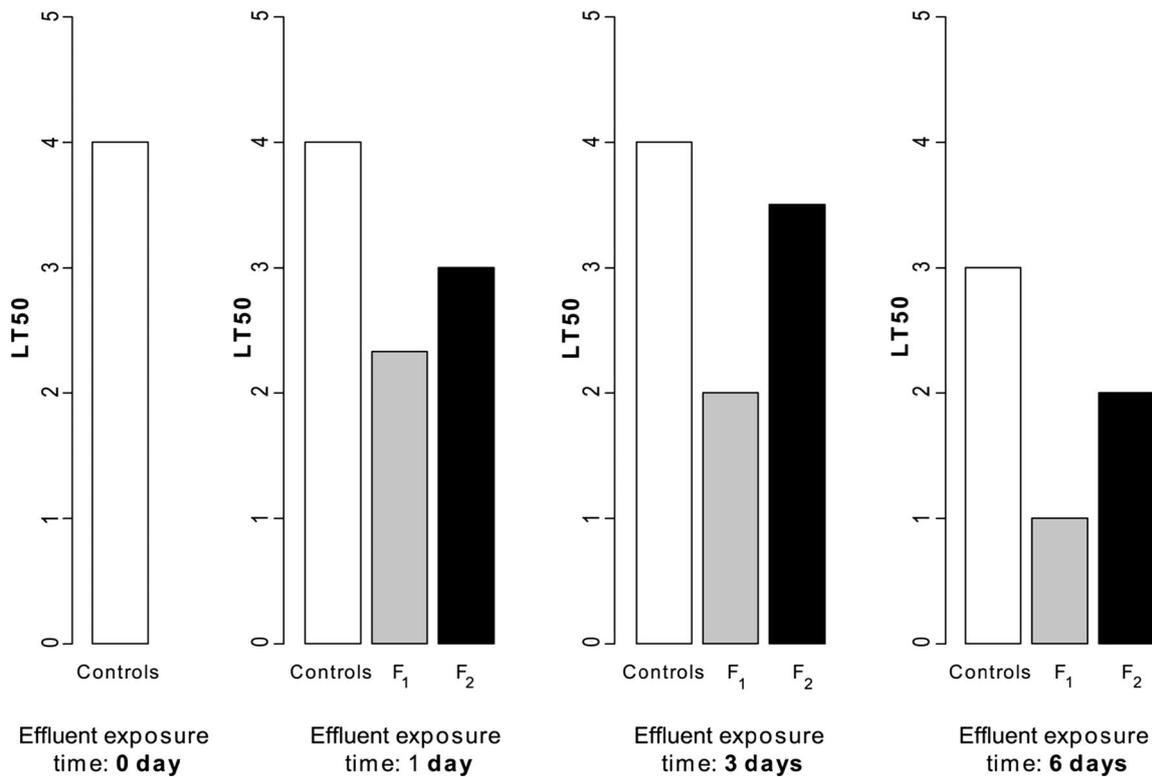


Fig. 2 Results from the stress on stress test. Some cockles were exposed to anoxia after 1, 3, or 6 days of exposure to effluents F₁ and F₂. Survival under anoxia was followed, and the median lethal time (LT50) was recorded (in days) for each combination of treatment and exposure time

stress (CAT, MnSOD, CuZnSOD) globally decreased with exposure time (Table 2). In details, the dynamics was the same for the three genes: expression increased during the first 24 h (+87-, +71-, and +58-fold, the mean expression level of control samples for CAT, MnSOD, and CuZnSOD, respectively) then decreased until the fifth day (-10-, -2-, and -3-fold for CAT, MnSOD, and CuZnSOD, respectively) (Fig. 5).

Principal component analyses (PCAs)

To highlight relationships between mRNA levels ($\Delta Ct = Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{HKG}}$), CI, and bioaccumulation of metals (Cd, Cu, Zn, and Ni), two different PCAs were carried out, one considering controls and cockles exposed to the effluent F₁ and the

other one considering controls and cockles exposed to the effluent F₂ (Fig. 6).

In the F₁ PCA analysis (Fig. 6a), 59.3 % of the total variance is explained by the two main axes. All parameters appear on the same side relative to the first axis (i.e., on the left of the factorial map). Two groups of correlated parameters ($p < 0.05$, Pearson's test) appear according to their location relative to the second axis (in dotted circle on the map, Fig. 6a). The first one, appearing on the top of the factorial map, is composed of Zn bioaccumulation, MT, MnSOD, CuZnSOD, CAT, and ABCB1 mRNA levels. The second one, appearing on the bottom of the factorial map, contains Ni, Cu, and Cd bioaccumulation, CO1 and HSP70 mRNA levels, and CI (Fig. 6a). The two groups are in fact overlapping with significant correlations found between some parameters of each group (Table S2 in Supplementary Data). The projection of the samples on the two main axes of the PCA (Fig. 7a) indicates that all the control samples are found quite clustered on the right of the figure with the lowest metal bioaccumulations (Ni, Zn, Cu, and Cd) and the lowest mRNA levels of the seven genes studied. On the contrary, treated cockles are found mostly on the left of the figure with the highest metal bioaccumulations and the highest mRNA expression of the biomarkers cited above (Fig. 7a). A few exposed cockles are however found clustered with the control group. The projection of the samples according to the time of exposure (Fig. 7c) indicates that the samples corresponding to the three first times of exposure

Table 1 Trace metal concentrations in F₁ and F₂ effluent collected at the exit of the SIAPE phosphate treatment plant situated in the gulf of Gabès (Sfax, Tunisia)

	Cd	Cr	Cu	Mn	Zn	Ni	Pb
F ₁ effluent	0.953	0.994	0.381	0.445	2.757	0.469	0.174
F ₂ effluent	0.033	0.043	0.006	0.034	0.486	0.045	0.033
Tunisian norms	0.005	2	1.5	1	10	2	0.5
French norms	0.2	0.5	0.5	1	2	0.5	0.5

Tunisian and French norms are indicated. Results are expressed as milligrams/liter of effluent

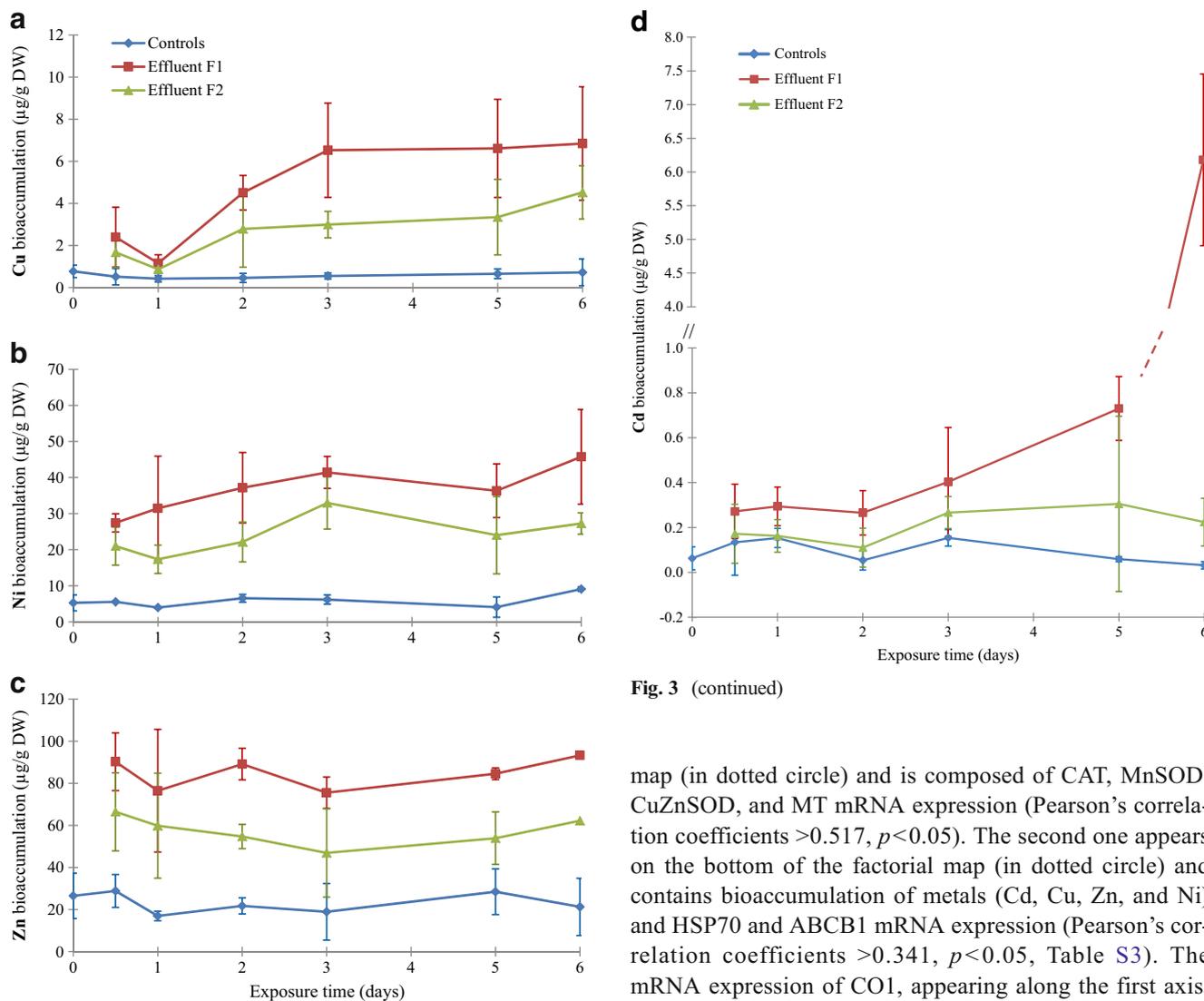


Fig. 3 (continued)

Fig. 3 Bioaccumulation of **a** Ni, **b** Zn, **c** Cu, and **(d)** Cd [µg/g (DW)] in cockles unexposed (controls) and exposed to F₁ and F₂ effluents. Data are expressed as means±SD (*n*=4); DW: dry weight

(12 hours, 1 day, and 2 days) are located on the right near the control group with low mRNA expression of all genes tested and low bioaccumulation of heavy metals compared to the other samples. Samples subjected to 3, 5, and 6 days of F₁ effluent are projected on the left of the figure with the highest mRNA expression for the different biomarkers and the highest metal bioaccumulations. It can also be noted that cockles at 3 days of exposure are located at the top of Fig. 7c with the highest expression of oxidative markers (MnSOD, CuZnSOD, CAT), MT, and ABCB1, whereas cockles at 6 days of exposure are located in the lower part of the figure with the highest expression of HSP70 and CO1.

In the F₂ PCA analysis (Fig. 6b), 62.8 % of the total variance is explained by the two main axes. A first group of correlated parameters (*p*<0.05, Pearson's test, Table S3 in Supplementary Data) appears on the top of the factorial

map (in dotted circle) and is composed of CAT, MnSOD, CuZnSOD, and MT mRNA expression (Pearson's correlation coefficients >0.517, *p*<0.05). The second one appears on the bottom of the factorial map (in dotted circle) and contains bioaccumulation of metals (Cd, Cu, Zn, and Ni) and HSP70 and ABCB1 mRNA expression (Pearson's correlation coefficients >0.341, *p*<0.05, Table S3). The mRNA expression of CO1, appearing along the first axis, is highly correlated to the two groups (Table S3). The projection of the samples on the two main axes of the PCA (Fig. 7b) indicates that all the control samples are found quite clustered on the right of the figure with the lowest metal bioaccumulations, the lowest mRNA levels of the seven genes, and the lowest CI. On the contrary, treated cockles are again found mostly on the left of the figure with the highest metal bioaccumulations and the highest mRNA expression of the biomarkers cited above (Fig. 7b). The projection of the samples according to the time of exposure (Fig. 7d) indicates that most of the samples corresponding to the three first times of exposure (12 h, 1 day, and 2 days) are located on the top left of the factorial map (in dotted circle) with high levels of mRNA coding for antioxidant enzymes (CAT, MnSOD, CuZnSOD) and MT. In contrast, most of the samples subjected to 3, 5, and 6 days of F₂ effluent are projected on the bottom left of the factorial map (in dotted circle), i.e., with high accumulation of metals (Cd, Cu, Zn, and Ni) and high mRNA expression of HSP70 and ABCB1 genes (Fig. 7d).

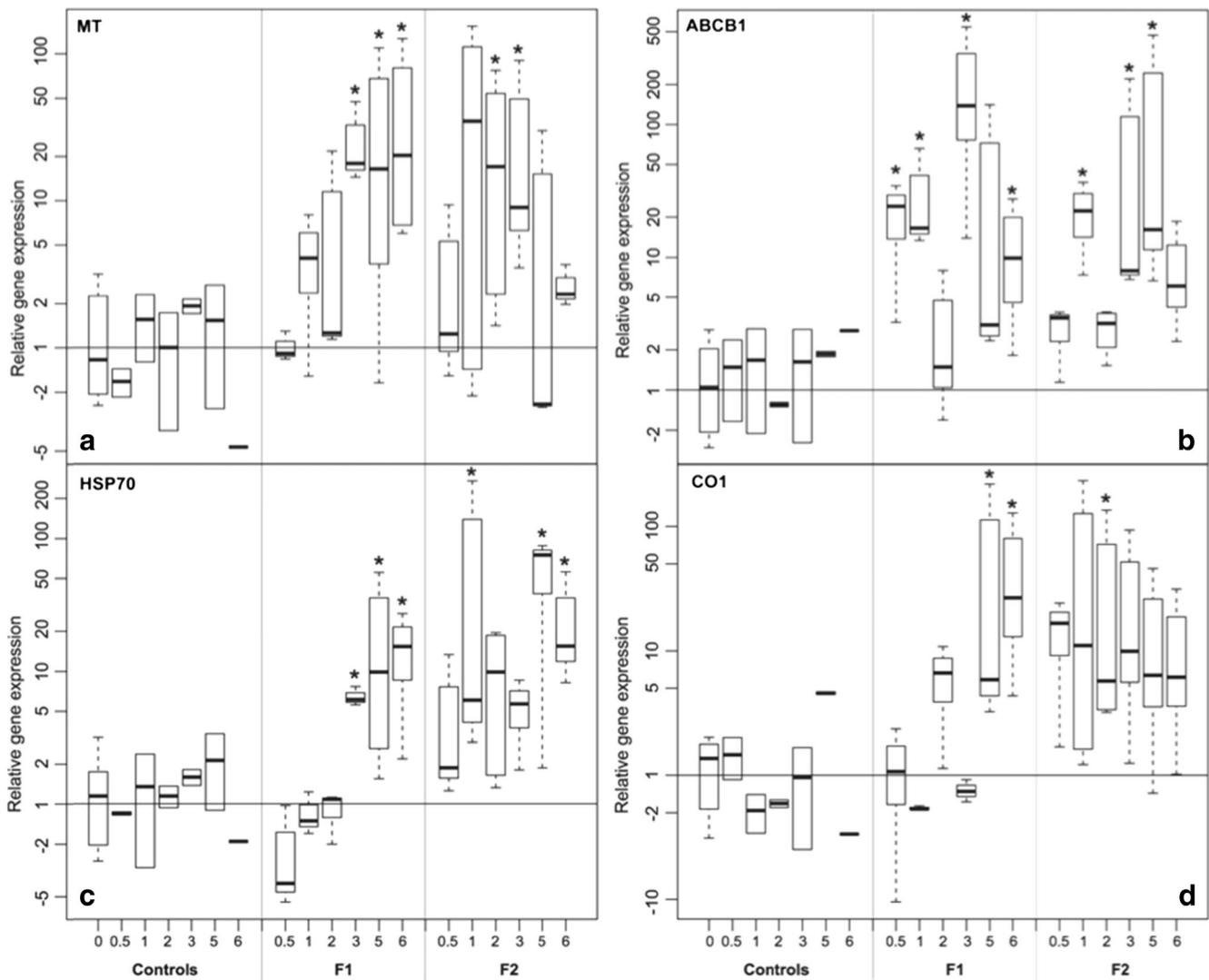


Fig. 4 Relative gene expression profiles for **a** MT, **b** ABCB1, **c** HSP70, and **d** CO1. Fold differences (log scale) are expressed relatively to controls at time 0. Significant differences from controls are indicated by an asterisk ($p < 0.05$, Kolmogorov-Smirnov test)

Discussion

Metal concentrations in effluents

The effluents (F₁ and F₂) used in this study were discharged by a phosphate treatment plant localized near Skhira in the gulf of Gabès. F₁ was a global effluent produced by the three different units of production (sulfuric acid, phosphoric acid, and fertilizers) of the SIAPE factory, while F₂ was a product of a single unit (phosphoric acid). Therefore, it was not surprising to find higher metal concentration in effluent F₁ compared to F₂. F₁ and F₂ effluents appear in the high concentration range of industrial effluents (Hajem et al. 2007; Petala et al. 2009; Sancey et al. 2011; Santos Yabe and de Oliveira 2003), especially concerning Cd which concentration exceeds Tunisian and French norms (T.N. 106.002 and French Ministerial Decree of 22 February 1998, respectively). At

1 % of dilution (sub-lethal concentration used for the experimentation), the Cd concentration of F₁ still exceeds the Tunisian norm.

Metal accumulation in cockles' tissues

Cockles exposed continuously for 1 week to effluent F₁ or F₂ at a concentration of 1 % accumulated higher concentrations of all studied heavy metals (Cd, Cu, Zn, and Ni) than control cockles. The accumulation of metals has often been highlighted in different bivalve species (see Zuykov et al. 2013 for a review). Accumulation was higher in the cockles exposed to F₁ than in the ones exposed to F₂, in accordance with the metal concentration of the two effluents. However, accumulation did not increase proportionally with concentration, which is probably due to a saturation of the influx rate at very high concentrations (Luoma and Rainbow 2005). Cd was much less

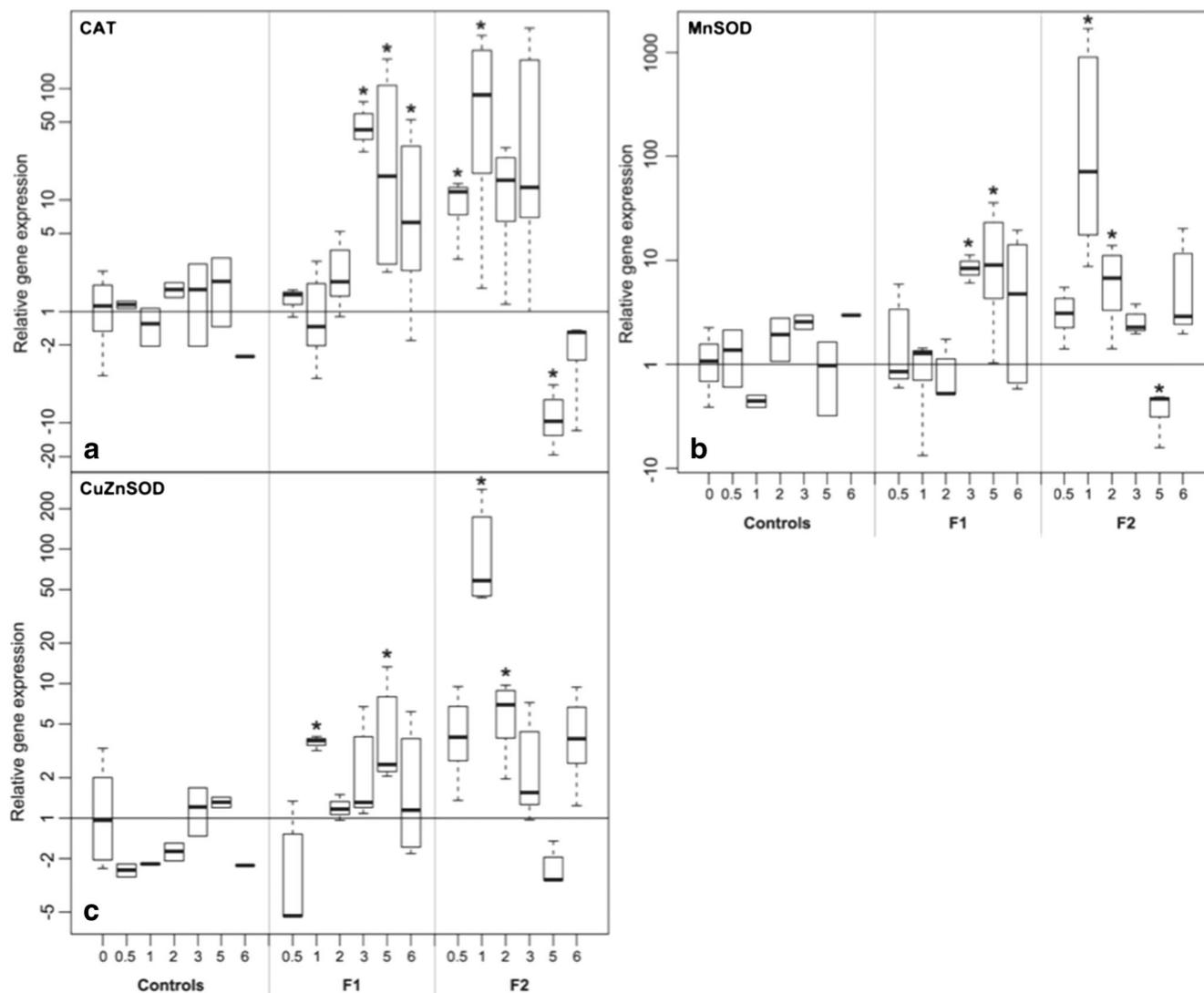


Fig. 5 Relative gene expression profiles for **a** CAT, **b** MnSOD, and **c** CuZnSOD. Fold differences (log scale) are expressed relatively to controls at time 0. Significant differences from controls are indicated by an asterisk ($p < 0.05$, Kolmogorov-Smirnov test)

accumulated than the other metals, relative to their respective concentrations in the effluents, suggesting a lower uptake rate of this metal (Luoma and Rainbow 2005). For Ni and Zn, accumulation in cockles has been relatively constant during the length of the experiment (6 days). For Cu and Cd,

accumulation increased with time. This increase was slight, except for Cd in cockles exposed to F₁ where it was exponential. According to Luoma and Rainbow (2005), low variation with exposure time may be due to a rapid rate of metal excretion, while a rapid increase in body metal concentration would

Table 2 Influence of treatment and of exposure time on relative gene expressions for each treatment versus control samples: sense of the effect and significance level

		ABCB1	CuZnSOD	MnSOD	CO1	HSP70	CAT	MT
F ₁ effluent	Influence of treatment	+***	+*	+	**	**	***	***
	Influence of exposure time	/	/	+	***	***	**	**
F ₂ effluent	Influence of treatment	+***	***	**	***	***	**	**
	Influence of exposure time	/	***	**	/	/	***	/

Global effect: +, positive effect (increased expression); -, negative effect (decreased expression)

Statistical significance: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; /, no significant effect ($p > 0.05$)

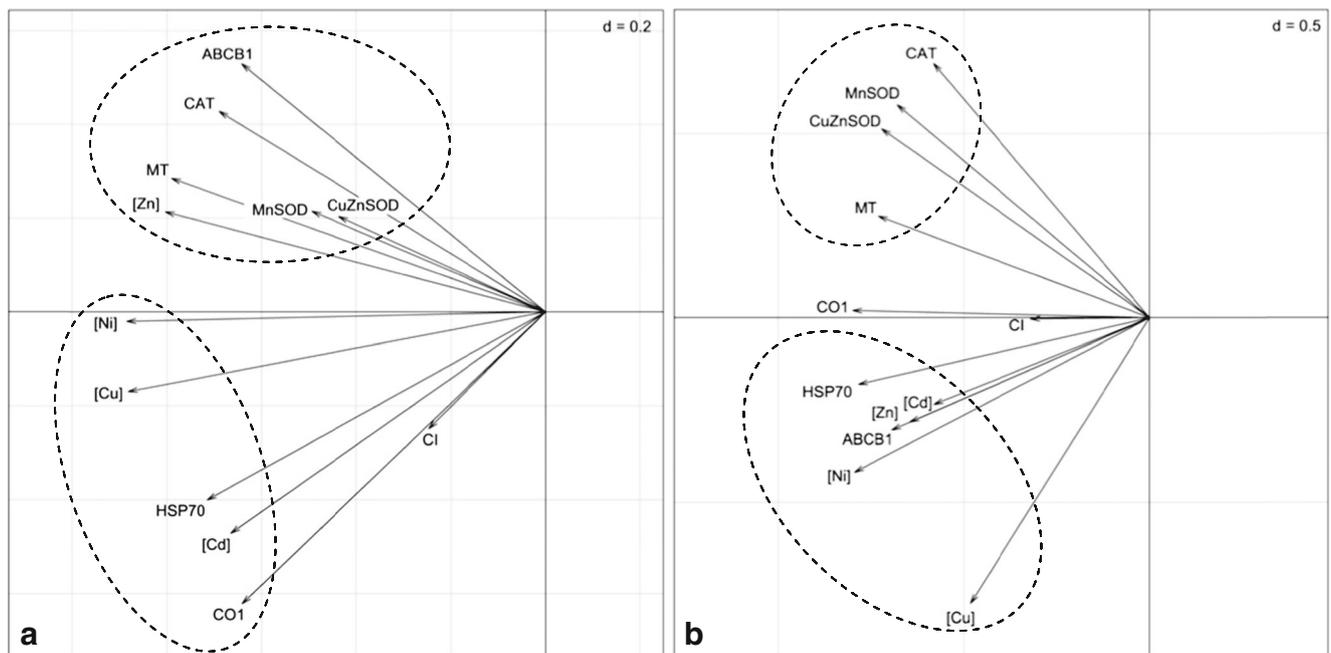


Fig. 6 Principal component analysis (PCA) on gene expressions, metal bioaccumulation (Ni, Zn, Cu, and Cd), and CI. **a** PCA performed on controls and cockles exposed to effluent F₁; **b** PCA performed on

controls and cockles exposed to effluent F₂; CI condition index; [Ni], [Zn], [Cu], [Cd], and metal bioaccumulation in cockles

be due to the slow rate of excretion relative to the ingestion rate. Our results therefore suggest that excretion is more effective for Ni and Zn than for Cu and especially Cd in *C. glaucum*.

The global physiological state of cockles

Our data clearly demonstrate that exposure to effluent F₁ significantly affects LT50 data, reflecting metabolic perturbations and a general lower health status of cockles following effluent exposure. This result may suggest that protection and/or detoxification mechanisms as possible responses to toxicants could imply energetic costs and therefore could reduce the capacity to resist to an additional change, i.e., air exposure in our study (Viarengo et al. 1995). Such trade-offs have already been described in the literature (Forbes 2000; Handy et al. 1999; Van Straalen and Hoffman 2000). For effluent F₂, the same trend is detected though not significant. This difference may be explained by the highest concentrations in metals found in effluent F₁ compared to effluent F₂.

Measures of bivalve's condition based on weight are thought to be reliable indicators of the energetic health status and energy reserves in mollusks. The results obtained in our study do not show any difference in the condition index between controls and exposed cockles. This finding probably highlights that this parameter is too much integrative and that only 6 days of exposition might not be enough to produce perceptible variations between exposed cockles and control ones. This result is corroborated by the results of the two

PCA analyses, which indicate that CI is a weak structuring parameter (small arrows).

Effects of effluent exposure on mRNA expression

In cockles exposed either to F₁ or F₂, mRNA expression is significantly higher than in controls for all the studied genes (Table 2; Figs. 4 and 5). Moreover, the much higher variability observed in exposed individuals (large box plots) suggests the existence of different types of responses among cockles experiencing the same exposition. Elements confirming this hypothesis may be found with the projections of individuals into the PCAs (Figs. 6 and 7). Indeed, for both effluents, control individuals are found quite grouped while exposed individuals are more scattered (Figs. 6 and 7).

The ATP-binding cassette xenobiotic transporter ABCB1 gene transcription seems to follow a wave pattern in the two effluent exposures. ABCB1 shows a rapid increase in expression (days 0.5 and 1) followed by a decrease and an additional peak at day 3 (for F₁) or 5 (for F₂). This marker is significantly correlated to Cd, Zn, Ni, and Cu accumulation in tissues following exposure to F₂ effluent. The ABCB1 transmembrane protein acts by actively exporting toxic compounds out of the cell (Pain and Parant 2003; Minier et al. 2006), and our results show that it is an actor of the response to metal exposure, its mRNA expression being modulated by the level of metals. Previous studies already highlighted a strong ABCB1 mRNA increase in marine organisms following exposure to

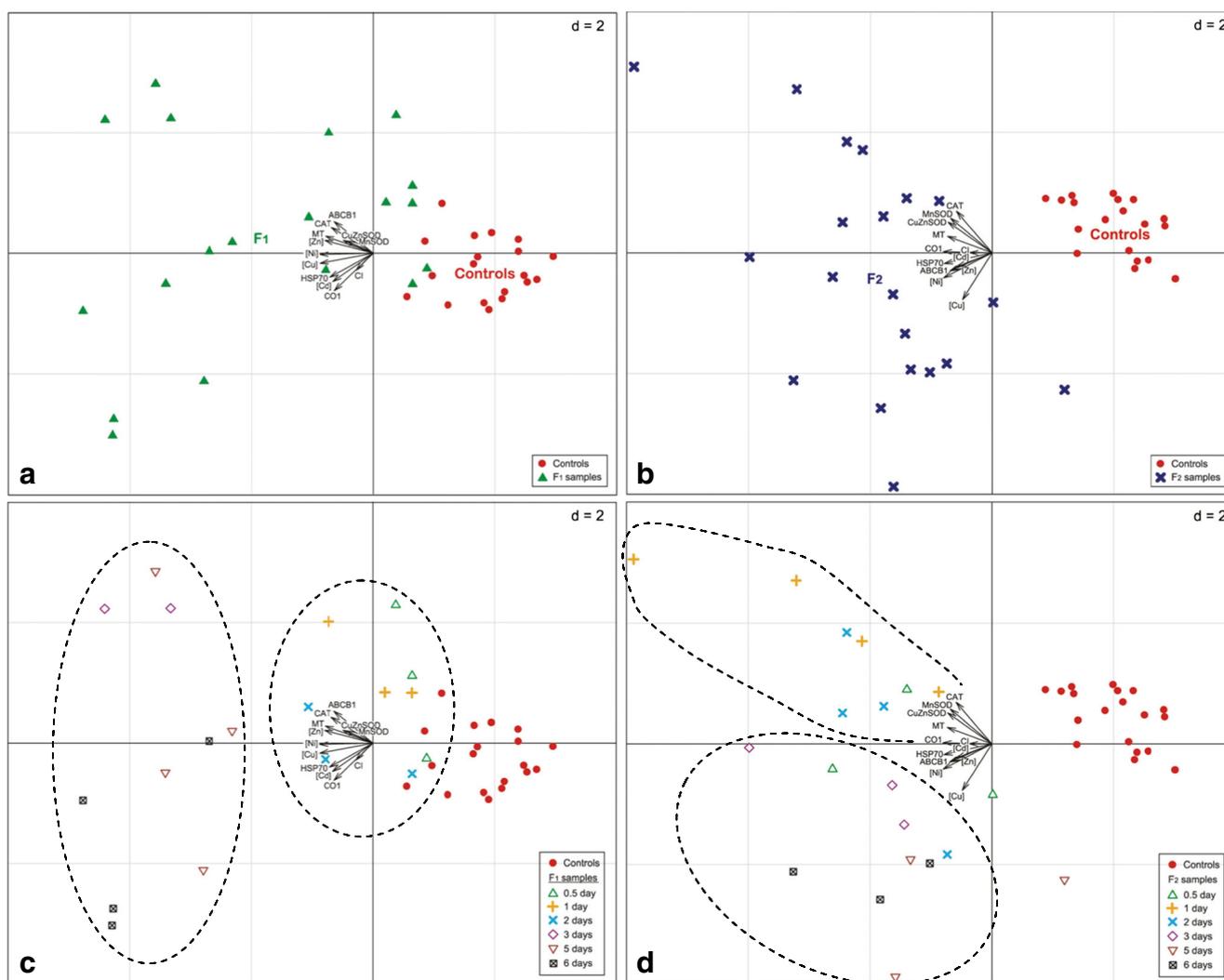


Fig. 7 a Projections of samples according to the different quantitative data presented in Fig. 5a (F₁ exposure); b projections of samples according to the different quantitative data presented in Fig. 5b (F₂

exposure); c projections of samples according to the time of exposure to F₁; d projections of samples according to the time of exposure to F₂

Cd and other metal exposure (Della Torre et al. 2014; Zucchi et al. 2010).

Considering both effluent exposures, antioxidative defenses are triggered through the mRNA expression of gene coding for CAT, CuZnSOD, and MnSOD. SODs (CuZnSOD and MnSOD being respectively the cytosolic and the mitochondrial form) are known to catalyze the dismutation of superoxide anions into hydrogen peroxides, which are in turn reduced by CAT into water and molecular oxygen. The increase of these antioxidant enzymes in response to effluent exposure seems to constitute an adaptation in gills to prevent and/or repair metal-induced damage in cellular component (Fernandez et al. 2010). Several studies have shown that metals can promote oxidative stress in cells (Sabatini et al. 2011; Trevisan et al. 2014; Wang et al. 2010), and in particular, Kamel et al. (2012) found a correlation

between CAT, MnSOD, and metal accumulations in clams treated with municipal effluents.

MT was also induced in response to the uptake of metals in both exposures, with an inverted U shape and a significant higher expression of +35-fold at day 2 for the F₂ exposure while quite linear for the F₁ exposure, reaching a significant expression of +20 at day 6. The up-regulation of this gene is in accordance with previous experiments performed with different invertebrates following metal exposure (Al Kaddissi et al. 2012; Dondero et al. 2005; Lecoecur et al. 2004; Navarro et al. 2011; Zorita et al. 2007). It may reflect the role of MTs in the uptake and handling of metals, as well as their role as antioxidants reacting with free radicals and reactive oxygen species (ROS), reducing significantly the toxicity of ROS and preventing interactions with critical cellular components such as enzymes, structural proteins, DNA, and membrane lipids

(Amiard et al. 2006; Andrews 2000; Coyle et al. 2002; Ivanina et al. 2009; Kamel et al. 2012; Tanguy et al. 2001).

The biomarkers coding for CO1 and HSP70 showed a remarkably higher mRNA expression in cockles exposed to F₂, with in addition a high correlation to metal concentrations in cockles exposed to both effluents. For F₁ exposed cockles, this up-regulation is more observed in the second part of the experiment (3 to 6 days). The CO1 (cytochrome oxidase 1) transfers electrons from reduced cytochrome c to molecular oxygen in the mitochondrial respiratory chain and contributes to the production of an electrochemical proton gradient across the mitochondrial inner membrane that drives the synthesis of ATP (Capaldi 1990; Capaldi et al. 1983). Its increase in mRNA expression following effluent exposure indicates a higher metabolic activity in exposed cockles. This could be a cellular strategy (1) to compensate for the decrease in the number of functional mitochondria (through inhibition phenomenon or membrane potential decrease) by increasing ATP production, so as to provide enough energy for cellular needs, especially to tolerate metals (Al Kaddissi et al. 2012), and/or (2) to efficiently consume O₂ to limit metal-induced oxidative damage in cells (Chen 2003; Wang et al. 2004). It has to be noted that the gene transcription level of CO1 correlated well with those of antioxidant enzymes (CuZnSOD, MnSOD, and CAT) in cockles exposed to F₂ effluent. Previous studies have highlighted an up-regulation of the CO1 gene in invertebrates following Cd and other metals exposure (Achard-Joris et al. 2006; Al Kaddissi et al. 2012; Navarro et al. 2011). The response of HSP70 is quite similar to that of CO1 after exposure to F₁ and F₂. HSP70 are involved in folding/refolding of newly synthesized and damaged proteins as well as in sequestering and degradation of proteins that are damaged beyond repair (Mayer and Bukau 2005). Studies have already reported an increase in HSP70 expression in bivalves such as *Dreissena polymorpha* and *Crassostrea virginica* (Gmelin) upon the presence of metals like Cu, Cd, Pd, Pt, and Rt (Ivanina et al. 2008, 2009; Navarro et al. 2011). Even if HSP70 are known to be synthesized intensively in response to a variety of harmful stimuli (heat, metals, organic contaminants, injuries, disease, ...), the strong up-regulation of its gene (reaching +15- and +75-fold, the mean expression level of controls for F₁ and F₂, respectively) reflects a mechanism highly settled to protect cells against stress-induced damage.

Finally, it has to be noted that exposure concentration (F₁ versus F₂) seems to have an impact on the global gene transcription profile over time. Indeed, mRNA up-regulations for the different genes studied (excepted ABCB1) are faster and higher in F₂ compared to F₁, though F₁ effluent contains higher concentrations of the different metals than F₂ and leads to higher metal accumulation in tissues. Similarly, recent studies on gene expression in daphnia, zebrafish, and fathead minnows following exposure to several metals over a range of concentrations highlighted that the transcription of several

genes occurred at the lower metal concentrations (even though the accumulation was greater at higher concentrations). A high stress level (which is the case for F₁) may cause several transcriptional inhibitions and/or mRNA degradations that may impede or delay defense mechanisms (Klaper et al. 2008; Lerebours et al. 2010; Poynton et al. 2008). Moreover, at the end of the F₁ experiment, RNA copy number seems to be in an increasing phase for most of the seven genes studied.

Conclusion

Gene transcription monitoring performed on seven genes potentially involved in the tolerance to metal exposure showed that for both exposures (though different in concentrations), mechanisms are rapidly and synchronically settled down to prevent damage to cellular components, by (1) handling and exporting out metal ions through the up-regulation of ABCB1 and MT, (2) reducing the toxicity of ROS through the expression of antioxidant enzymes (CAT, CuZnSOD, and MnSOD), (3) protecting and/or repairing proteins through the expression of HSP70 mRNAs, and (4) increasing ATP production (through the up-regulation of CO1) to provide energy for cells to tolerate stress exposure. These molecular responses imply energetic costs and therefore might explain the reduced tolerance of cockles to anoxia observed with the stress on stress test. The tools developed may be useful both for future control strategies and for the use of the cockle *C. glaucum* as a sentinel species. However, future investigations should be performed to validate these biomarkers in field conditions. Moreover, parallel biochemical, physiological, immunological, and/or morphological/pathological data should complement this study to better assess metal toxicities and their mechanism of action.

Acknowledgments This research was financially supported by the European Program FP7 PEOPLE-IRSES GENERA (use of genomic and proteomic tools for the development of contaminant specific biomarkers for the environmental risk assessment of aquatic ecosystems). A. Goupille is acknowledged for the ICP-OES measurements.

References

- Achard-Joris M, Gonzalez P, Marie V, Baudrimont M, Bourdineaud JP (2006) Cytochrome c oxidase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *Biometals* 19:237–244. doi:10.1007/s10534-005-5671-9
- Al Kaddissi S, Legeay A, Elia AC, Gonzalez P, Floriani M, Cavalie I, Massabuau JC, Gilbin R, Simon O (2012) Mitochondrial gene expression, antioxidant responses, and histopathology after cadmium exposure. *Environ Toxicol*. doi:10.1002/tox.21817
- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal

- detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76:160–202. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015
- Andrews GK (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* 59:95–104
- Barhouni S, Messaoudi I, Deli T, Said K, Kerkeni A (2009) Cadmium bioaccumulation in three benthic fish species, *Salaria basilisca*, *Zosterisessor ophiocephalus* and *Solea vulgaris* collected from the Gulf of Gabes in Tunisia. *J Environ Sci (China)* 21:980–984
- Capaldi RA (1990) Structure and function of cytochrome c oxidase. *Ann Rev Biochem* 59:569–596. doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.003033
- Capaldi RA, Malatesta F, Darley-Usmar VM (1983) Structure of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 726:135–148
- Chen Q (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278:36027–36031. doi:10.1074/jbc.M304854200
- Ciacci C, Barmo C, Gallo G, Maisano M, Cappello T, D'Agata A, Leonzio C, Mauceri A, Fasulo S, Canesi L (2012) Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 120–121: 109–118. doi:10.1016/j.aquatox.2012.04.015
- Cong M, Wu H, Liu X, Zhao J, Wang X, Lv J, Hou L (2012) Effects of heavy metals on the expression of a zinc-inducible metallothionein-III gene and antioxidant enzyme activities in *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology* 21:1928–1936. doi:10.1007/s10646-012-0926-z
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 59:627–647
- Dedourge-Geffard O, Palais F, Biagiante-Risbourg S, Geffard O, Geffard A (2009) Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: an in situ experiment. *Chemosphere* 77:1569–1576. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.09.042
- Della Torre C, Bocci E, Focardi SE, Corsi I (2014) Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Mar Environ Res* 93:56–63. doi:10.1016/j.marenvres.2013.06.005
- Derbali A, El Hasni K, Jarboui O, Ghorbel M (2012) Distribution, abundance and biological parameters of *Cerastoderma glaucum* (Mollusca: Bivalvia) along the Gabes coasts (Tunisia, Central Mediterranean). *Acta Adriat* 53(3):363–374
- Dondero F, Piacentini L, Banni M, Rebelo M, Burlando B, Viarengo A (2005) Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene* 345:259–270. doi:10.1016/j.gene.2004.11.031
- Douxifils J, Mandiki R, Silvestre F, Bertrand A, Leroy D, Thome JP, Kestemont P (2007) Do sewage treatment plant discharges substantially impair fish reproduction in polluted rivers? *Sci Total Environ* 372:497–514. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.08.020
- Fernandez B, Campillo JA, Martinez-Gomez C, Benedicto J (2010) Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. *Aquat Toxicol* 99:186–197. doi:10.1016/j.aquatox.2010.04.013
- Forbes VE (2000) Is hormesis an evolutionary expectation? *Funct Ecol* 14:12–24
- Gagne F, Andre C, Cejka P, Hausler R, Fournier M, Blaise C (2008) Immunotoxic effects on freshwater mussels of a primary-treated wastewater before and after ozonation: a pilot plant study. *Ecotoxicol Environ Saf* 69:366–373. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.10.027
- Gargouri D, Azri C, Serbaji MM, Jedoui Y, Montacer M (2011) Heavy metal concentrations in the surface marine sediments of Sfax Coast, Tunisia. *Environ Monit Assess* 175:519–530. doi:10.1007/s10661-010-1548-7
- Geffard A, Sartelet H, Garric J, Biagiante-Risbourg S, Delahaut L, Geffard O (2010) Subcellular compartmentalization of cadmium, nickel, and lead in *Gammarus fossarum*: comparison of methods. *Chemosphere* 78:822–829. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.11.051
- Hajem B, Hamzaoui H, M'Nif A (2007) Chemical interaction between industrial acid effluents and the hydrous medium. *Desalination* 206: 154–162. doi:10.1016/j.desal.2006.03.565
- Handy RD, Sims DW, Giles A, Campbell HA, Musonda MM (1999) Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquat Toxicol* 47:23–41
- 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
- Ivanina AV, Sokolova IM, Sukhotin AA (2008) Oxidative stress and expression of chaperones in aging mollusks. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 150:53–61. doi:10.1016/j.cbpb.2008.01.005
- Ivanina AV, Taylor C, Sokolova IM (2009) Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquat Toxicol* 91:245–254. doi:10.1016/j.aquatox.2008.11.016
- Jadeja RN, Tewari A (2007) Effect of soda ash industry effluent on bioaccumulation of metals by seaweeds of coastal region of Gujarat, India. *J Hazard Mater* 147:148–154. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.12.060
- Javied S, Mehmood T, Chaudhry MM, Tufail M, Irfan N (2009) Heavy metal pollution from phosphate rock used for the production of fertilizer in Pakistan. *Microchem J* 91:94–99. doi:10.1016/j.microc.2008.08.009
- Kamel N, Jebali J, Banni M, Ben Khedher S, Chouba L, Boussetta H (2012) Biochemical responses and metals levels in *Ruditapes decussatus* after exposure to treated municipal effluents. *Ecotoxicol Environ Saf* 82:40–46. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.05.008
- Kessabi K, Navarro A, Casado M, Said K, Messaoudi I, Pina B (2010) Evaluation of environmental impact on natural populations of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* by quantitative RNA biomarkers. *Mar Environ Res* 70:327–333. doi:10.1016/j.marenvres.2010.06.005
- Ketata I, Smaoui-Damak W, Guermazi F, Rebai T, Hamza-Chaffai A (2007) In situ endocrine disrupting effects of cadmium on the reproduction of *Ruditapes decussatus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146:415–430. doi:10.1016/j.cbpc.2007.05.002
- Klaper R, Carter BJ, Richter CA, Drevnick PE, Sandheinrich MB, Tillitt DE (2008) Use of a 15 k gene microarray to determine gene expression changes in response to acute and chronic methylmercury exposure in the fathead minnow *Pimephales promelas* Rafinesque. *J Fish Biol* 72:2207–2280. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.01899.x
- Ladhar-Chaabouni R, Machreki-Ajmi M, Hamza-Chaffai A (2009a) Spatial distribution of cadmium and some biomarkers in *Cerastoderma glaucum* living in a polluted area. *Mar Biol Res* 5: 478–486. doi:10.1080/17451000802683985
- Ladhar-Chaabouni R, Mokdad-Gargouri R, Denis F, Hamza-Chaffai A (2009b) Cloning and characterization of cDNA probes for the analysis of metallothionein gene expression in the Mediterranean bivalves: *Ruditapes decussatus* and *Cerastoderma glaucum*. *Mol Biol Rep* 36:1007–1014. doi:10.1007/s11033-008-9274-8
- Ladhar-Chaabouni R, Smaoui-Damak W, Hamza-Chaffai A (2009c) In vivo variation of some biomarkers with time and cadmium concentration in the cockle *Cerastoderma glaucum*. *Mar Biol Res* 5:487–495. doi:10.1080/17451000802534881
- Ladhar-Chaabouni R, Machreki-Ajmi M, Hamza-Chaffai A (2012) Use of metallothioneins as biomarkers for environmental quality

- assessment in the Gulf of Gabès (Tunisia). *Environ Monit Assess* 184:2177–2192. doi:10.1007/s10661-011-2108-5
- Lecoer S, Videmann B, Bery P (2004) Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environ Res* 94:184–191
- Lerebours A, Bourdineaud J-P, Kvd V, Vandenbrouck T, Gonzalez P, Camilleri V, Floriani M, Garnier-Laplace J, Adam-Guillermine C (2010) Sublethal effects of waterborne uranium exposures on the zebrafish brain: transcriptional responses and alterations of the olfactory bulb ultrastructure. *Environ Sci Technol* 44:1438–1443. doi:10.1021/es902550x
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lobel PB, Bajdik CD, Belkhole SP, Jackson SE, Longrich HP (1991) Improved protocol for collecting mussel watch specimens taking into account sex, size, condition, shell shape, and chronological age. *Arch Environ Contam Toxicol* 21:409–414. doi:10.1007/bf01060364
- Luoma SN, Rainbow PS (2005) Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environ Sci Technol* 39:1921–1931
- Machreki-Ajmi M, Hamza-Chaffai A (2006) Accumulation of cadmium and lead in *Cerastoderma glaucum* originating from the Gulf of Gabes, Tunisia. *Bull Environ Contam Toxicol* 76:529–537. doi:10.1007/s00128-006-0952-8
- Machreki-Ajmi M, Hamza-Chaffai A (2008) Assessment of sediment/water contamination by *in vivo* transplantation of the cockles *Cerastoderma glaucum* from a non contaminated to a contaminated area by cadmium. *Ecotoxicology* 17:802–810. doi:10.1007/s10646-008-0238-5
- Mar SS, Okazaki M (2012) Investigation of Cd contents in several phosphate rocks used for the production of fertilizer. *Microchem J* 104:17–21. doi:10.1016/j.microc.2012.03.020
- Marigomez I, Soto M, Cajaraville MP, Angulo E, Giamberini L (2002) Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc Res Tech* 56:358–392. doi:10.1002/jemt.10040
- Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62:670–684. doi:10.1007/s00018-004-4464-6
- Minier C, Abamou A, Jaouen-Madoulet A, Le Guellec AM, Tutundjian R, Bocquene G, Leboulenger F (2006) A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environ Toxicol Chem* 25:112–119
- Navarro A, Quiros L, Casado M, Faria M, Carrasco L, Benjam L, Benito J, Diez S, Raldua D, Barata C, Bayona JM, Pina B (2009) Physiological responses to mercury in feral carp populations inhabiting the low Ebro River (NE Spain), a historically contaminated site. *Aquat Toxicol* 93:150–157. doi:10.1016/j.aquatox.2009.04.009
- Navarro A, Faria M, Barata C, Pina B (2011) Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ Pollut* 159:100–107. doi:10.1016/j.envpol.2010.09.018
- Pain S, Parant (2003) Response of multixenobiotic defence mechanism in *Dreissena polymorpha* exposed to environmental stress. *Chemosphere* 52(7):1105–1113
- Paul-Pont I, Gonzalez P, Baudrimont M, Nili H, de Montaudouin X (2010) Short-term metallothionein inductions in the edible cockle *Cerastoderma edule* after cadmium or mercury exposure: discrepancy between mRNA and protein responses. *Aquat Toxicol* 97:260–267. doi:10.1016/j.aquatox.2009.12.007
- Petala M, Kokokiris L, Samaras P, Papadopoulos A, Zouboulis A (2009) Toxicological and ecotoxic impact of secondary and tertiary treated sewage effluents. *Water Res* 43:5063–5074. doi:10.1016/j.watres.2009.08.043
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pairwise correlations. *Biotechnol Lett* 26:509–515
- Poynton HC, Loguinov AV, Varshavsky JR, Chan S, Perkins EJ, Vulpe CD (2008) Gene expression profiling in *Daphnia magna* part I: concentration-dependent profiles provide support for the no observed transcriptional effect level. *Environ Sci Technol* 42:6250–6256
- Sabatini SE, Rocchetta I, Nahabedian D, Luquet C, Maria R, Eppis M, Bianchi L, Rios de Molina MC (2011) Oxidative stress and histological alterations produced by dietary copper in the fresh water bivalves *Diplodon chilensis*. *Comp Biochem Physiol C* 154:391–398
- Salo HM, Hebert N, Dautremepuits C, Cejka P, Cyr DG, Fournier M (2007) Effects of Montreal municipal sewage effluents on immune responses of juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 84:406–414. doi:10.1016/j.aquatox.2007.06.014
- Sancey B, Trunfio G, Charles J, Minary J-F, Gavaille S, Badot P-M, Crini G (2011) Heavy metal removal from industrial effluents by sorption on cross-linked starch: chemical study and impact on water toxicity. *J Environ Manag* 92:765–772. doi:10.1016/j.jenvman.2010.10.033
- Santos Yabe MJ, de Oliveira E (2003) Heavy metals removal in industrial effluents by sequential adsorbent treatment. *Adv Environ Res* 7:263–272
- Schulte PM (2004) Changes in gene expression as biochemical adaptations to environmental change: a tribute to Peter Hochachka. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol* 139:519–529. doi:10.1016/j.cbpc.2004.06.001
- Sim CH, Quek BS, Shutes RB, Goh KH (2013) Management and treatment of landfill leachate by a system of constructed wetlands and ponds in Singapore. *Water Sci Technol* 68:1114–1122. doi:10.2166/wst.2013.352
- Szefer P, Wolowicz M, Kusak A, Deslous-Paoli J, Czarnowski W, Frelek K, Belzunce M (1999) Distribution of mercury and other trace metals in the cockle *Cerastoderma glaucum* from the Mediterranean Lagoon Etang de Thau. *Arch Environ Contam Toxicol* 36:56–63
- Tanguy A, Mura C, Moraga D (2001) Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). *Aquat Toxicol* 55:35–47
- Tayibi H, Choura M, López FA, Alguacil FJ, López-Delgado A (2009) Environmental impact and management of phosphogypsum. *J Environ Manag* 90:2377–2386. doi:10.1016/j.jenvman.2009.03.007
- Trevisan R, Flesch S, Mattos JJ, Milani MR, Bairy ACD, Dafre AL (2014) Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 159:22–30. doi:10.1016/j.cbpc.2013.09.007
- Van Straalen NM, Hoffman AA (2000) Review of experimental evidence for physiological costs of tolerance to toxicants. In: Kammenga J, Laskowski R (eds) *Demography in ecotoxicology*. John Wiley & Sons, New York, pp 147–161
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Mancinelli G, Accomando A, Smaalb AC, Orunesu M (1995) Stress on stress response: a simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Mar Environ Res* 39:245–248
- Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36:1434–1443. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010

- Wang Q, Wang X, Yang H, Liu B (2010) Analysis of metallothionein expression and antioxidant enzyme activities in *Meretrix meretrix* larvae under sublethal cadmium exposure. *Aquat Toxicol* 100:321–328. doi:[10.1016/j.aquatox.2010.08.012](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.08.012)
- Zorita I, Bilbao E, Schad A, Cancio I, Soto M, Cajaraville MP (2007) Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by in situ hybridization and RT-PCR. *Toxicol Appl Pharmacol* 220:186–196. doi:[10.1016/j.taap.2007.01.003](https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.01.003)
- Zucchi S, Corsi I, Luckenbach T, Bard SM, Regoli F, Focardi S (2010) Identification of five partial ABC genes in the liver of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* and sensitivity of ABCB1 and ABCC2 to Cd exposure. *Environ Pollut* 158:2746–2756. doi:[10.1016/j.envpol.2010.04.012](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.04.012)
- Zuykov M, Pelletier E, Harper DA (2013) Bivalve mollusks in metal pollution studies: from bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93:201–208. doi:[10.1016/j.chemosphere.2013.05.001](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.001)

**Article3 : publié dans
Environnemental Science and
Pollution Research**

**The Reproductive Cycle, Condition Index
and Glycogen Reserves of the Cockles
Cerastoderma glaucum from the Gulf of
Gabès (Tunisia)**

**Karray Sahar, Smaoui-Damak Wafa, Tarek rebai and
Hamza-Chaffai Amel**

*The reproductive cycle, condition index,
and glycogen reserves of the cockles
Cerastoderma glaucum from the Gulf of
Gabès (Tunisia)*

**Sahar Karray, Wafa Smaoui-Damak,
Tarek Rebai & Amel Hamza-Chaffai**

**Environmental Science and Pollution
Research**

ISSN 0944-1344

Environ Sci Pollut Res
DOI 10.1007/s11356-015-4337-6



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

The reproductive cycle, condition index, and glycogen reserves of the cockles *Cerastoderma glaucum* from the Gulf of Gabès (Tunisia)

Sahar Karray¹ · Wafa Smaoui-Damak¹ · Tarek Rebai² · Amel Hamza-Chaffai¹

Received: 18 July 2014 / Accepted: 9 March 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract The gametogenic cycle of the *Cerastoderma glaucum* was analyzed using both qualitative and semi-quantitative methods. The condition index and glycogen concentrations were determined in order to provide information on energy storage. The cockles were collected monthly from a Bayyadha site located 15 km south of Sfax City (Gulf of Gabès) between January 2007 and January 2008. From histological point of view, we applied two approaches: (i) the qualitative method describing the various stages of gamete development for males and females during a cycle of 13 months, and (ii) the semi-quantitative method concerning the estimation of different tissue surfaces. The results showed that there is evidence of three periods of reproduction in this population. A comparison between the surfaces occupied by the three organs showed that the foot and the gonad surfaces are higher than the surface of the adductor muscle. This could suggest that these two organs are more involved in the process of glycogen reserve storage. The results of the glycogen concentrations in the different tissues (gonad, adductor muscle, and “remainders”) show that during the second and third periods of reproduction, glycogen was stored in the adductor muscle and in the remainder during sexual rest, and in the gonad during the gametogenesis phases in order to supply the reproductive effort. On the contrary, in the first period of reproduction, the low concentrations of glycogen recorded in the gonad

coincided with its high degree of development. This fact could be related to environmental conditions (low temperature and food) recorded during this period.

Keywords *Cerastoderma glaucum* · Reproductive cycle · Glycogen · Tissues of reserves

Introduction

The cockle *Cerastoderma glaucum* is an ecologically important bivalve which is highly widespread in the Gulf of Gabès (Tunisia) (Machreki-Ajmi and Hamza-Chaffai 2006). Moreover, this species is a sedentary filter-feeding marine bivalve, living in the superficial sediment; it represents an excellent bioindicator organism reflecting the polluted state of the Tunisian coast (Machreki-Ajmi and Hamza-Chaffai 2006).

Many investigators have recently focused on the biology (including the reproductive cycle) of *Cerastoderma glaucum*, its capacities to accumulate toxic metals from the marine environment, and its possible usefulness in the national monitoring program (Ivell 1979; Zaouali 1974; Machreki-Ajmi and Hamza-Chaffai 2006; Machreki-Ajmi et al. 2008). Nevertheless, less attention has been paid to the relationship between the reproductive cycle and the glycogen reserve management in this species. However, it is important to understand the ways in which the cockle manages its reserves in relation to the reproductive cycle and the environmental conditions in the studied site. Indeed, energetic reserves, glycogen in particular, are well known to play a central role in providing energy for the maintenance and gametogenetic development of bivalves. Besides, several studies (Mathieu and Lubet 1993; Lemaire et al. 2006; Dridi et al. 2007) showed that marine bivalves are subject to the annual cycles of

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Sahar Karray
karraysahar@yahoo.fr

¹ Toxicologie Marine et Environnementale, UR 09-03, Université de Sfax, Sfax, Tunisie

² Laboratoire d’Histologie, Faculté de Médecine de Sfax, 3029 Sfax, Tunisie

accumulation and to the use of energy reserves associated with gametogenesis. These cycles are influenced by environmental parameters such as temperature, salinity, and food availability. More recent studies (Berthelin et al. 2000; Perez-Camacho et al. 2003; Matus de la Perra et al. 2005; Hanquet-Dufour et al. 2006; Dridi et al. 2007) have focused on the role that glycogen can play as energy reserve for the gamete formation. In order to demonstrate the relationship between the reproductive cycle of the cockle *Cerastoderma glaucum* and the management of the glycogen reserves according to the abiotic factors at the Bayyadha site, we applied two histological approaches: (i) the qualitative method describing the various stages of the gamete development for males and females during a 13-month cycle, and (ii) the semi-quantitative method providing precise information about the degree of maturity in bivalves. In this work, the semi quantitative method concerns the dynamic of the surface area occupied by the reserve tissue. We additionally determined and compared changes in the glycogen concentrations for the various tissues (gonad, muscle, and “remainders” including siphons, mantle, gills, and foot) according to the reproductive cycle of the cockles and the environmental conditions in the studied site.

Materials and methods

Study area and sampling

Samplings were conducted monthly from January (J1) 2007 to January (J2) 2008 in the Bayyadha site (33° 31' N, 10° 42' E) located in the gulf of Gabès (Sfax, Tunisia) (Fig. 1). This area is situated about 15 km in the north of Sfax and is characterized by sandy and muddy sediment. It is affected by industrial activity and effluents carried out by streams that contain a high concentration of metals (Hamza-Chaffai et al 2003). Moreover, this site is rich in nutrients and in phosphate provided by phosphogypsum discharges leading to a massive phytoplankton production characteristic of this area. This site is known to be very rich in the two bivalves, *Cerastoderma glaucum* and *Ruditapes decussatus* (Figs. 2, 3, 4 and 5).

Samples ($n=35$) of *Cerastoderma glaucum* (size 28–32) were collected from Bayyadha site (33° 31' N, 10° 42' E) at monthly intervals between January (2007) and January (2008) from a depth of nearly 2 m. Temperature and salinity were measured at the time of sample collection.

Condition index

For each sampling period, 15 cockles were weighed (total weight). Then, all the soft tissues separated from the shell were weighed. Finally, the condition index (CI) was determined according to the recommendation of the French Association

for Standardization AFNOR NF V 45056, (September 1985): $CI = (\text{drained mass of soft tissues} / \text{total weight}) \times 100$.

Histological techniques

Fifteen individuals were assigned to histology and were subject to both qualitative and quantitative analyses.

Qualitative histology

Fifteen cockles were dissected following a median section plan, and the soft tissues were fixed for 48 h in the aqueous Bouin's fixative for histological determination. Tissues were then dehydrated through increasing alcohol concentrations progressively (70°, 80°, 90°, and 95°) and embedded in paraffin at 56 °C. Sections of 3 μm were cut with a mechanical microtome (type HM315). Hematoxylin, light green, and eosin were used for staining. The tissue sections were subsequently mounted under a coverslip in Pertex. The reproductive stages were finally identified by a light microscope (Motic B1-223 SP). After examining all slides, the gametogenic stages were identified for males and females on the basis of the morphological characteristics of gonads, and the kinds of sexual cells contained in the gonadic tubules. The reproductive stages were determined according to a previous study scoring system with the four-stage classification adopted from Machreki-Ajmi (2009) (Table 1).

Sexual maturity index

In order to quantify the reproductive status of cockles, numbers from 0 to 5 were given to codify the different stages (Table 1). Each stage was categorized by a maturity factor (1, resting; 2, development; 3, gametogenesis; 4, maturity; 5, spawning; 2, spent); then, a sexual maturity index (SMI) was calculated according to the equation established by Siah et al. 2003:

$$SMI = \sum (\% \text{ of each sexual state} * \text{maturity factor}).$$

Semi-quantitative histology

Each slide performed for qualitative histology was scanned at magnification $\times 400$. The gonad area (GA), the adductor muscle area (AMA), the foot area (FA), and the total area were determined by the image analysis software IMAQ vision builder (National Instrument®). This analysis was based on the following script: (1) color images were transformed to gray-level images by means of the “color extraction” function, (2) the outlines of the histological section were defined by drawing with the “image mask” function, (3) the area of one tissue (gonad, adductor muscle, and foot tissue) was



Fig. 1 Sampling site in the Gulf of Gabès (Bayyadha)

determined by adjusting the gray-level threshold specific for this tissue, and (4) the area of each tissue (gonad, muscle, and foot) was determined using this following formula: $(\text{area of each tissue}/\text{total area}) \times 100$ (Fabioux et al. 2005).

Glycogen analysis

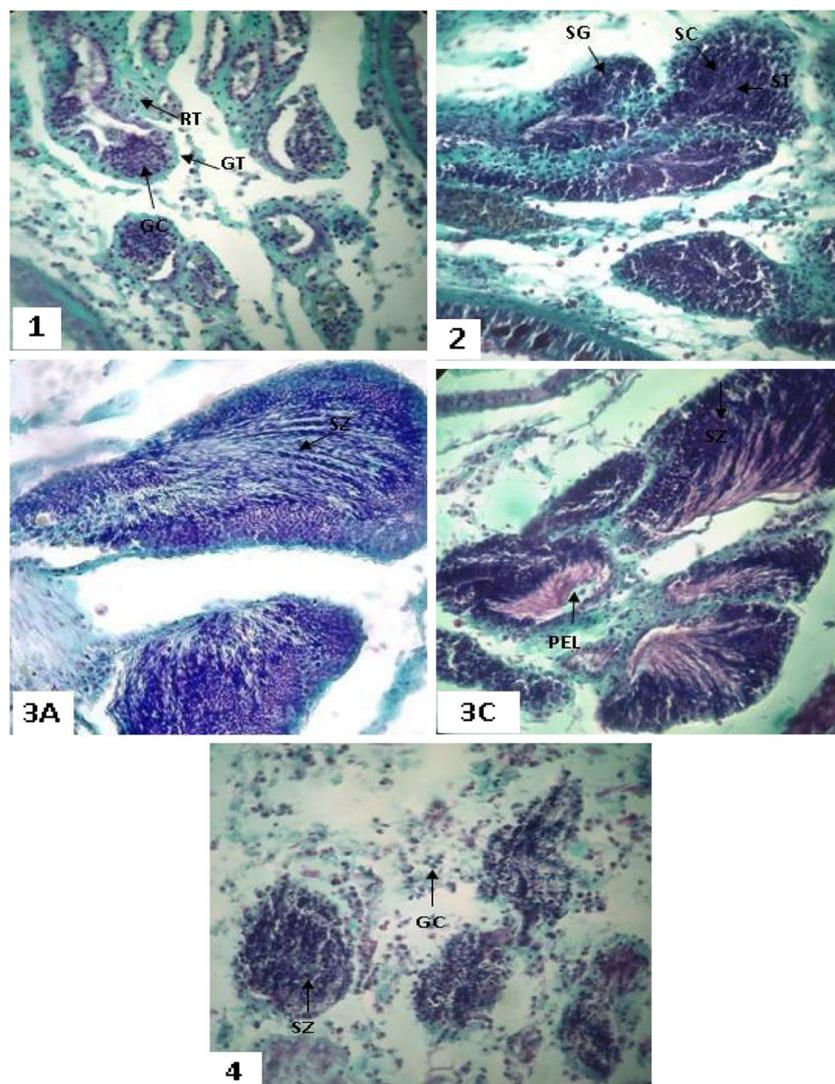
Twenty cockles were monthly dissected and frozen at -20°C . The glycogen concentrations were determined in the gonad, the adductor muscle, and the remainders. For each individual, glycogen was first extracted from the tissues and then hydrolyzed to glucose. In order to eliminate proteins, the samples (0.5 g) were homogenized in 2 ml of trichloroacetic acid (TCA 20 %) and then centrifuged ($8000g$, 5 min) at room temperature. The resulting supernatants were separated from the pellet (containing protein), added to 4 ml of absolute ethanol to

precipitate glycogen, and subsequently incubated for 5 min at 80°C . The resulting pellet (containing glycogen) was used for hydrolysis. The glycogen in the extracts was dissolved in 2.5 ml of water and then incubated with 0.5 ml 30 N HCL for 60 min at 100°C . The released glucose was analyzed using the colorimetric method developed by Sazaki et al. (1972). This experiment is based on the principle of binding orthotoluidine reagent to glucose in medium of acetic acid under boiling water conditions.

Statistical analysis

For the statistical analysis of the current study, we used the statistical package SPSS program (version 11). To check the equality of the variances, a Levene test was performed. The normal distribution was then checked by the P-Plot function.

Fig. 2 Gonadal development stages of *Cerastoderma glaucum* males. *Stage 1*, Resting; *2*, Development; *3A*, Gametogenesis; *3C*, Spawning; *4*, Spent. *RT* reserve tissue, *GT* gonadic tubules, *GC* germinal cells, *SG* spermatogonia, *SC* spermatocytes, *ST* spermatids, *SZ* spermatozoa, *PEL* partially empty lumen



A one-way ANOVA test was performed to examine differences between the means. The data were finally submitted to a Tukey's HSD test to determine the critical differences between the groups. Significance was set at $p < 0.05$ in all cases.

Results

Water temperature and salinity

The seasonal variations in salinity and water temperature at the Bayyadha site show that the highest levels of temperature were recorded in June (35 °C) and September (33 °C), whereas the lowest were in February (14 °C). The highest rate (44.1 %) of salinity was recorded in March while the lowest (38.3 %) was in April which corresponded to a period of heavy rainfall.

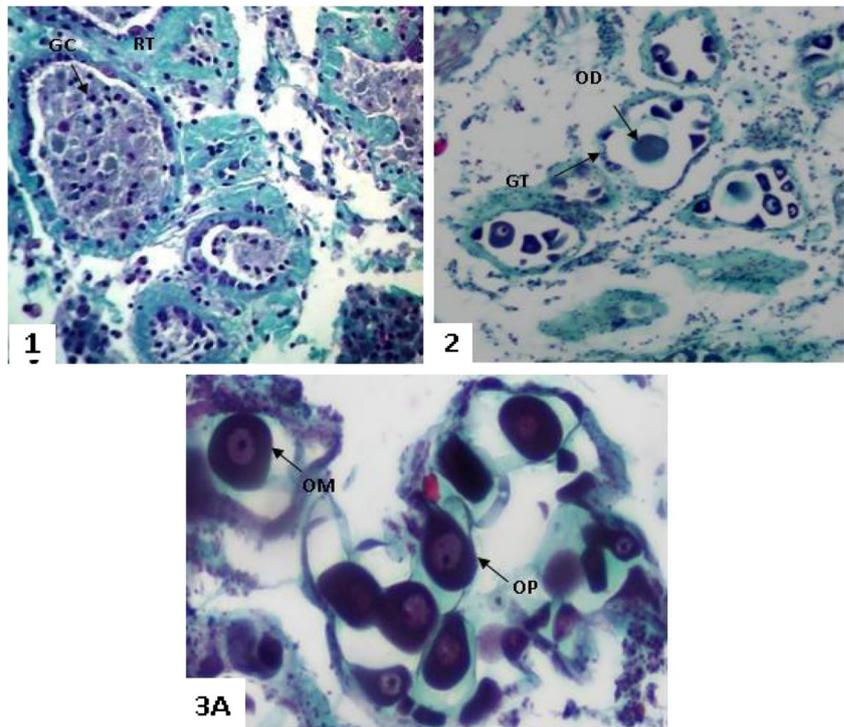
Sex ratio

Among the 195 cockles examined, 63.43 % were male and 36.55 % were female. Figure 6 outlines the percentage of males and females for each month. In the following 7 months (February, May, June, August, October, December, and January (J2) 2008), the predominance was for females whereas for the remaining months (January (J1) 2007, March, April, July, September, and November), it was in favor of males. No hermaphrodites were found during the studied period.

Condition index

The seasonal changes in the condition index (CI) of *Cerastoderma glaucum* collected from the Bayyadha site are illustrated in Fig. 7. During the studied period, no significant differences were observed between sexes (ANOVA, $P < 0.05$). Consequently, the results presented in Fig. 7 include those from both males and females. From January (J1) 2007 to

Fig. 3 Gonadal development stages of *Cerastoderma glaucum* females. *Stage 1*, Resting; *2*, Development; *3A*, Gametogenesis. *RT* reserve tissue, *GT* gonadic tubules, *GC* germinal cells, *OD* oocyte in development, *OP* pedunculated oocyte, *OM* oocyte mature



April, CI significantly increased ($P < 0.05$) to reach 16.26 % and then significantly decreased ($P < 0.05$) and remained stagnant for the others months.

Gametogenesis and reproductive cycle

The reproductive stages of *Cerastoderma glaucum* observed during the present study are described in Table 1 and illustrated in Figs. 2 and 3. Some sexual stages could not be observed for both males and females during the entire period of study (Fig. 4). Spawning and spent stages were present in males but not in females. The maturity stage, observed by Machreki-Ajmi (2009), was not detected in both sexes in this study.

Seasonal variations of sexual maturity index (SMI)

The seasonal variations in the (SMI) of *Cerastoderma glaucum* collected from the Bayyadha site are illustrated in Fig. 5. The SMI changes are synchrones in both sexes from January (J1) to November. Nevertheless, they become asynchrones in December and January (J2). The highest values of SMI were observed in March, June, and October. As mentioned above during these months, the majority of cockles are in gametogenesis stage. However, the lowest values of SMI were observed in April, August, and November when the majority of cockles are in spent and resting stages.

Gametogenic cycle

During this study, the cockle population presented sexes that were separated and with no hermaphrodite individuals. The results represented in Fig. 4 show evidence of a three-period reproduction in this population. These periods were synchronically observed for both sexes. The first period of reproduction covered 4 months from January (J1) 2007 to April (winter period). For both sexes, the resting stage occurred in January (J1) 2007 (100 % for males and 70 % for females) and continued into February (44.4 % for males and 33.3 % for females). The gametes reached the development stage in January (J1) 2007 for females (30 %) and February (60 %) for males. By March, the majority of males (57.14 %) and females (75 %) had reached the gametogenesis stage. In April, females were in sexual rest, while 17.39 % of males were in the spawning stage.

The second period spread over 3 months, from May to July (end of spring period). In May, the majority of the population was sexually inactive (with 11.11 and 77.7 % of individuals being respectively in spent and resting stages), whereas the majority of female population was active (with 33.3 and 60 % of individuals being respectively in the development and gametogenesis stage). In June, the majority of males (60 %) and the totality of females were in the gametogenesis stage. In July, the majority of males (76.92 %) were in the spent stage, 7.96 % already spawned, and 15.38 % reached the resting stage. At that time, all the females were in the resting stage.

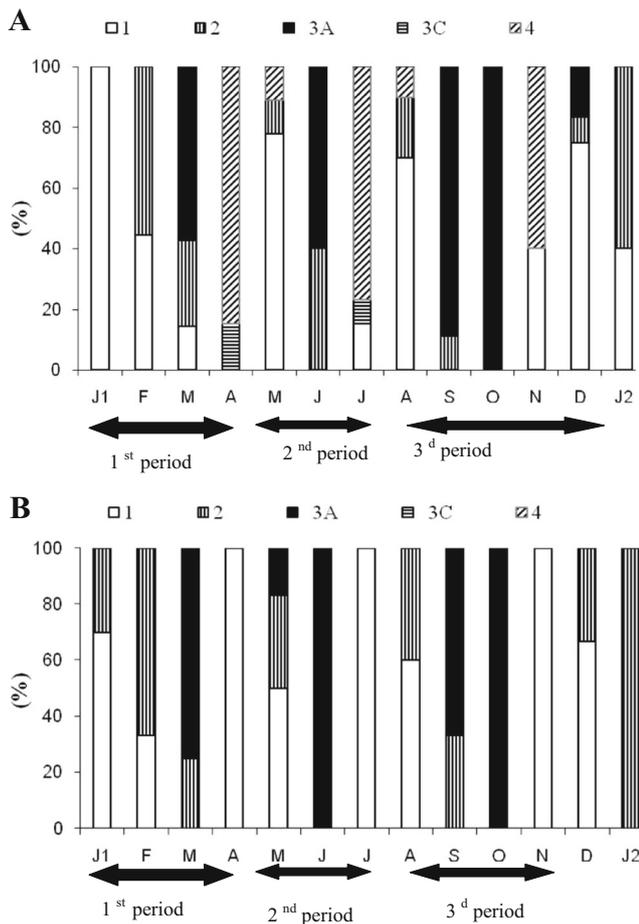


Fig. 4 Reproductive stages of males and females of *Cerastoderma glaucum* in each monthly sample collected at Bayyadha site, from January (J1) 2007 to January (J2) 2008. Percentages of cockles corresponding to each stage are identified by different bar patterns. 1, Resting; 2, Development; 3A, Gametogenesis; 3C, Spawning; 4, Spent

Table 1 Description of reproductive stages for male and females of *Cerastoderma glaucum*

Reproductive stages	Description of reproductive stages
Males	
Stage 1 (Resting) (Fig. 3, 1)	The gonad was invaded by the reserve tissue. Gonadic tubules contain only undifferentiated germinal cells
Stage 2 (Development) (Fig. 3, 2).	There is a progressive increase in the volume of gonadic tubules which are filled by cells representing various stages of development (spermatogonia, spermatocytes, and spermatids)
Stage 3 (A) (Gametogenesis) (Fig. 3, 3A)	Gonadic tubules were increased in volume with numerous spermatogonia, spermatocytes, and spermatids, whereas few spermatozoa are observed in the lumen. The reserve storage tissue was considerably reduced
Stage 3 (C) (Spawning) (Fig. 3, 3C)	The males have a dense band of ripe spermatozoa surrounding a partially empty lumen
Stage 4 (Spent) (Fig. 3, 4)	Degenerated spermatozoa occupied a very little part of the gonad volume. Germinal cells appeared in the gonadic tubules
Females	
Stage 1 (Resting) (Fig. 4, 1).	This stage is characterized by an abundance of the connective tissue of reserve and by a total lack of gametes.
Stage 2 (Development) (Fig. 4, 2).	Gonadic tubules contain immature oocytes attached to the basal membrane and few mature oocytes were observed in the lumen
Stage 3 (A) (Gametogenesis) (Fig. 4, 3A)	Gonadal tubules with many free mature oocytes. Some pedunculated oocytes were still present within the tubules

Fig. 5 Evolution of sexual maturity index from January (J1) (2007) to January (J2) 2008 for cockles from Bayadha site, $n=35$

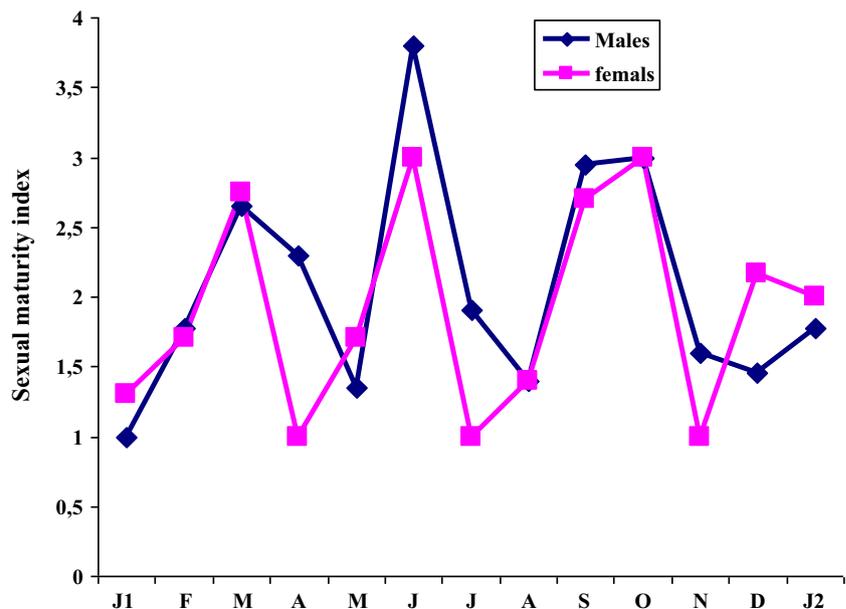
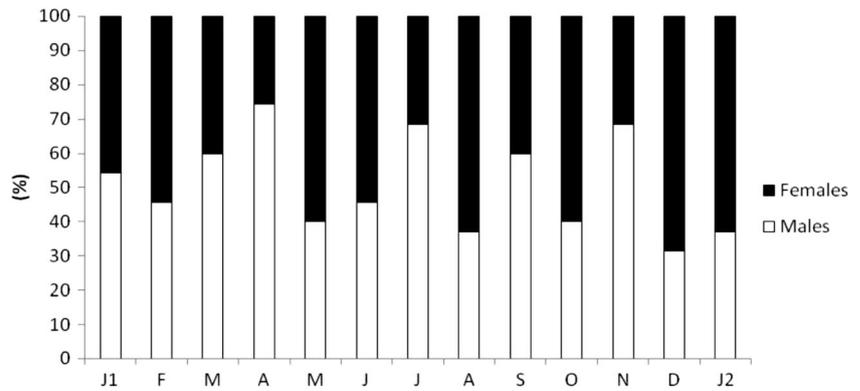


Fig. 6 Percentages of males and females for each month from Bayyadha site $n=35$



The third period lasted for 4 months from August to November (autumn period). This period began with the resting stage (70 % for males and 60 % for females). The development stage covered 2 months: August (20 % for males and 40 % for females) and September (11.1 % for males and 33.3 % for females). The gametes reached the gametogenesis stage in September (88.8 % for males and 66.6 % for females) and continued until October (100 % for both sexes). In November, the totality of males and females were inactive. In December and January (J2) 2008, a new gametogenic cycle started for the whole population with an important proportion in resting (75 % for males and 66.6 % for females) and in the development stage (8.33 % for males and 33.33 % for females).

Degree of occupation of tissues

Figure 8 represents the surface area occupied by gonad (DOG), adductor muscle (DOM), and foot (DOF) tissues of the *Cerastoderma glaucum*, from the studied site according to the different stages of reproduction. For the three studied tissues, no significant differences were observed between males and females in the degree of occupation. For this reason, we analyzed the results based

on the average values of both sexes. For the different stages, we have combined males and females and we have taken into consideration the predominant stage in each month.

Gonad

Through the studied period, the highest and the lowest values of DOG were respectively observed at the gametogenesis and spent stages of each period of reproduction. Statistical differences ($p < 0.05$) were observed between the third period of reproduction and respectively the first and the second periods. During the first period of reproduction (January (J1) 2007 to April), the DOG increased significantly reaching a maximum rate (16.35 %) at the gametogenesis stage then decreased at the spent stage. During the second period (May–July), the DOG was at maximum value (16.8 %) in the gametogenesis stage and at minimum value at the spent stage (9.45 %). In the third period of reproduction (August–November), the DOG increased significantly from the resting to the gametogenesis stage to reach a maximum value (22.8 %) and then dropped significantly to reach the lowest level (8.63 %) at the spent stage.

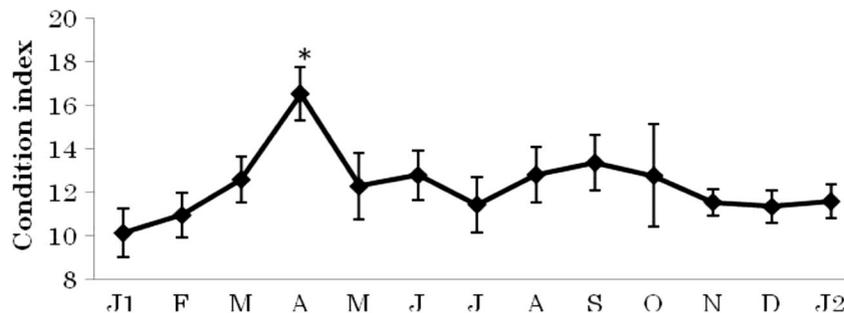


Fig. 7 Mean condition index of *Cerastoderma glaucum* from Bayyadha site (*statistically significant differences, $P < 0.05$) between consecutive months)

Adductor muscle

The DOM (Fig. 8b) ranged from 8.6 % (spent stage of the first period of reproduction) to 13.81 % (last development stage). No significant differences in DOM were found during the studied period of reproduction, except for the first period during which a significant downfall was observed from the gametogenesis to the spent stage.

Foot

The variations of DOF are represented in Fig. 8c. In the first and third period of reproduction, no significant differences in DOF were observed between the four reproductive stages. During the second period, the DOF increased significantly to reach a maximum value (22.39 %) at the gametogenesis stage; then, it decreased and kept stable for the remaining stages.

Glycogen concentrations

Variations in glycogen concentrations in the gonad, the adductor muscle, and the remainder (foot, siphons, and mantle) during the reproductive cycle are reported in Fig. 9a–c, respectively. Glycogen concentrations of males and females, and the analysis of the results were thus based on the mean values of both sexes.

Gonad

The highest value of glycogen concentrations (97.74 mg/g w. w) was recorded in June when the majority of the population was at the gametogenesis stage of the second period of reproduction, while the lowest (7.04 mg/g w. w) was registered in January (J2) 2008 when the majority of population was at the development stage. During the first period of reproduction (January (J1) 2007 to April), no significant differences in glycogen concentrations were calculated between the four reproductive stages. In the second and third periods, the highest values (respectively 97.76 mg/g w. m and 83.38 mg/g w. w) were recorded in June and September when the majority of the population was at the gametogenesis stages, whereas the lowest ones (respectively 51.81 and 44.10 w. w) were recorded in July and November when the majority of the population was at the resting stage.

Adductor muscle

During the first period of reproduction, glycogen concentrations showed no significant differences between the four reproductive stages. In the second period, the glycogen concentrations increased significantly from May (when

the majority of the population was at the resting stage) to July (the majority of population was at the spent stage) to attain a maximum value (53.31 mg/g w. w), and then decreased significantly to reach a minimum value (6.79 mg/g w. w) in November (the majority of the population was at the spent stage of the third period of reproduction).

The remainder

For the remainder, no significant differences in glycogen concentrations were observed either in the first or in the second period of reproduction. For the third period, the maximum value (30.09 mg/g w. w) was registered in August (the majority of the population was in the resting stage) and the minimum value (4.41 mg/g w. w) was observed in November (the majority of the population was at the spent stage).

Discussion

The information available regarding the reproductive cycle of *Cerastoderma glaucum* in Tunisia remains limited to a small number of publications (Zaouali 1974; Machreki-Ajmi 2009). In this work, we provide a better estimation of the reproductive cycle of *Cerastoderma glaucum* from the Gulf of Gabès using both quantitative and semi-quantitative methods. Based on qualitative histological data, the present work shows that in both sexes, there is proof of three synchronic reproductive periods in the cockle *Cerastoderma glaucum* in the Bayyadha site. Each period is initiated by a resting and development phase and ended by a period of gonad inactivity (resting and spent stages). In general, we observed four predominant stages for males (resting, development, gametogenesis, and spent) and only three for females (resting, development, and gametogenesis). Spawning and spent stages were observed in males but not in females. The maturity stage observed in the *Cerastoderma glaucum* according to Machreki-Ajmi 2009 was not observed in both sexes in our study. This finding could be attributed to the fact that the gametogenesis of our species took place too quickly. So, we cannot observe some stages such as maturity stage. Besides, we noticed that for each period of reproduction, the gametogenesis happened at varying temperatures over 19 °C in March in the winter period ((January (J1) 2007 to April), in June (35 °C) for the end of spring period (May–July), and in September (33 °C) for the autumn period (August–November). In agreement with the current study, several authors have asserted that water temperature is the most important environmental factor that influences the timing and duration of the gametogenic cycle for the different bivalves such as the *Cerastoderma glaucum* (Zaouali 1974; Guillou et al. 1990). We saw that for each period of reproduction, the

Fig. 8 Variation in area occupation of gonad (A), adductor muscle (B) and foot (C) according to the development stages of the cockle *Cerastoderma glaucum* from January (J1) 2007 to January (J2) 2008. (Means \pm confidence intervals at 95%) ($n=15$) Stages: R (1): Resting; D (2): Development G (3A): Gametogenesis S (4): spent. (*Statistically significant differences, ($P<0.05$) between consecutive stages)

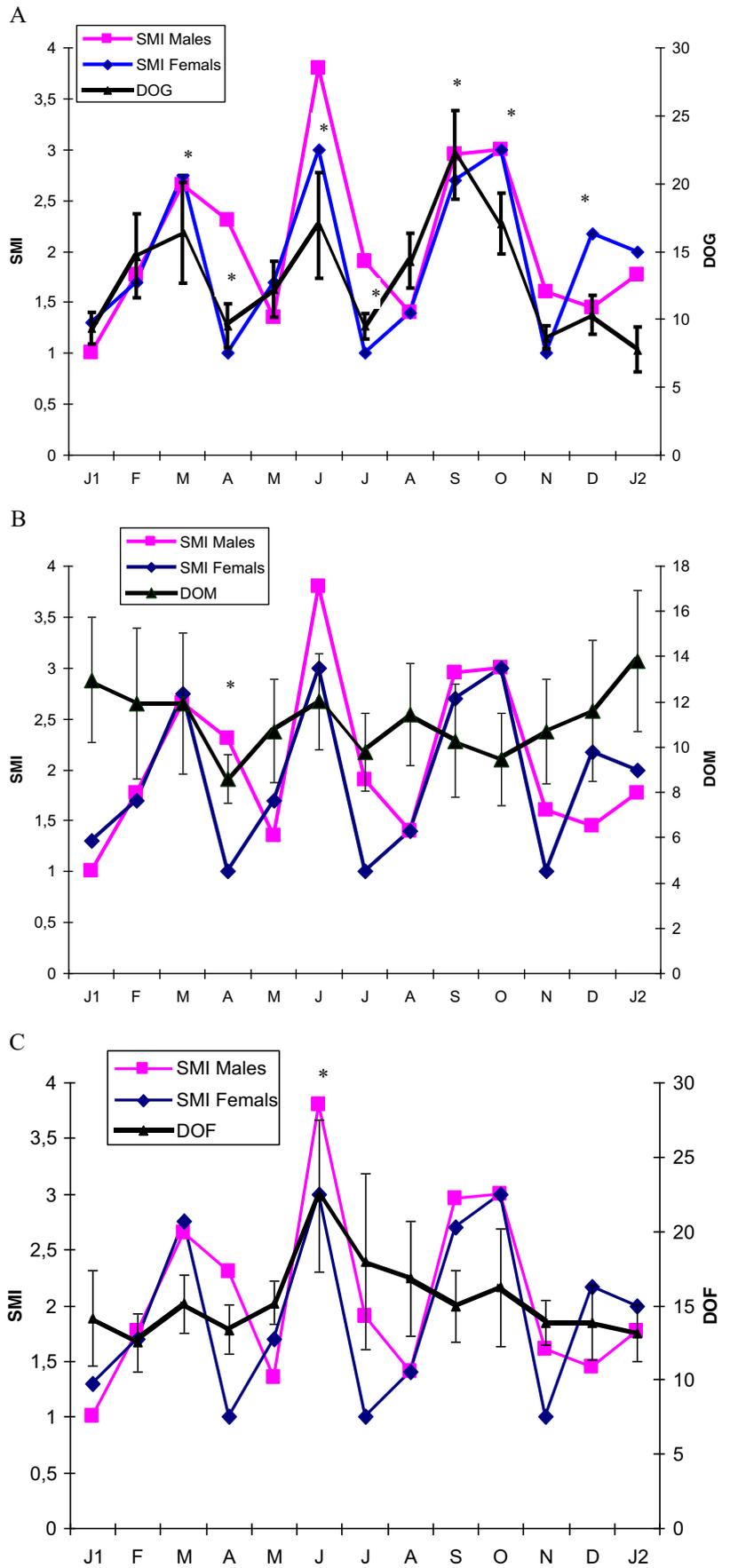
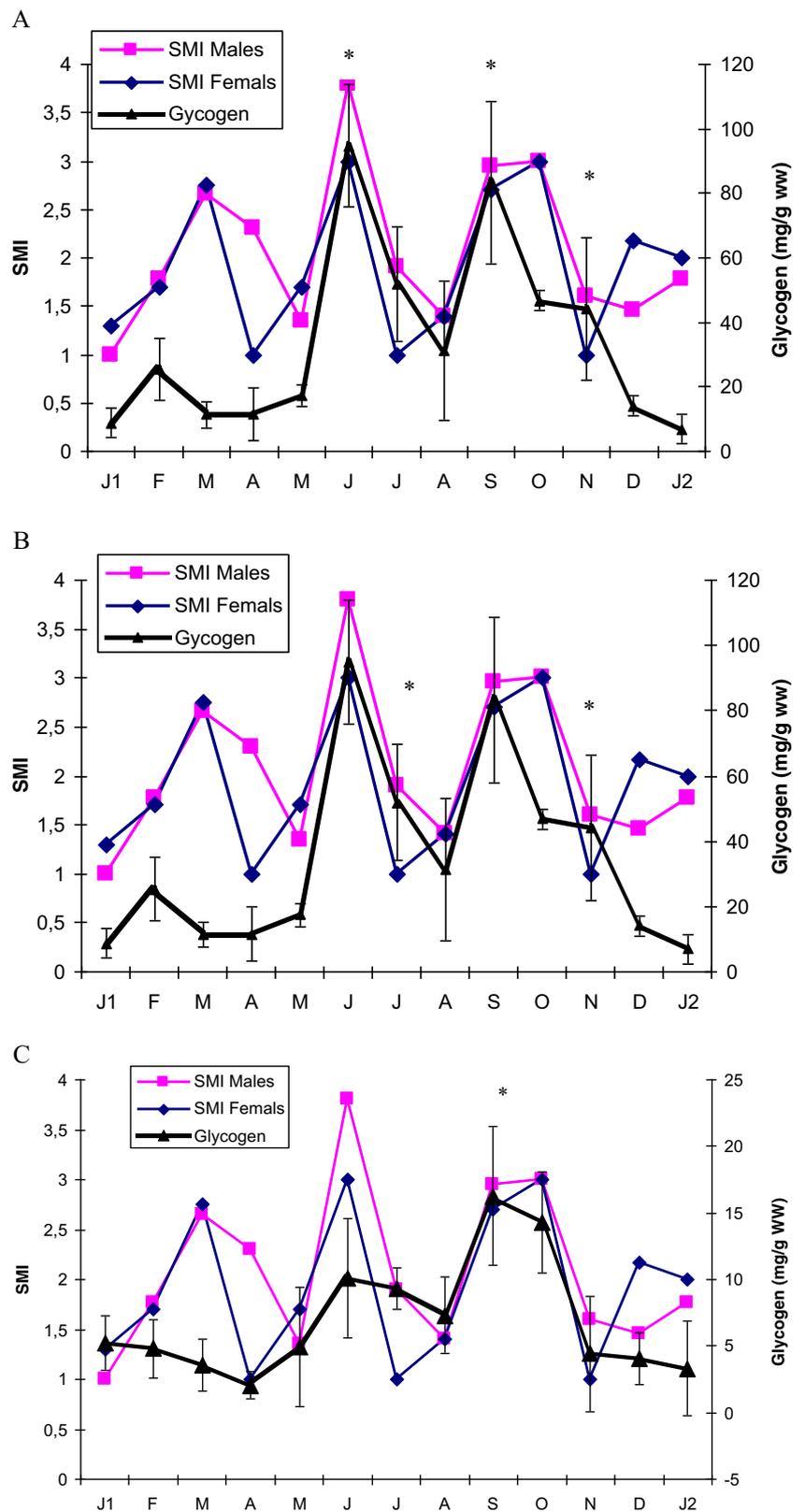


Fig. 9 Glycogen concentrations (means±confidence intervals at 95 %) in the three studied tissues (gonad, adductor muscle, and remainder) ($n=20$) of the cockle *Cerastoderma glaucum* from Bayyadha site according to the development stages. R(1), resting; D(2), development; G(3A), gametogenesis; S(4), spent. * $P<0.05$, statistically significant differences between consecutive stages



duration of sexual rest was more important than that of the gametogenesis, because the gonad exhibited a long period of

sexual rest (gonad inactivity) after the three gametogenesis phases. In fact, the cockle species uses a lot of energy during

the gametogenesis phase, which needs a long resting period before the beginning of a new reproductive cycle. According to previous studies (Chicaro and Chicaro 2001; Perez-Camacho et al. 2003), salinity could also affect the growth and reproductive activity of bivalves in general, and of cockles in particular. In reality, several authors have asserted that cockles' species has a high capacity to tolerate great salinity variations (Gimazane 1971; Zaouali 1974). In our study, the *Cerastoderma glaucum* specimens seem to withstand high variations of salinity (38–44 ‰) and are even able to spawn under these conditions.

The *condition index (CI)* is generally considered to reflect the reproductive activity and changes in the physiological condition of bivalves in relation to environmental factors (temperature and nutrient supply) (Fernandez Castro and De Vido De Mattio 1987; Massapina et al. 1999; Ojea et al. 2004). In our study, the results show that CI remained stable during the studied period, and a significant increase was observed only in spring (April). This could consequently be due to the rising water temperature during this period. It could also be related to the nutrient supply that seems to be more important in April because of the heavy rainfall registered in this month.

As far as the *sex ratio is concerned*, the analysis shows a predominance of males during 6 months (January (J1) 2007, March, April, July, September, and November). This predominance can be related to an important mortality rate among the female population (Berthelin et al. 2000; Drummond et al. 2006a, b; Royer et al. 2008). In fact, we noted that the female population undergoes an intense gonadic activity during this period (except January (J1) 2007 and November) which needs to mobilize a lot of energy for the gametes' maturation. The important mortality rates are always related to this intense gonadic activity (Soletchnik et al. 2006a, b; Royer et al. 2008).

The polymodal cycle is a characteristic of the cockle' species in Tunisia and in other countries around the world. In fact, the gametogenic cycle of *Cerastoderma glaucum* in the Bayyadha site (Gulf of Gabes) generally appears similar to that described by Machreki-Ajmi 2009 for the same species in Ras Ungha (Gulf of Gabes), except for the discrepancy of 1 month between the spawning periods of this species. These differences in the spawn timing would probably be linked to variations in seawater temperature between the two sites (Drummond et al. 2006a, b). In the case of the *Cerastoderma edule* from the north of Bretagne (France), Guillou et al. (1990) reported that the reproductive cycle of this species is characterized by a succession of partial spawnings that start in the spring and continue during the summer and autumn when thermal conditions are favorable.

The histological quantitative approach by image analysis has been widely used in studying marine bivalve reproduction, including mussels (Lowe et al. 1982), clams (Morvan and Ansell 1988; Heffernan and Walker 1989), scallops

(Sundet and Lee 1984), and oysters (O'Beirn et al. 1996; Enriquez-Diaz 2004; Royer et al. 2008). The present study is the first to use the quantitative approach in investigating the reproductive cycle of the *Cerastoderma glaucum* cockle in Tunisia. The data of the image analysis included the percentages of occupation of the adductor muscle (DOM), the gonad area (DOG), and the foot (DOF) in terms of the different stages of reproduction. The DOG results showed that during the three periods of reproduction, this parameter increased from the resting to gametogenesis stages as gonadic development progresses, and then decreased from the gametogenesis to the spent stage in response to the gametes release. This observation is in accordance with previous studies dealing with the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Fabioux et al. 2005; Royer et al. 2008). When comparing the percentage of occupation of the three organs, the gonad and foot surface seem to be higher than that of the adductor muscle which did not vary during the period of study. Although many authors reported that the adductor muscle tissue is the most used to withstand energy during gametogenesis in Pectinidae, Veneridae, and Cardidae (Barber and Blake 1985, Mac Donald and Thompson 1986; Mathieu and Lubet 1993), our results on DOM enabled us to suppose that the gonad and foot were more involved than the adductor muscle in the storage and mobilization of the glycogen reserves. In order to better elucidate the involvement of these organs (gonad, adductor muscle, and foot) in this process, measuring glycogen in these organs was necessary.

In the second part of this study, we examined the seasonal changes in the glycogen concentrations of the *Cerastoderma glaucum* in relation to the gametogenic cycle. Glycogen was practically chosen because it has a main role in providing energy for the gametogenesis in bivalves (Ansel 1972; Ansel et al. 1980; Barber and Blake 1985; Mathieu and Lubet 1993; Ojea et al. 2004). During the end of spring (May–July) and the autumn (August–November) periods, the glycogen concentrations increased respectively in the gonad area from May and August when the majority of population was in resting stages to June and September when the most of population was in gametogenesis stages. This result reflects the important storage of this nutrient in the tissue in order to be used later as energy source during the end of gametogenesis. Moreover, in the two later periods (end of spring and autumn periods), a decrease in glycogen concentrations was observed respectively from June and September when the majority of population was in gametogenesis stages to August and December when the most of population was in spent stages. This decrease could be due to the use of stored glycogen during the activity of gonad as has been described for other species of bivalves such as mussels, clams, and oysters (Ojea et al. 2004; Lemaire et al. 2006; Dridi et al. 2007; Serdar and Lök 2009). In the winter period (January (J1) 2007 to April), we observed low glycogen concentration in the gonad probably attributed to

severe environmental conditions recorded in this period (decrease in seawater temperature and probably a lack of food). This result is in accordance with previous studies (Fernandez Castro and De Vido De Mattio 1987; Perez-Camacho et al. 2003; Soletchnik et al. 2006a, b; Mouneyrac et al. 2008) demonstrating that quantities of energetic reserves stored (practically glycogen) are strongly correlated to favorable environmental conditions (availability of food and temperature).

In the adductor muscle, although DOM remained constant through the reproductive cycle, high glycogen concentrations were observed in July when the majority of population was at the spent stages. This result could indicate that glycogen was stored in the muscle during the resting period in order to be remobilized later during the reproductive activity. The same observation has been described by Ojea et al. 2004 and Serdar and Lök 2009 in the clam *R. decussatus*. Contrary to these results, studies performed on the oyster's adductor muscle (Berthelin et al. 2000; Li et al. 2009) reported that glycogen concentrations did not vary during the studied period, leading to the conclusion that in oysters, this organ has a minor transitory storage role.

In the *Cerastoderma glaucum* remainder, high glycogen concentrations were accumulated in August to be used later during the gametogenesis activity. However, glycogen concentrations remained always at low concentrations during the end of spring and the autumn periods. Similar observations on the remainder of the clam *R. decussatus* have been reported by Beninger et al. (2003), Rodriguez-MoscOSO and Arniaz (1998), and Ojea et al. (2004). On the contrary, Ketata et al. 2007 have reported that in *R. decussatus*, glycogen was present in the remainder at low levels at the beginning of the reproductive cycle and subsequently tended to increase as gametogenesis progresses.

Based on the relationship between the gonad development and the accumulation and utilization of glycogen nutrients, species can be classified as either conservative or opportunist (Perez-Camacho et al. 2003). In several conservative species such as the *Argopecten purpuratus*, *R. decussatus* (Ojea et al. 2004), and *Argopecten irradians concentricus* (Barber and Blake 1981), gametogenesis depends largely on the amount of glycogen stored. However, in other species, the storage reserves and the gametogenic cycle exhibited an opportunistic activity (e.g., *Ostrea edulis*; Bayne 1976). Indeed, in this opportunistic species, gametogenesis occurs not only when there is an abundance of food in the environment but also when gonadal development occurred at the expense of accumulation of nutrients. In our study, the glycogen pattern suggests that the *Cerastoderma glaucum* from the Bayyadha site adopts a conservative strategy since in the end of spring and the autumn periods, gametogenesis took place at the expense of the glycogen stored in the three organs (the gonad, the remainder, and the adductor muscle).

Conclusion

This study is the first to demonstrate the relationship between the reproductive cycle of the cockle *Cerastoderma glaucum* and the management of the glycogen reserves in the Bayyadha site. In fact, the description of the reproductive cycle of the *Cerastoderma glaucum*, in this study, provides a valuable insight for a possible exploitation of this species. This is important for the sustainable management of stocks, as well as for future aquacultural projects for this species whose commercial value is not yet recognized in Tunisia. In the same way, the detailed knowledge of the gametogenic and spawning period and the energy storage, as described in this study, may also allow us to predict the optimal reproductive time for the introduction of artificial spawning in aquaculture.

Acknowledgments The authors have the honor to express their gratitude to the English Cultural Center of Sfax Tunisia, Mme Sabine Fersi, english teacher in high school, 15 November 1995, Sfax, Tunisia, and Mme Guebsi from the English Literature Department at the University of Sfax for careful reviewing and constructively editing this manuscript. The authors thank miss Feten Guebsi for the advice and comments on the manuscript.

References

- Ansel AD (1972) Distribution, growth and seasonal changes in biochemical composition for the bivalve *Donax vittatus* from kames Bay, Millport. *J Exp Mar Biol Ecol* 10:137–150
- Ansel AD, Barnett PRO, Body A, Massé H (1980) Upper Temperature tolerances of some European Molluscs. III. *Cardium glaucum*, *C. tuberculatum* and *C. edule*. *Mar Biol* 65:177–183
- Barber BJ, Blake NJ (1981) Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *J Exp Mar Biol Ecol* 52:121–134
- Barber BJ, Blake NJ (1985) Intra-organ biochemical transformations associated with oogenesis in the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (say), as indicated by ¹⁴C incorporation. *Biol Bull* 168:39–49
- Bayne BL (1976) Aspects of reproduction in bivalve molluscs. In: Wiley ML (ed) *Estuarine processes*. Academic, New York, pp 432–448
- Beninger PG, Le Pennec G, Le Pennec M (2003) Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L. *Biol Bull* 205:83–92
- Berthelin C, Kellner K, Mathieu M (2000) Storage metabolism in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp Biochem Physiol B* 125:359–369
- Chicaro L, Chicaro MA (2001) Effects of environmental conditions on planktonic abundances, benthic recruitment and growth rates of the bivalve mollusc *Ruditapes decussatus* in a Portuguese lagoon. *Fish Res* 53:235–250
- Dridi S, Romdhane MS, Elcafsi M (2007) Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizerte lagoon, Tunisia. *Aquaculture* 263:238–248

- Drummond L, Mulcahy M, Culloty S (2006) The reproductive biology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, from the North-West of Ireland. *Aquaculture* 254:326–340
- Enriquez-Diaz MR (2004) Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale. 189 pp.
- Fabioux C, Huvet A, Le Souchu P, Le Pennec M, Pouvreau S (2005) Temperature and photoperiod drive in *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250(12):458–470
- Fernandez Castro N, De Vido De Mattio N (1987) Biochemical composition, condition index and energy value of *Ostrea puelchana* : Relationship with the reproductive cycle. *J Exp Mar Biol Ecol* 108:113–126
- Gimizane JP (1971) Introduction à l'étude expérimentale du cycle sexuel de *cardium edule*. Th. Doct. Sp., Univ. CAEN, pp 1-125
- Guillou J, Bachelet G, Desprez M, Ducrottoy JP, Madani I, Rybarczyk H, Sauriau PG, Sylvand B, Elkaim B, Glemarec M (1990) Les modalités de la reproduction de la coque (*Cerastoderma edule*) sur le littoral français de la manche de l'Atlantique. *Aquat Living Resour* 3:29–41
- Hamza-Chaffai A, Pellerin J, Amiard JC (2003) Health assessment of a marine bivalve *Ruditapes decussatus* from the Gulf of Gabes (Tunisia). *Environ Int* 28:609–617
- Hanquet-Dufour AC, Kellner K, Heude C, Naimi A, Mathieu M, Poncet JM (2006) Cryopreservation of *Crassostrea gigas* vesicular cells : viability and metabolic activity. *Cryobiology* 53:28–36
- Heffernan PB, Walker RL (1989) Quantitative image analysis methods for use in histological studies of bivalve reproduction. *J Molluscan Stud* 55:135–137
- Ivell R (1979) The biology and ecology of a brackish lagoon bivalve, *Cerastoderma glaucum* bruguière, in lago lungo, Italy. *J Molluscan Stud* 45:364–382
- Ketata I, Smaoui-Damak W, Guermazi F, Rebai T, Hamza-Chaffai A (2007) In situ endocrine disrupting effects of cadmium on the reproduction of *Ruditapes decussatus*. *Comp Biochem Physiol C* 146: 415–430
- Lemaire N, Pellerin J, Fournier M, Girault L (2006) Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *mytilus* spp. from farm sites of eastern Quebec. *Aquaculture* 261:729–751
- Li Y, Qin JG, Li X, Benkendorff K (2009) Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). *Aquaculture* 286: 64–71
- Lowe DM, Moore MN, Bayne BL (1982) Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *J Mar Biol Assoc UK* 62:133–145
- Mac Donald BA, Thompson RJ (1986) Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus*. III. Physiological ecology, gametogenic cycle and scope for growth. *Mar Biol* 93:37–48
- Machreki-Ajmi M. 2009. Validation des biomarqueurs de pollution chez le mollusque bivalve *Cerastoderma glaucum* issu du golfe de Gabès : Etude *in situ* et transplantation *in vivo*. Thèse de doctorat. Université de Sfax. Faculté des sciences de Sfax
- Machreki-Ajmi M, Hamza-Chaffai A (2006) Accumulation of cadmium and lead in *Cerastoderma glaucum* originating from the Gulf of Gabès (Tunisia). *Bull Environ Contam Toxicol Mar* 76(3):529–537
- Machreki-Ajmi M, Ketata I, Ladhari-Chaabouni R, Hamza-Chaffai A (2008) The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers in *Cerastoderma glaucum*. *Ecotoxicology* 17:1–11
- Massapina C, Joaquim S, Matias D, Devauchelle N (1999) Oocyte and embryo quality in *Crassostrea gigas* (Portuguese strain) during a spawning period in Algarve, South Portugal. *Aquat Living Resour* 12:327–333
- Mathieu M, Lubet P (1993) Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves- a brief review. *Invertebr Reprod Dev* 23:123–129
- Matus de la Perra A, Garcia O, San JF (2005) Seasonal variations on the biochemical composition and lipid classes of the gonadal and storage tissues of *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle. *J Shellfish Res* 24(2):457–467
- Morvan C, Ansell AD (1988) Stereological methods applied to reproductive cycle of *Tapes rhomboides*. *Mar Biol* 97:355–364
- Mouneyrac C, Linot S, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Métais I, Durou C, Minier C, Pellerin J (2008) Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination. *Gen Comp Endocrinol* 157:133–141
- O'Beirn FX, Heffernan PB, Walker R, Jansen ML (1996) Young-of-the-year oyster, *Crassostrea virginica*, reproduction in coastal Georgia. *Estuaries* 19:651–658
- Ojea J, Pazos AJ, Martinez NS, Sanchez JL, Abad M (2004) Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* 238:451–468
- Perez-Camacho A, Delgado M, Fernandez-Reiriz U, Labarta MJ (2003) Energy balance, gonad development and biochemical composition in the clam *Ruditapes decussatus*. *Mar Ecol Prog Ser* 25(8):133–145
- Rodriguez-Moscoso E, Amiaz R (1998) Gametogenesis and energy storage in a population of the grooved carpet-shell clam, *Tapes decussatus* (Linné, 1787), in northwest Spain. *Aquaculture* 162: 125–139
- Royer J, Segueineau K, Kyung-II P, Pouvreau S, Kwang-Sik C, Costil K (2008) Gametogenic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy. *Aquaculture* 277:313–320
- Sazaki T, Masto S, Sonae A (1972) Effect of acetic acid concentration on the colour reaction in the O-toluidine boric acid method for blood glucose estimation. *Rinsho Kagaku* 1:346
- Serdar S, Lök A (2009) Gametogenic cycle and biochemical composition of the transplanted carpet shell clam *Tapes decussatus*, Linnaeus 1758 in Sufa (Homa) Lagoon, Izmir, Turkey. *Aquaculture* 03:052
- Shafee MS, Daoudi M (1991) Gametogenesis and spawning in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia), from the Atlantic coast of Morocco. *Aquat Fish Manag* 22:203–216
- Siah A, Pellerin J, Amiard JC, Pelletier, E, Vigliano L (2003) Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to in situ contamination to organotins and heavy metals in the St. Lawrence River (Canada). *Comp Biochem Physiol* 135:145–156
- Soletchnik P, Faury N, Gouletquer P (2006) Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes–Oléron bay (France). *Aquaculture* 252(2–4):328–338
- Sundet JH, Lee JB (1984) Seasonal variations in gamete development in the Iceland scallop *Chlamys islanda*. *J Mar Biol Assoc UK* 64:411–416
- Zaouali J (1974) Les peuplements malacologiques dans les biocoenses lagunaires tunisiennes. Etude de la biologie de l'espèce prionnière *Cerastoderma glaucum*. Poiret. Thèse de doctorat. Université de Caen. pp 345

Thèse de Doctorat

Sahar KARRAY

Etude écotoxicologique et phylogéographique de la coque Cerastoderma glaucum issue du golfe de Gabès. Réponse adaptative (in situ et in vivo) au stress métallique et structure génétique.

Ecotoxicology and phylogeography studies of the cockle Cerastoderma glaucum from the gulf of Gabès. Adaptive response (in situ and in vivo) to metal stress and genetic structure.

Résumé

Cerastoderma glaucum est un modèle biologique de choix pour des études phylogéographiques et écotoxicologiques.

Une étude de sa structure génétique en méditerranée occidentale a été réalisée en utilisant deux types de marqueurs, mitochondrial et nucléaire. Les résultats obtenus ont révélé à travers l'ADN mitochondrial une population très divergente de toutes les autres populations (Ellouza, Sud de la Tunisie).

Une étude écotoxicologique sur des populations issues de ce site Ellouza et deux autres sites à proximité dans la région du golfe de Gabès a été réalisée dans le but d'étudier la réponse adaptative des populations de la coque *C. glaucum* en milieu naturel à différents niveaux de l'organisation biologique allant du niveau individuel jusqu'au niveau cellulaire et moléculaire. En parallèle à cette étude, deux expérimentations en laboratoire ont été réalisées afin de préciser les mécanismes pouvant expliquer le succès ou l'échec du maintien des populations de *C. glaucum*. La première expérimentation a été réalisée en utilisant des effluents industriels et la deuxième en utilisant un contaminant pur le cadmium. Les niveaux de l'organisation biologique concernés par cette étude étaient le niveau individuel et le niveau moléculaire. Différents biomarqueurs impliqués dans la réponse à différents types de stress : (MT), (ABC1), (MnSOD et CuZnSOD), (CAT), (HSP70) et (COI) ont été utilisés en milieu naturel ainsi qu'en conditions contrôlées et les résultats obtenus ont montré l'importance du métabolisme énergétique dans la réponse au stress quelque soit l'approche utilisée (*in situ*/ expérimental) à travers la régulation de l'expression du gène COI.

Mots clés : Cerastoderma glaucum, Ecotoxicologie, Phylogéographie, Golfe de Gabès, Méditerranée occidentale, Biomarqueurs, Milieu naturel, Conditions contrôlés.

Abstract

Cerastoderma glaucum is an adequate biological model for phylogeographic and ecotoxicological studies.

A study of its genetic structure in the Western Mediterranean sea was conducted using two markers types: mitochondrial and nuclear. The DNA mitochondrial marker results show a divergent population from all the other ones (Ellouza South of Tunisia).

An ecotoxicological study of populations sampled from Ellouza site and two other nearby sites in the Gulf of Gabes region was carried out in order to study the adaptive response of natural populations of *C. glaucum* at different levels of biological organization from the individual level to the cellular and molecular ones. In parallel, two laboratory experiments were performed to clarify the mechanisms that may explain the success or failure of maintaining populations of *C. glaucum*. In the first one, industrial effluents were used and in the second we have used a pure contaminant, the cadmium. These studies experiments concerned individual and molecular levels.

Different biomarkers involved in the response to different types of stress: (MT), (ABC1) (MnSOD and CuZnSOD) (CAT) (HSP70) and (COI) were used in natural and exposed cockles.

Results showed the importance of energy metabolism in response to stress whatever the used approach (*in situ* / Experimental) through the regulation of the expression of the COI gene.

Keywords : Cerastoderma glaucum, Ecotoxicology, Phylogeography, Golfe of Gabès, Western Mediterranean sea, Biomarkers, Natural conditions, Controlled conditions.