UNIVERSITE DE SFAX
FACULTE DES SCIENCES DE SFAX
TUNISIE

En cotutelle avec

UNIVERSITE DU MAINE
FACULTE DES SCIENCES DU MANS
FRANCE

THESE DE DOCTORAT

(en Sciences Biologiques)

présentée par

Mme Rim CHAABOUNI née LADHAR

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 dirigée par:

Mme. Amel HAMZA-CHAFFAI, Professeur, IPEIS, Université de Sfax-Tunisie
&
M. Benoît Chénais, Professeur, Faculté des sciences, Université du Maine, France

Soutenue le 01 Avril 2009 devant le jury composé de :

Jury :

Président : **M. Hafedh Mejdoub, Professeur, Université de Sfax**

Rapporteurs : **M. Pascal Favrel, Professeur, Université de Caen**
Mme. Faiza Fakhfakh, Professeur, Université de Sfax

Directeurs : **Mme. Hamza-Chaffai Amel, Professeur, Université de Sfax**
M. Benoît Chénais, Professeur, Université du Maine

Co-Directeurs : **Mme. Raja Gargouri, Professeur, Centre de Biotechnologie de Sfax**
Mme. Françoise Denis, Maître de conférences, Université du Maine

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes parents, pour leur aide moral et affectif durant toutes les années de mes études. Que dieu les préserve et leur accorde santé et bonheur. Qu'ils trouvent dans ce mémoire le fruit de mes années d'études et le témoignage de mes reconnaissances.

A mon mari Skander à qui j'exprime mon amour éternel. Ses encouragements et sa disponibilité m'ont été précieux pour accomplir ce travail.

A ma chère fille Dorra qui a supporté mon absence depuis sa naissance. Qu'elle trouve dans ce travail l'expression de mon attachement et mon profond amour.

A mes sœurs Nadia et Chema, mon beau frère Slim, mes beaux parents, ma belle sœur Ines et son mari Mohamed et mon beau frère Sami et sa femme Najla.

Avec toute mon affection

REMERCIEMENTS

Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à Madame **Amel Hamza-Chaffai**, professeur à l'institut préparatoire aux études d'ingénieurs de Sfax, qui m'a guidé dans mes premiers pas de recherche. Ses compétences scientifiques, son dévouement total pour la recherche, ses qualités humaines, ses précieux conseils ont été pour moi une source de réconfort et d'encouragement dans la réalisation de ce travail. Qu'elle trouve dans ce mémoire la modeste expression de ma reconnaissance et de mon éternelle gratitude.

Je suis très reconnaissante envers les deux autres personnes qui ont accepté de faire partie de mon encadrement lors de ma thèse, Madame **Raja Gargouri**, professeur au centre de biotechnologie de Sfax, et Madame **Françoise Denis**, Maître de conférences à l'Université du Maine. Vous m'avez fait confiance et vous m'avez permis d'avancer par vos conseils et votre aide afin de pouvoir clôturer ce travail. Je vous remercie d'avoir apporté vos connaissances et d'avoir passé de nombreux moments à la correction de ce manuscrit et des publications.

Merci également à monsieur le professeur **Benoit Chenais** pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Biologie et Génétique Evolutive de l'Université du Maine. Je le remercie également pour l'honneur qu'il me fait en jugeant ce travail.

Je remercie tout aussi sincèrement monsieur le professeur **Hafedh Mejdoub** qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Je le prie d'accepter l'expression de mon respect et de ma profonde considération. J'exprime également mes vifs remerciements aux professeurs **Faiza Fakhfekh** et **Pascal Favrel** qui ont bien voulu s'intéresser à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs.

Je tiens à remercier monsieur **Ali Gargouri**, professeur au centre de biotechnologie de Sfax pour ses précieux conseils lors des analyses des séquences de métallothionéine.

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur **Abdelmonem Kallel**, Directeur de l'ARSEN de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire pour réaliser les dosages du cadmium.

Je n'oublierai pas de saluer toutes les personnes qui ont participé activement à la réalisation de cette thèse :

- A tout le personnel de l'IPEIS (Institut Préparatoire aux Etudes d'Ingénieurs de Sfax) en particulier **Ridha Triki**, **Mohamed Neji**, **Rafik Krichen**, **Abdel Aziz Ezzidi**, **Abdel Aziz Bouguerich**, Madame **Leila**, Madame **Nejiba**, Madame **Ikram**, Madame **Fouzia Kammoun** et Madame **Noura Triki** pour les facilités offertes pour la réalisation de cette thèse.

- A tous les membres du Centre de Biotechnologie de Sfax en particulier Monsieur **Ahmed Rebai**, Monsieur **Mohamed Jaoua** et Monsieur **Hafedh Belguith** pour leur aide précieuse.

- Aux techniciens et secrétaires de la Faculté des Sciences de Sfax et de l'ARSEN en particulier Madame **Sadike Feki** et Mademoiselle **Dalinda**.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent à mes collègues et amis : **Imen Ketata**, **Wafa Damk-Smaoui**, **Monia Machreki-Ajmi**, **Sawssan Mezghanni**, **Rim Khlifi**, **Souhir Abid**, **Hassen Abid**, **Sahar Karray**, **Fenten El Guebsi**, **Mariam ben Chikha**, **Molke Feki**, **Houssem Gueddich**, **Hanène Segni**, **Hanène Bouaziz-Ketata**, **Sondos Karray-Chwayakh**, **Imen Miladi-Abd Ennadher**, **Ali Fendri**, **Salma Abdel Moula**, **Boutheina Hadhri-Guiga**, **Salma abeljlil**, **Basma Hadj Taib**, **Lamia jmal et Mosbeh**.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVATIONS
LISTE DES FIGURES
LISTE DES TABLEAUX
INTRODUCTION GENERALE…… ……2
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE
A. LES METAUX LOURDS ……7
1. Mécanismes moléculaires de la toxicité des métaux lourds……7
a. Effet sur la membrane cytoplasmique……7
b. Effet sur le noyau……7
c. Effet sur le système vacuolaire lysosomal……8
d. Effets sur les mitochondries……8
e. Effet sur le réticulum endoplasmique……8
2. Exemple de métaux lourds : Le cadmium……9
a. Propriétés physiques……9
b. Propriétés chimiques……9
c. Pénétration, accumulation et détoxification du cadmium……9
d. Cd chez les organismes marins……12
B. LES BIOINDICATEURS DE POLLUTION……12
1. *Ruditapes decussatus*……13
a. Position systématique……13
b. Coquille……13
c. Anatomie……14
d. Alimentation……15
e. Habitat et répartition géographique……15
f. Croissance……15
g. Reproduction……16
2. *Cerastoderma glaucum* et *Cerastoderma edule*……16
a. Taxonomie……16
b. Biologie de *Cerastoderma glaucum*/ *edule*……16
c. Différences morphologiques entre *C. glaucum* et *C. edule*……17
C. LES BIOMARQUEURS……18
1. Les métallothionéines……18
1.1 Classification et Nomenclature……18
1.2 Propriétés biochimiques……19
a. Composition en acides aminés……19
b. Fixation des ions métalliques……19
c. Structure primaire et spatiale……20
1.3 Rôle des métallothioneines……21
a. L'homéostasie du zinc et du cuivre……21
b. Détoxication des métaux……21
c. Protection contre le stress oxydant……22
1.4 Mécanisme d'induction des métallothionéines……22
1.5 Dégradation des métallothionéines……23
1.6 Mécanismes moléculaires de l'induction……23
a. Les promoteurs des gènes MTs……23
b. Contrôle transcriptionnel……24
1.7 Les métallothionéines comme biomarqueur……25
1.8 Les différentes méthodes de dosage des MTs……29
2. L'acétylcholinestérase……30
3. Malonedialdéhyde……32
a. Le stress oxydatif……32
b. Systèmes de défense contre le stress oxydatif……34
D. LES MARQUEURS GENETIQUES……35

CHAPITRE I: REPARTITION SPATIALE DE CADMIUM ET DE QUELQUES BIOMARQUEURS DETERMINES CHEZ CERASTODERMA GLAUCUM COLLECTEES D'UNE ZONE POLLUEE

A. INTRODUCTION 40
B. MATERIELS ET METHODES 42
1. Site de prélèvement : Zarb el Ain (ZA) 42
2. Echantillons 43
a. Choix 43
b. Collection 43
a. Figure I. 8: Grille finale de prélèvement. 45
3. Préparation des échantillons 46
a. Prétraitement 46
b. Dissection 46
4. Broyage 47
5. Minéralisation 47
6. Dosage du cadmium par spectrophotométrie d'absorption atomique 47
a. Principe 47
b. Appareillage 48
c. Condition opératoire 48
d. Etalonnage 49
e. Précision des analyses 49
7. Dosage des métallothionéines par la méthode colorimétrique 50
a. Principe de la méthode 50
b. Dosage des MTs 50
8. Dosage du malonedialdéhyde (MDA) au niveau de la glande digestive 51
a. Principe 51
b. Extraction du MDA 51
9. Dosage de l'acétylcholinestérase 51
10. Analyse statistique 52
C. RESULTATS 53
1. Choix des nœuds de la grille de prélèvement 53
2. Répartition spatial du Cd bioaccumulé et des biomarqueurs étudiés 53
3. Effets des facteurs biotiques (sexe, masse, taille) sur les concentrations des biomarqueurs étudiés 57
D. DISCUSSION 57

CHAPITRE II: VARIATIONS IN VIVO DES CONCENTRATIONS EN BIOMARQUEURS (METALLOTHIONEINE ET MALONEDIALDEHYDE) AVEC LE TEMPS ET LA CONCENTRATION DU CADMIUM CHEZ CERASTODERMA GLAUCUM

A. INTRODUCTION 66
B. MATERIELS ET METHODES 66
1. Site de prélèvement 66
2. Prélèvement et expérience de contamination *in vivo* 67
3. Préparation des échantillons 68
4. Dosage du cadmium, des métallothionéines et du malonedialdéhyde 68
5. Dosage des protéines 69
6. Test de « stress on stress » 69
7. Analyse statistique 69
C. RESULTATS 69
1. Variations de cadmium dans les tissus mous (*in toto*) 69
2. Variation des concentrations en métallothionéines au niveau des branchies et de la glande digestive de *C. glaucum* 70
a. Variation des MTs en fonction du facteur temps 70
b. Variation des concentrations en MTs en fonction du facteur concentration de $CdCl_2$ 71
3. Variations des concentrations en protéines au niveau des branchies 72
4. Variation des concentrations en protéines au niveau de la glande digestive 73

5. Variation des concentrations en malonedialdéhyde au niveau de la glande digestive de *C. glaucum* 74
6. Le test de stress on stress..... 75
D. DISCUSSION..... 76

CHAPITRE III: CLONAGE ET CARACTERISATION D'ADNC DE METALLOTHIONEINE CHEZ DEUX BIVALVES MEDITERRANEENS: RUDITAPES DECUSSATUS ET CERASTODERMA GLAUCUM

A. INTRODUCTION 81
B. MATERIELS ET METHODES 82
1. L'expérience de contamination 82
2. Extraction des ARN totaux 82
3. Purification des ARN totaux 83
4. Transcription inverse (RT) 83
5. PCR (Polymerase Chain Reaction)..... 84
6. Extraction de fragments d'ADN de gels d'agarose 85
7. Clonage de fragments d'ADN 85
8. Transformation bactérienne 85
9. Extraction de l'ADN plasmidique..... 86
10. Séquençage automatique 86
11. Dot Blot 88
12. Analyse statistique..... 89
13. Outils d'analyses bioinformatiques 89
    a. Les Banques de séquences nucléiques 89
    b. Les programmes bioinformatiques de traitement des séquences nucleiques 89
C. RESULTATS 90
1. Isolement du 18S chez *R. decussatus*..... 90
2. Amplification de deux séquences partielles d'ADNc codant pour la MT..... 90
3. Expression de MT dans différents tissus 94
4. Expression du gène MT chez *R. decussatus* exposés au cadmium par rapport aux témoins 95
D. DISCUSSION..... 95

CHAPITRE IV: DIFFERENCIATION GENETIQUE ENTRE ESPECES ET POPULATIONS DU GENRE CERASTODERMA

A. INTRODUCTION 100
B. MATERIELS ET METHODES 101
1. Collection des échantillons..... 101
2. Dissection des échantillons 101
3. Extraction de l'ADN génomique 101
4. PCR 102
5. Electrophorèse..... 102
6. Extraction de l'ADN du gel d'agarose (Voir Chapitre III)..... 103
7. Séquençage automatique (voir chapitre III)..... 103
8. Traitement des données 103
9. Analyses statistiques..... 103
C. RESULTATS 104
1. Alignement des séquences 28S 104
2. Alignement des séquences ITS1 108
3. Alignement des séquences de COI..... 114
D. DISCUSSION..... 121
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... 124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 128
ANNEXES

Liste des Abréviations

A : Adénine
AChE : Acétylcholinéstérase
ADN : Acide Désoxy-ribonucléique
ADNc: ADN complémentaire
Ag: Argent
AMOVA : analyse de variance moléculaire
ARE : Elément de réponse aux antioxydants
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm: ARN méssager
ARNr: ARN ribosomal
ASCh : Acétylthiocholine
ATP : Adenosine Tri-Phosphate
BET : Bromure d'éthidium
Br : Branchies
BSA : Albumine sérique bovine
C :Cytosine
$CaCl_2$: Chlorure de calcium
Cd : Cadmium
COI : Première sous-unité de la Cytochrome Oxydase
CTAB : Cetyltrimethylammonium Bromide
Cu: Cuivre
Cys : Cystéine
DEPC: Diethyl pyrocarbonate
dNTP: désoxynucléotides triphosphates
ddNTP : Dideoxynucleotide Triphosphate
DO : Densité optique
DTNB : 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acide)
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic Acid
G: Guanine
g : gramme
Gln : Glutamine
Glu : Glutamate
Gly: Glycine
GSH : glutathion
h: heure
HCl : Acide chlorhydrique
Hg : mercure
HNO_3 : Acide nitrique
ITS1, ITS2: Internal Transcribed Spacer
IPTG : Isopropyl-Beta-d-Thiogalactopyranoside
KCl : Chlorure de potassium
K2HPO4 : Di-potassium hydrogénophosphate
KH2PO4 : Hydrogénophosphate de potassium
Lab : laboratoire
LB : Luria Broth
LT50 : Temps létal pour 50% d'individus
Ma: Muscle adducteur
MDA: Malonedialdéhyde

Mg: Milligramme
Min : minute
Mm: Millimole
Mn: Manteau
MOPS :Acide 3-(n-Morpholino)Propane-sulfonique
MRE : Elément de réponse aux métaux
MTs: Métallothionéines
MTF-1 : Facteur de transcription à doigt de zinc
Na_2HPO_4 : Di-sodium Hydrogénophosphate
NaCl : Chlorure de sodium
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (sous sa forme réduite)
Ni : Nikel
NO° : Monoxyde d'azote.
O_2^{-}° : Radical superoxyde
O2- : Superoxydes
OH : Hydroxyles
P : Pied
Pb : Plomb
pb : Paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
PHYLIP : Phylogeny Inference Package
Pro : Proline
Prot : Protéines
QO1 : Quinone oxidoréductase
RT : Transcription inverse
ROS : espèces réactives de l'oxygène
SAA : Spectrophotométrie d'absorption atomique
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SCh: Thiocholine
Se : Sélinium
Sec : Seconde
Ser : Serine
SES : Station d'épuration de Sfax
SH : Groupement thiol
SIAPE : Société Industrielle de l'Acide Phosphorique et d'Engrais
SOD : Superoxydes dismutases
T : Thymine
T° : Température
TAE : Tris-Acétate EDTA
TBA : Acide thiobarbiturique
TBE : Tris-Borate-Edta Buffer
TEP : 1,1,3,3- tétraéthoxypropane
TNB : 5-thio-2- nitrobenzoate
Tris: Tris(hydroxymethyl)aminométhane
UV : Ultra violet
ZA : Zarb El Aïn
Zn : Zinc

Liste des Figures

Figure 1. Représentation schématique des voies d'entrée des métaux chez les bivalves (Viarengo et Nott, 1993) 11

Figure 2. Caractères externes et internes des valves de palourde (Cesari et Pellizzato, 1990) 14

Figure 3. Anatomie interne du corps mou de la palourde (Cesari et Pellizzato, 1990). 15

Figure 4. *Cerastoderma glaucum* 17

Figure 5. *Cerastoderma edule* 17

Figure 6. Mode de distribution des résidus cystéines au sein d'une métallothionéine de mammifères (Kagi et Kojima, 1987) 19

Figure 7. Structure tridimensionnelle de métallothionéine chez le rat. Les sphères représentent les ions métalliques insérés entre les résidus cystéines (modifié d'après Romero-Isart et Vasak, 2002) 21

Figure 8. Représentation schématique de l'organisation des séquences de régulation localisées en amont des gènes responsables de la synthèse des métallothionéines (GRE :Glucocorticoid Responsive Element ; MRE : Metal Responsive Element ; GC : GC box ; TATA: TATA box) (Hardivillier, 2005). 24

Figure 9. Modèle d'induction de MT faisant intervenir un ligand. Le zinc fixé sur ce ligand est libéré par le cadmium. Le zinc libéré est fixé aux MTI ce qui provoque une dissociation entre les MTF et les MTI. Les MTF libres interagissent avec les séquences MRE du promoteur de MT et activent la transcription (Roesijadi, 1996). 25

Figure 10. A la jonction neuromusculaire, l'acétylcholine est synthétisée dans le cytoplasme de la terminaison nerveuse à partir de l'acétylCoA et de la choline. Plusieurs milliers de molécules d'acétylcholine (ACh) sont ainsi stockée par vésicule synaptique. Dès leur libération, environ la moitié des molécules d'acétylcholine sont hydrolysées par l'enzyme acétylcholinestérase. Mais l'enzyme ne peut tout dégrader et l'autre moitié atteint les récepteurs nicotiniques (http://lecerveau.mcgill.ca/). 31

Figure 11. Structure de l'acétylcholinéstérase (http://commons.wikimedia.org/wiki/Acetylcholinesterase) 31

Figure 12. Mécanismes des lésions biochimiques induites par le stress oxydant (Sergent et al. 2000) 33

Figure13. Mécanisme en chaine de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003). 33

Figure 14. Réactions catalysées par les SOD et les catalases 34

Figure 15. Formation des cellules vivantes (http://www.courscapitole.com/doku.php/niveau:lycee/svt) 36

Figure16. L'ADN codant les ARNr (ARN ribosomiques) est transcrit en un preARNr (précurseur 45S) dans le nucléole. Le preARNr est ensuite découpé en trois ARNr (18S, 5,8S et 28S). Simultanément dans le nucléoplasme de l'ADN codant les protéines constitutives des ribosomes est transcrit en ARN messager. L'ARN messager est traduit en protéines dans le cytoplasme. Les protéines traduites rentrent dans le noyau et dans le nucléole, elles s'associent avec les ARN ribosomiques pour former des ribosomes. Les ribosomes néoformés sortent du noyau et migrent dans le cytoplasme jouer leur rôle. Les séquences qui portent les gènes responsables de la synthèse d'ARNr sont présentes sur l'ADN dans le nucléole ; à l'exception de l'ADNr 5S qui est nucléoplasmique (Trang, 2006). 37

Figure I.1 Photographie de la SIAPE 41

Figure I.2 Photographie du terril de phosphogypse 41

Figure I.3. Les courants superficiels en Méditerranée (Serbeji, 2000) 42

Figure I.4. Photographie du site de prélèvement Zarb El Ain 43

Figure I.5. Site de collection d'échantillons au niveau du golfe de Gabès 44

Figure I.6. Grille préliminaire et grille finale de prélèvement : les 17 points de la grille préliminaire sont encerclés, les points éliminés sont soulignés. Les points en gras représentent les nœuds de la grille finale 45

Figure I.7. Schéma montrant les différents compartiments utilisés pour les différents dosages réalisés**.** 46

Figure I.8. Spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme 48

Figure I.9. Répartition spatiale du cadmium (µg/g poids sec) dosé au niveau du tissu mou de *C. glaucum.* 54

Figure I.10. Répartition spatiale de MT (mg/g poids frais) dosé au niveau de la glande digestive de *C. glaucum*. 54

Figure I.11. Répartition spatiale du MDA (mM/g poids frais) dosé au niveau de la glande digestive de *C. glaucum*. 55

Figure I.12. Répartition spatiale de l'activité de l'AChE (nmol/min/mg Prot) déterminée au niveau des branchies de *C. glaucum*. 55

Figure I.13. Variation des concentrations en MTs (a), MDA (b) et variation de l'activité de l'AChE (c) en fonction des concentrations de cadmium *in toto* chez *C. glaucum* (signification de r est à 99%) (n= 561). 56

Figure II.1. Photographies du site de prélèvement (Mahrès) 65

Figure II.2. Nombre d'échantillons utilisés pour les différents dosages 66

Figure II.3. Schéma montrant les diffèrents compartiments utilisés pour les différents dosages réalisés. 67

Figure II.4. Variation des concentrations en cadmium *in toto* (µg/g poids sec) chez *C. glaucum* exposée à différentes concentrations de $CdCl_2$ (50, 75, 100 et 150 µg/l) durant 5, 10, 15 et 20 jours (n= 285) 69

Figure II.5. Variation des concentrations en métallothionéine (mg/g poids frais) au niveau des branchies de *C. glaucum* exposée à différentes concentrations de $CdCl_2$ (50, 75, 100 et 150 µg/l) durant 5, 10, 15 et 20 jours (n= 380) 70

Figure II.6. Variation des concentrations en métallothionéine (mg/g poids frais) au niveau des glandes digestives de *C. glaucum* exposée à différentes concentrations de $CdCl_2$ (50, 75, 100 et 150 µg/l) durant 5, 10, 15 et 20 jours (n= 380) 71

Figure II.7. Variation des concentrations en protéines (mg/g poids frais) au niveau des branchies de *C. glaucum* exposée à différentes concentrations de $CdCl_2$ (50, 75, 100 et 150 µg/l) durant 5, 10, 15 et 20 jours (n= 380) 72

Figure II.8. Variation des concentrations en protéines (mg/g poids frais) au niveau des glandes digestives de *C. glaucum* exposée à différentes concentrations de $CdCl_2$ (50, 75, 100 et 150 µg/l) durant 5, 10, 15 et 20 jours (n= 380) 73

Figure II.9. Variation des concentrations en malonedialdéhyde (mM/g poids frais) au niveau des branchies de *C. glaucum* exposée à différentes concentrations de $CdCl_2$ (50, 75, 100 et 150 µg/l) durant 5, 10, 15 et 20 jours (n= 380) 74

Figure III.1. Carte de restriction du plasmide pGEMT 84

Figure III.2. Séquenceur automatique 86

Figure III.3. Séquences obtenues par le séquenceur automatique 86

Figure III.4. Analyse des produits de PCR par d'électrophorèse d'ADN MT de *Ruditapes decussatus* (ligne 1= marqueur de taille = ADN du phage λ digéré par Hind III, ligne 2 = témoin négatif, ligne 3= Rd MT) 90

Figure III.5. Analyse des produits de PCR par d'électrophorèse d'ADN MT de *Cerastoderma glaucum* amplifié par PCR (ligne 1= marqueur de taille = ADN du phage λ digéré par Hind III, ligne 4= témoin négatif, ligne 5 = Cg MT). 90

Figure III.6. Alignement des séquences nucléotidiques d'ADNc MT de *Ruditapes decussatus* (Rd) et *Cerastoderma glaucum* (Cg). L'amorce sens est soulignée. Le codon stop est en gras. Le signal de polyadénylation est en italique. 92

Figure III.7. Alignement des séquences protéiques de métallothionéines de *Ruditapes decussatus* (Rd) et *Cerastoderma glaucum* (Cg). Le motif caractéristique des mollusques est en gras (Binz et Kagi, 1999). 92

Figure III.8. Comparaison des séquences protéiques de MTs de *Ruditapes decussatus* (Rd) et *Cerastoderma glaucum* (Cg) avec celles issues d'autres espèces. Les numéros d'accession de ces protéines sont les suivants: *Crassostrea gigas* (crg) (GenBank. **CAC 82788**), *Ruditapes philippinarum* (Rp) (GenBank. **ABP57063**), *Mytilus edulis* (Me) (GenBank. **ABM30214**) et *Cerastoderma edule* (Ce) (GenBank. **ABP57066**). Les residues Cys sont en gras. La séquence caractéristique des mollusques est soulignée. 92

Figure III.9. Taux d'ARNm MT normalisés par les niveaux d'ARN 18S (MT/18S) au niveau des tissus de *R. decussatus*. Les données représentent la moyenne ± S.D. avec n=3 93

Figure III.10. Taux d'ARNm MT normalisés par les niveaux d'ARN 18S (MT/18S) au niveau des tissus de *C.glaucum*. Les données représentent la moyenne ± S.D. avec n=3. 94

Figure III.11. Taux d'ARNm MT normalisés par les niveaux d'ARN 18S (MT/18S) au niveau des branchies de *R. decussatus*. 94

Les données représentent la moyenne ± ecart type avec n=3.

Figure IV.1. Photographie de *C. glaucum* à pied jaune (a) et à pied orangé (b) 99

Figure IV.2. Sites d'échantillonnage de *C. glaucum* et *C. edule* (1: Méditerranée, 2: Atlantique, 3: Mer du Nord). 100

Figure IV.3. Alignement des séquences de 28S de *C. glaucum* (Cg) et de *C. edule* (Ce) 103

Figure IV.4. Arbre phylogénétique basé sur les séquences de 28S isolées chez *C. glaucum*, *C. edule* et chez d'autres bivalves. Numéros d'accession: [*Crassostrea virginica*: Z29549 ; *Crassostrea gigas*: AB105362; *Crassostrea rhizophorae*: Z29547; *Mytilus galloprovincialis*: AB105357; *Mytilus edulis*: Z29550; *Acanthocardia tuberculata*: AM779696*; Parvicardium minimum*: DQ279966; *Fulvia mutica*: AB105363 ; *Ruditapes philippinarum*:AM779742; *Ruditapes decussates*: DQ184781; *Leukoma staminea*: AM779744; *Nutricola tantilla*: AM779743; *Callista disrupta*: AM779741; *Mercenaria mercenaria*: AM779740]. *Sepia officinalis* (AY557560) est choisi comme groupe externe. Les valeurs qui caractérisent les nœuds représentent les résultats des tests de bootstrap effectués sur 100 réplicas 105

Figure IV.5. Alignement des séquences d'ITS1. Les fréquences des séquences sont entre parenthèses. O : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie) à pied orangè, J : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie) à pied jaune CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande) et EB : *C. edule* atlantique (Bretagne). 107

Figure IV.6. Réseau de relation entre les séquences d'ITS1 montrant les relations entre les différents haplotypes de *C. glaucum* et de *C. edule* 112

Figure IV.7. Alignement des séquences de COI. Les fréquences de séquences sont entre parenthèses. O : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie) à pied orangè, J : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie) à pied jaune CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande). 113

Figure IV.8. Réseau de relation entre les séquences de COI montrant les relations entre les différents haplotypes de *C. glaucum* et de *C. edule* 119

Liste des Tableaux

Tableau 1. Différences observées au niveau de la coquille de *C. glaucum* et *C. edule* 17

Tableau 2. Exemples de mollusques au niveau desquels une induction de MT a été observée suite à une exposition aux métaux au laboratoire ou dans leur milieu naturel (Terrain) (Amiard et al. 2006). 26

Tableau I.1. Conditions opératoires fixées pour le Cd analysés en spectrophotométrie d'absorption atomique (mode flamme). 49

Tableau I.2. Limite de détection du métal analysé 49

Tableau I.3. Résultats de contrôles de qualité interne (SRM-2976). Les concentrations moyennes sont présentées en mg/kg de poids sec. Les écarts types de nos valeurs et des valeurs certifiées (National Institute of Standard and Technology) sont présentés entre parenthèses. 50

Tableau II.1. La LT50 après 5, 10, 15 et 20 jours de contamination avec 50, 75, 100 et 150 µg/l de $CdCl_2$ 74

Tableau III.1. Liste des oligonucléotides utilisés lors des réactions de PCR. 8 3

Tableau III.2 . Liste des oligonucléotides qu'on a utilisé lors des réactions de PCR et qui n'ont pas permis une amplification d'ADNc MT chez *R. decussatus* et *C. glaucum*. 91

Tableau III.3 . Le pourcentage de similarité entre les sequences protéiques des MTs de *Ruditapes descussatus* et *Cerastoderma glaucum* et celles des MTs de *Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum*, *Meretrix lusoria*, *Dreissena polymorpha* et *Cerastoderma edule*.

Tableau IV.1. Liste des oligonucléotides et des températures d'hybridation utilisés lors des réactions de PCR. 101

Tableau IV.2. Distances génétiques (Kimura 2P) déterminées par les séquences de 28S entre les espèces étudiées et d'autres espèces dont les séquences de 28S sont disponibles dans les banques génomiques 106

Tableau IV.3. Nombre moyen de sites polymorphes des séquences d'ITS1 prises 2 à 2 des différentes populations étudiées : T : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie), CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande) et EB : *C. edule* atlantique (Bretagne). 110

Tableau IV.4. La moyenne non corrigée des différences des 110

séquences ITS1 prises 2 à 2 des différentes populations : T : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie), CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande) et EB : *C. edule* atlantique (Bretagne).

Tableau IV.5. Distance génétique déterminée par la méthode de Kimura 2P entre les différentes populations étudiées : T : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie), CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande) et EB : *C. edule* atlantique (Bretagne). 110

Tableau IV.6. Nombre moyen de sites polymorphes des séquences de COI prises 2 à 2 des différentes populations étudiées. T : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie), CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande). 117

Tableau IV.7. Moyenne non corrigée des différences des séquences COI prises 2 à 2 des différentes populations : T : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie), CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande). 117

Tableau IV.8. Distance génétique déterminée par la méthode Kimura 2P entre les populations étudiées. T : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie), CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande). 117

Tableau IV.9. Liste des numéros d'accession à GenBank des séquences de 28S, COI et ITS1 amplifiées 120



INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La prise de conscience actuelle des problèmes liés à la croissance industrielle et à la pollution provoquée par le développement économique a engendré une demande sociale en faveur de la préservation et de la restauration des écosystèmes. Face à cette situation, les méthodes d'analyses physico-chimiques, bien que toujours plus performantes, atteignent leurs limites en tant qu'outils d'aide à la gestion environnementale, car elles ne prennent généralement pas en compte la notion de spéciation ou de biodisponibilité des polluants. Il est donc apparu nécessaire de compléter ces mesures par des données biologiques permettant d'évaluer l'effet potentiel global des substances présentes dans le milieu vivant. En cela, les biomarqueurs constituent des outils biologiques supplémentaires, car ils offrent une réponse précoce et sensible à une large gamme de polluants, en particulier des métaux lourds. En revanche l'utilisation d'un seul biomarqueur est insuffisante pour évaluer les risques encourus par l'écosystème, il va falloir utiliser plusieurs biomarqueurs d'une façon simultanée au niveau d'un organisme bioindicateur. Les bioindicateurs sont des organismes bioaccumulateurs qui peuvent nous renseigner sur les variations spatiales et temporelles des concentrations de métaux biodisponibles. Ainsi, les bivalves sont reconnus comme bioindicateurs en raison de leur forte capacité à bioconcentrer les xénobiotiques. Des travaux antérieurs ont montré que La coque *Cerstoderma glaucum* constitue un excellent indicateur de contamination (Machreki-Ajmi and Hamza-Chaffai, 2006). Il s'agit d'un bivalve filtreur largement distribué sur les côtes de l'Europe et de la Tunisie. Le golfe de Gabès abrite une importante population de cette espèce.

Le golfe de Gabès est situé sur les côtes Sud-Est de la Tunisie. De par sa richesse en ressources halieutiques, il offre de grandes possibilités pour les activités de pêche et présente donc un intérêt économique important. Cependant, la situation de cette région s'est détériorée en raison de la croissance démographique et de l'installation de grandes activités industrielles exerçant sur le milieu marin une grande pression anthropique. En effet, des travaux antérieurs ont montré que la région du golfe de Gabès est influencée par des effluents riches en certains métaux et particulièrement le cadmium. La compréhension des différentes modalités d'action de ce métal toxique et dangereux sur les organismes marins est donc importante.

Cependant les études réalisées sur *C. glaucum* originaire du golfe de Gabès, bien que très peu en nombre, ont mis en évidence *in situ* les effets de la contamination par le cadmium de cet écosystème sur les variations des teneurs en métallothionéines et en malonedialdéhyde et sur l'activité de l'acétylcholinéstérase (Machreki et al. 2008).

Néanmoins, la répartition spatiale de ce contaminant ainsi que ses effets au niveau d'un site exposé à la pollution font l'originalité du **premier chapitre de cette thèse**. Ainsi des échantillons de *C. glaucum* ont été collectés suivant une grille de prélèvement afin d'étudier la répartition spatiale des concentrations en cadmium *in toto*, métallothionéines, malonedialdéhyde et l'activité de l'acétlcholinéstérase. Cette étude est considérée comme la première à utiliser un organisme bioindicateur pour établir cette répartition spatiale au lieu des mesures des concentrations métalliques dans l'eau de mer ou dans le sédiment qui ne reflètent pas la fraction biodisponible du métal (Langston et al. 1998). En se basant sur les résultats du premier chapitre de ce travail ainsi que ceux des travaux antérieurs réalisés *in situ* (Hamza-Chaffai et al. 1999 ; Smaoui-Damak et al. 2003 ; Ketata et al. 2007 ; Machreki-Ajmi et al. 2008) et qui ont montré la forte contamination métallique de différents sites du golfe de Gabès, la question qui se pose est la suivante : pour survivre dans de telles conditions, est ce que les organismes marins occupant cet écosystème ont pu développer des systèmes adaptatifs particuliers tels que «le système métallothionéine » ? Pour répondre à cette question nous avons donc entrepris une étude dont le but est de cloner l'ADNc codant pour la MT chez les deux espèces les plus abondantes dans le golfe de Gabès qui sont *C. glaucum* et *Ruditapes decussatus* afin de pouvoir les utiliser comme sonde pour étudier l'induction du gène MT au niveau des tissus des animaux contaminés et témoins. Pour réaliser cette étude, une expérience de contamination a été envisagée. Cependant, lors du choix des concentrations de $CdCl_2$ ainsi que la durée de contamination aucune étude *in vivo* réalisée sur *C. glaucum* n'a été disponible pour pouvoir l'utiliser comme référence. Ce qui n'était pas le cas pour *R. decussatus*. Ainsi, une étude *in vivo* dont le but est de déterminer les conditions optimales d'induction du gène MT chez *C. glaucum* a été réalisée. Cette étude qui fait l'objet du **deuxième chapitre de cette thèse** est considérée comme une étude préliminaire pour notre **troisième chapitre dont le** but est de cloner l'ADNc codant pour la MT chez *C. glaucum* et *R. decussatus***.**

Une autre constatation qui a suscité notre intérêt était la présence de deux phénotypes chez la coque *C. glaucum* : des *C. glaucum* à pied jaune et d'autres à pied orangé. Pour répondre à la question si cette différence phénotypique est liée à une différence génétique ou pas, une étude moléculaire basée sur la détermination des séquences de certains marqueurs génétiques tels que les séquences de 28S, ITS1 et COI a été réalisée et a fait l'objet du **quatrième chapitre** de cette thèse. Cette étude nous a également permis d'établir une différenciation génétique entre *C. glaucum* et *C. edule* au

lieu de la différenciation basée sur des critères morphologiques qui a été le sujet de plusieurs débats.

Les principaux objectifs de cette thèse se résument dans les points suivants :

♦ Les objectifs de la première partie ayant pour but d'étudier la répartition spatiale de cadmium et de quelques biomarqueurs chez *Cerastoderma glaucum* collectées dans une zone polluée, sont :

- Etudier l'impact d'une contamination *in situ* (au niveau de chaque point de prélèvement) par le cadmium sur un organisme bioindicateur (*Cersatoderma glaucum*) en mesurant les concentrations en cadmium *in toto*, les teneurs en métallothionéines, les taux de malonedialdéhyde et l'activité de l'acétylcholinéstérase.
- Etablir la répartition spatiale du cadmium et de ses effets au niveau d'une zone exposée à la pollution à travers l'utilisation d'un organisme bioindicateur.

♦ Les objectifs de la deuxième partie visant à étudier les variations *in vivo* des concentrations en biomarqueurs (métallothionéine et malonedialdéhyde) avec le temps et la concentration du cadmium chez *C. glaucum* sont :

- Déterminer l'effet d'une contamination *in vivo* par différentes concentrations de $CdCl_2$ durant un temps d'exposition variable sur les teneurs en métallothionéines et malonedialdéhyde chez *C. glaucum.*
- Estimer les conditions optimales d'induction du gène métallothionéine chez *C. glaucum*.

♦ Les objectifs de la troisième partie visant à cloner et à caractériser l'ADNc de métallothioneine chez deux bivalves Méditerranéens: *Ruditapes decussatus* et *C. glaucum* sont :

- Cloner l'ADNc codant pour la métallothionéine chez *R. decussatus* et *C. glaucum*
- Etudier l'induction du gène MT au niveau de différents tissus des animaux contaminés
- Etudier l'induction du gène MT au niveau des branchies des palourdes contaminés et témoins.

♦ Les objectifs de la quatrième partie ayant pour but d'établir une différenciation génétique entre espèces et populations du genre *Cerastoderma* sont :

- Etablir une différenciation génétique entre *C. glaucum* et *C. edule*
- Etudier la divergence génétique au niveau intra et interpopulationnel de *C. glaucum* et *C. edule.*

- Etablir une différenciation génétique entre deux phénotypes de la population tunisienne de *C. glaucum*.



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Les métaux lourds

Les métaux lourds sont présents dans l'eau de mer sous différentes formes chimiques. Ils peuvent être sous forme ionique ou adsorbés sur les particules minérales ou organiques. Leur disponibilité change très fortement avec les paramètres environnementaux tels que la température, la salinité et le pH. La spéciation d'un métal dans le milieu marin représente un problème fondamental car sa biodisponibilité et par conséquent sa toxicité dépend de sa forme chimique. Ainsi à une salinité de 35 ˙/.., la majeure partie du chlorure de cadmium se transforme en un complexe neutre $[CdCl_2]^0$ (Viarengo, 1989).

1. Mécanismes moléculaires de la toxicité des métaux lourds

Chez les mollusques, il a été démontré qu'une contamination par les métaux lourds peut affecter la croissance, la consommation de l'oxygène, la reproduction etc (Viarengo, 1989). Néanmoins, peu de travaux ont été réalisés sur l'effet d'une contamination métallique au niveau cellulaire.

a. Effet sur la membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique représente la première barrière pour les métaux au niveau de la cellule. Il a été démontré qu'en se liant aux protéines cytoplasmiques et aux phospholipides, les métaux engendrent une altération de leurs structures ainsi que de leurs fonctions (Evtushenko et al. 1986). L'un des effets le plus important des cations métalliques tel que le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le mercure (Hg) et l'argent (Ag) est l'inhibition de l'activité des ATP ases Na-K dépendantes (Bouquegneau et Gilles, 1979). Les métaux lourds peuvent aussi altérer la structure de la membrane cellulaire en stimulant par exemple la peroxydation lipidique et en épuisant le contenu cellulaire en glutathion (GSH) nécessaire pour la protection contre le stress oxydatif (Dianzani et Ugazio, 1978).

b. Effet sur le noyau

Une fois dans la cellule, les métaux vont rapidement s'accumuler dans le noyau (Bryan et Hidalgo, 1976). A ce niveau, ils vont stimuler la synthèse d'ARNm codant pour les métallothionéines (MTs), inhiber l'activité de l'ARN polymérase I et II responsables de la synthèse de l'ARNr et l'ARNm respectivement, altérer la structure et le métabolisme de l'ADN et causer des anomalies au niveau des chromosomes (Viarengo et al. 1982).

c. Effet sur le système vacuolaire lysosomal

L'exposition au Cu ou au Cd engendre une déstabilisation au niveau des membranes des lysosomes, organites cellulaires assurant le catabolisme des macromolécules, suivi d'une augmentation du catabolisme protéique (Glaumann et Ballard, 1987). En effet, il a été démontré qu'une contamination des moules par le cuivre engendre une activation des enzymes lysosomales protéolytiques (mytilidases) au niveau de la glande digestive (Viarengo, 1989). Il semble donc qu'une exposition des invertébrés à de faibles concentrations de métaux lourds a pour conséquence le catabolisme des macromolécules telles que les protéines. Ce qui peut être confirmé par l'augmentation de l'activité du β-glucuronidase au niveau des cellules de la glande digestive des moules contaminées par le cuivre. Cependant une contamination par des concentrations importantes de métaux peut amener à une inhibition des protéases lysosomales et par conséquent une augmentation de la demi-vie des protéines peut être observée (Moore et Viarengo, 1989).

Les métaux lourds altèrent donc la physiologie de ces organites par deux voies : d'une part en déstabilisant les membranes des lysosomes primaires et secondaires et en augmentant le taux d'activité des lysosomes, d'autre part en bloquant l'activité des enzymes hydrolytiques et en inhibant le processus catabolique cellulaire, lorsque les concentrations en métaux sont élevées (Viarengo, 1989).

d. Effets sur les mitochondries

La capacité des mitochondries à accumuler les métaux lourds a été démontrée (George, 1972). Cette accumulation a pour conséquence la perturbation de la fonction mitochondriale en altérant les membranes mitochondriales par la voie de la peroxydation lipidique et en augmentant la perméabilité aux polypeptides ce qui entraine une perturbation au niveau du gradient protonique responsable de la synthèse d'ATP (Viarengo, 1989). Les métaux peuvent agir également, sur l'activité des enzymes mitochondriales tel que l'inhibition d'isocitrate dehydrogenase nécessaire pour la synthèse de l'ATP (Viarengo, 1989).

e. Effet sur le réticulum endoplasmique

Il a été démontré que les métaux lourds altèrent la distribution des ribosomes entre le cytosol et le réticulum endoplasmique. Au niveau des cellules saines, très peu de ribosomes libres sont présents dans le cytosol, la plupart se présentent sous la forme de polyribosomes ou attachés au réticulum endoplasmique (Viarengo, 1989). Une exposition au cadmium provoque une augmentation du nombre des ribosomes libres et une diminution

du nombre des polyribosomes ce qui amène à une diminution de la synthèse protéique. Les métaux lourds affectent, également les activités enzymatiques du réticulum endoplasmique. Parmi ces enzymes on peut citer : la phosphatase alcaline, les oxygénases et la benzopyrène hydroxylase (Viarengo, 1989).

2. Exemple de métaux lourds : Le cadmium

Le cadmium est un élément relativement rare et n'existe pas naturellement à l'état natif. Il est présent dans la croûte terrestre à des faibles concentrations où il est souvent associé au zinc et au plomb. Il est également obtenu comme sous-produit de raffinage du plomb et du cuivre.

Le cadmium est principalement utilisé pour la métallisation des surfaces, dans la fabrication des accumulateurs électriques, des pigments, des stabilisants pour les matières plastiques et des alliages (Hamza-Chaffai, 1993).

a. Propriétés physiques

Le cadmium est un métal blanc argenté ayant des propriétés physiques proches de celle du zinc. Il fond à 320,9°C et bout à 767°C. Lors de l'ébullition du cadmium, il se dégage des vapeurs jaunes toxiques. Sa densité est de 8650 kg/m^3. Il est ductile (résistant à l'étirement), malléable et résiste à la corrosion atmosphérique, ce qui en fait un revêtement de protection pour les métaux ferreux (Adriano, 1986).

b. Propriétés chimiques

Les propriétés chimiques du cadmium sont semblables à celles du zinc. Il s'oxyde très peu à température ambiante et brûle dans l'air en donnant l'oxyde anhydre CdO. La masse molaire atomique du cadmium est de 112,4 g/mol (Adriano, 1986).

c. Pénétration, accumulation et détoxification du cadmium

Chez les organismes aquatiques, l'assimilation des métaux, tel que le cadmium, associés à des particules non dissoutes, peut se faire à travers le tractus digestif lors des prises de nourriture (Jennings, 1979). Les métaux en solution sont absorbés par les surfaces directement en contact avec le milieu extérieur tel que les branchies. Les formes ioniques libres entrent par simple diffusion passive à travers la membrane cellulaire (Carpenè et George, 1981). Les formes complexées, comme les hydroxydes ferreux entrent par des phénomènes de pinocytose (George, 1980).

Pour la forme particulaire, la prise du métal peut se faire par endocytose. Cette endocytose peut se produire au niveau de l'épithélium branchial mais surtout au niveau des épithéliums des voies digestives (George, 1980).

La tolérance des organismes marins à des concentrations élevées en métaux dans le milieu, se fait grâce à la régulation des teneurs internes en métaux et à l'accumulation des métaux en excès sous des formes non toxiques (Viarengo et Nott, 1993). En effet, grâce aux mécanismes dont le rôle est de rétablir l'homéostasie telle que la liaison aux métallothioneines, la compartimentation au niveau des lysosomes et la formation de précipités insolubles (Fig. 1) (Viarengo et Nott, 1993), les teneurs internes en métaux essentiels sont maintenues à des niveaux bénéfiques. Quand cette capacité de régulation est dépassée, le métal devient toxique (George, 1990). Pour éviter cette toxicité, les cellules possèdent des systèmes d'élimination ou de neutralisation des métaux en excès (Viarengo et Nott, 1993). Au niveau du cytosol, un des systèmes les plus importants est la prise en charge des métaux par des ligands spécifiques tels que les métallothionéines (Viarengo et Nott, 1993). Une autre possibilité de séquestration des métaux est l'inclusion de ces éléments dans des lysosomes. L'accumulation des métaux peut se faire grâce à différents types de réactions biochimiques telles que l'incorporation des cations à des granules de lipofuscines (Viarengo et Nott, 1993). En effet, une exposition prolongée aux métaux déclenche la réaction de peroxydation lipidique, au niveau des lysosomes, dont le produit final est un pigment lipoprotéique insoluble : la lipofuscine ; les métaux sont alors immobilisés sous forme insoluble dans les granules de lipofuscine (Viarengo et Nott, 1993). Les lysosomes jouent aussi un rôle dans le catabolisme et l'élimination des métallothionéines, ce qui amène par conséquent à une accumulation métallique (Viarengo, 1989).

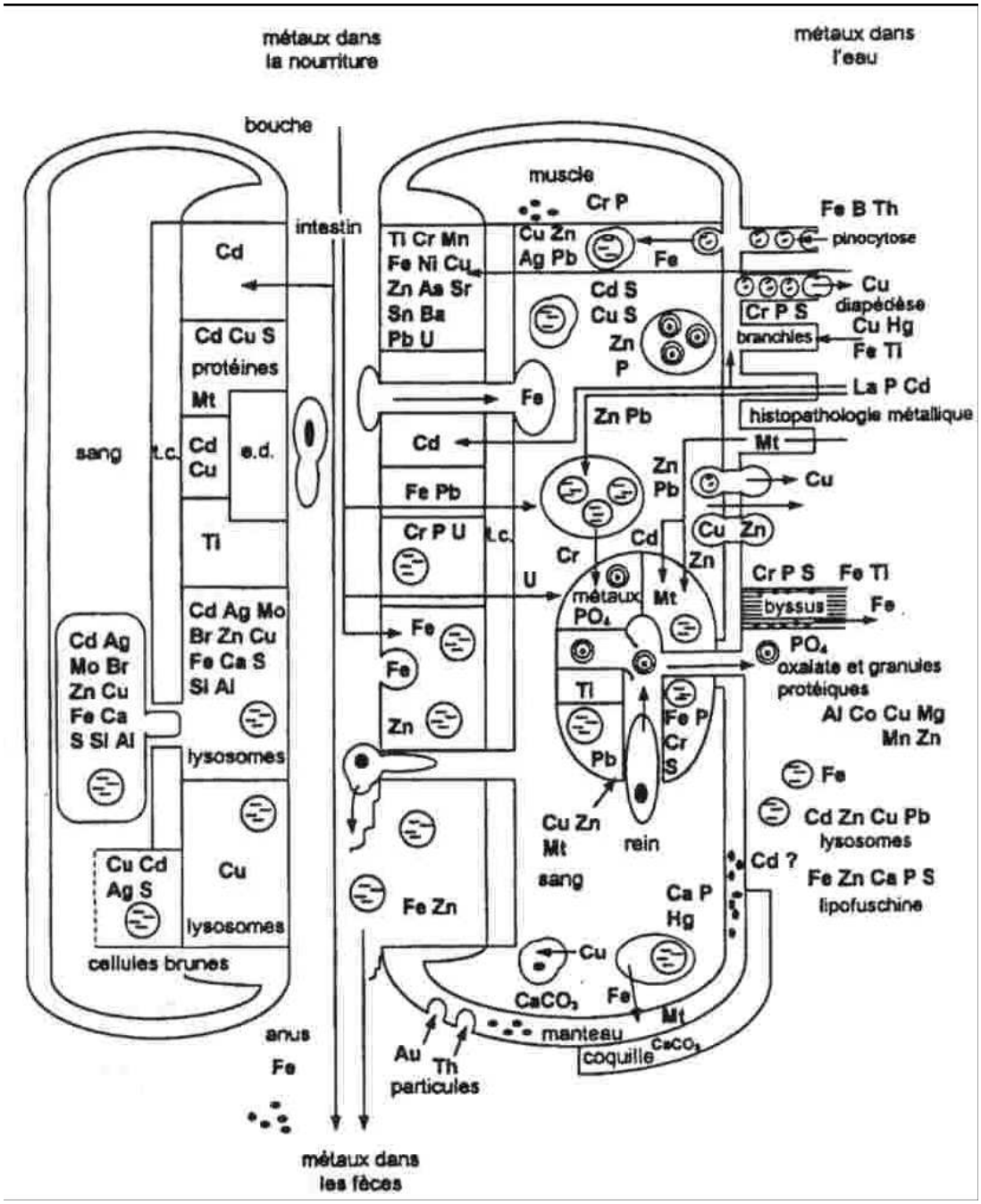


Figure 1 : Représentation schématique des voies d'entrée des métaux chez les bivalves (Viarengo et Nott, 1993)

d. Cd chez les organismes marins

La bioaccumulation du Cd chez les organismes marins a été étudiée en laboratoire et en milieu naturel. Chez les poissons, le foie représente un lieu préférentiel de stockage de Cd comparé aux muscles et aux gonades (Hamza-Chaffai et al. 1996). Chez les mollusques bivalves l'accumulation de Cd dépend du temps d'exposition et varie selon l'organe étudié. Barka et ses collaborateurs (2001) ont mis en évidence la toxicité du Cd, par les tests de CL 50, chez l'espèce *Trigriopus brevicornis* (crustacé copépode). Mouneyrac et ses collaborateurs (2001) ont montré que le Cd s'accumule préférentiellement dans l'hépatopancréas des crabes *Pachygrapus marmoratus*. Chez le bivalve *Pyganodon grandis* l'accumulation du Cd au niveau de la glande digestive suit le gradient de la contamination métallique (Bonneris et al. 2005). Bebianno et ses collaborateurs (2005), ont observé une accumulation de Cd au niveau des branchies de *Bathymodiolus azoricus*, cette accumulation est plus importante que celle observée au niveau du manteau. Chez les moules *Mytilus edulis*, les concentrations en Cd augmentaient proportionnellement à la période d'exposition (Amiard-Triquet et al. 1986). Chez les huîtres *Crassostrea gigas*, Mouneyrac et ses collaborateurs (1998) ont observé que les concentrations du métal dans la glande digestive étaient plus élevées que celles enregistrées dans les branchies. Chez *Ruditapes decussatus*, les études de contamination en Cd effectuées au laboratoire (Géret et al. 2002 b ; Ladhar-Chaabouni et al. 2007), ainsi que les études menées *in situ* (Hamza-Chaffai et al. 1999) ont montré d'une part, que les concentrations en Cd augmentaient avec sa teneur dans le milieu environnemental et d'autre part que l'ordre d'accumulation était : glande digestive > branchies > reste (Bebianno et Serafim, 2003).

B. Les bioindicateurs de pollution

Le recours à des méthodes basées sur des observations qualitatives et/ou quantitatives des organismes vivants dans les milieux naturels est rapidement apparu comme un moyen potentiel de pallier les insuffisances des méthodes d'analyses chimiques. Ainsi, dés le début du XX^{e} siècle, les organismes aquatiques ont été utilisés comme indicateur de la qualité de l'eau des rivières (Lagadic et al. 1998). D'où le nom de bioindicateur défini comme espèces ou groupes d'espèces qui, par leur présence et/ ou leur abondance, sont significatifs d'une ou de plusieurs propriétés de l'écosystème dont ils font partie (Guelorget et Perthuisot, 1984). D'innombrables travaux ont été publiés sur l'emploi de bioindicateurs tels que les espèces bioaccumulatrices destinés à évaluer la qualité des

milieux naturels. En effet, l'accumulation de certains polluants par les organismes bioaccumulateurs facilite leur mise en évidence et leur quantification par des méthodes chimiques et/ou physiques (Amiard et al. 1989). De plus, les espèces bioaccumulatrices retenues comme bioindicateurs sont en général des espèces sessiles, abondantes, relativement résistantes aux toxiques et d'une durée de vie suffisante qui leur confère une capacité d'intégration des variations de la qualité du milieu (Amiard et al. 1989). La palourde *R. decussatus* et la coque *C. glaucum* ont été utilisées comme bioindicateurs de pollution métallique de leur environnement (Machreki-Ajimi et Hamza-Chaffai, 2006 ; Smaoui-Damak et al. 2004). En effet, la palourde a été utilisée par le réseau national de surveillance des zones de production des mollusques bivalves qui a été mis en place depuis 1995. Quatre principaux réseaux nationaux tunisiens ont été mis en place :

-REMI : réseau de surveillance microbiologique,

-REPHY : réseau de surveillance du phytoplancton,

-REBI : réseau de surveillance de biotoxines marines,

-RECNO : réseau de surveillance chimique (Hamza, 2003).

1. *Ruditapes decussatus*

a. Position systématique

Embranchement : Mollusques

Classe : Lamellibranches

Ordre : Eulamellibranches

Sous Ordre : Hétérodynes

Famille : Veneridae

Genre : *Ruditapes*

Espèce : *decussatus*

b. Coquille

La palourde possède une coquille équivalve, inéquilatérale. Elle est ornée d'un double jeu de stries rayonnantes, partant du sommet, et de stries concentriques, bien marquées à l'arrière. La charnière comprend trois dents cardinales sur chaque valve (Fig. 2). Il n'y a pas de dents latérales. La forme générale de la coquille peut varier énormément d'une population à l'autre. La coloration externe de la coquille est très variée (Franc, 1960).

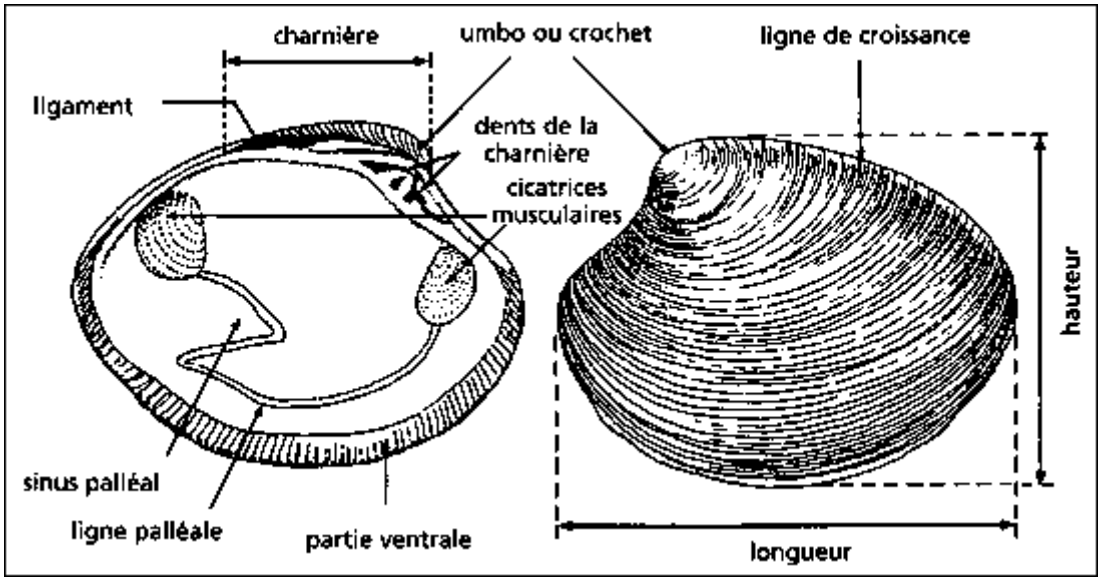


Figure 2 : Caractères externes et internes des valves de palourde (Cesari et Pellizzato, 1990) :

c. Anatomie

Le corps mou est couvert par le manteau (Fig. 3), qui est composé de deux membranes de tissus fins. Les deux lobes du manteau sont attachées à la coquille au niveau de la charnière ventrale et s'étend dans la cavité palléale. Ils sont libres sur les bords. Outre la sécrétion des valves qui constitue la fonction principale du manteau, ce dernier assure d'autres tâches. Il a une fonction sensorielle et initie la fermeture des valves en réponse à des conditions défavorables du milieu environnant (Franc, 1960).

Chez les palourdes, les deux muscles adducteurs (Fig. 3) sont localisés à proximité des bords antérieurs et postérieurs des valves de la coquille. Le muscle ferme les valves et agit contrairement au ligament et au resilium, qui entraînent l'ouverture des valves au moment du relâchement des muscles. Deux paires de branchies (Fig. 3), qui assurent la respiration, sont localisées sur chaque côté du corps. A l'extrémité de la partie antérieure, se trouvent les siphons. Les siphons sont formés par le manteau qui présente deux structures palléales ventrales déterminant un orifice inhalant et un orifice exhalant (Cleveland et al. 1995). A la base de la masse viscérale se trouve le pied. Dans des espèces, telles que les palourdes le pied est un organe bien développé dont l'animal se sert pour s'enfouir dans le substrat et se maintenir dans une position donnée (Franc 1960).

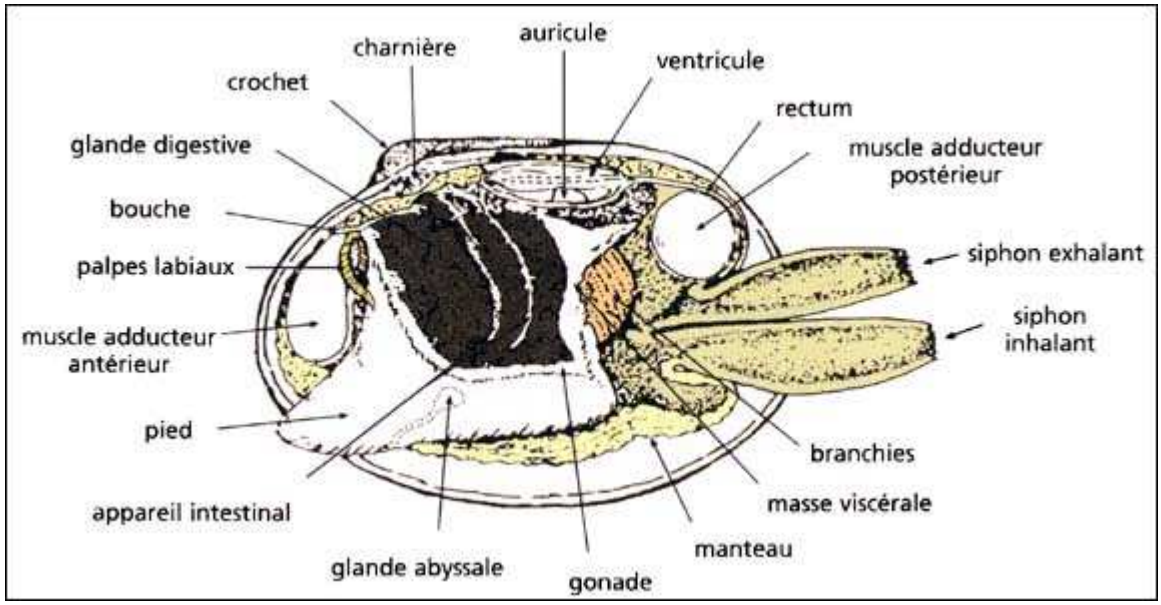


Figure 3 : Anatomie interne du corps mou de la palourde (Cesari et Pellizzato, 1990).

d. Alimentation

La palourde se nourrit principalement de phytoplancton et de matières organiques particulaires. Ces éléments vitaux sont amenés par le courant d'eau créé par le siphon inhalant de la palourde à la surface du sédiment. L'eau ainsi filtrée passe à travers les branchies qui retiennent à la fois l'oxygène dissous dans l'eau et les substances nutritives. Le siphon exhalant assure la fonction d'excrétion (Sobral et Widdows, 2000).

e. Habitat et répartition géographique

La palourde *Ruditapes decussatus* est très abondante au niveau de la zone Estran du golfe de Gabès. Elle vit enfouie dans les fonds sableux, sables et graviers vaseux ou vases compactes de l'étage infralittoral et des lagunes côtières. La palourde, microphage filtreur, a été largement utilisée comme espèce bioindicatrice de milieux.

Cette espèce à vaste répartition géographique est présente en Atlantique et en Méditerranée. En Méditerranée, *Ruditapes decussatus* est très répondue le long des cotes Est et Ouest, et même autour des îles (Ben Haj, 1992).

f. Croissance

La croissance est fortement ralentie pendant la saison froide. Elle est maximale au printemps et à l'automne. De fortes variations entre les années sont observées, elles sont liées à la variabilité des conditions climatiques. La croissance est également très variable en fonction de la saison, du site, de la densité et de la nourriture disponible (Maître-Allain, 1983).

g. Reproduction

La reproduction de la palourde est cyclique et les deux périodes privilégiés de la ponte se situent respectivement de fin mai à début juin et de la mi-octobre à début novembre (Trigui- El Menif, 1995). La maturation sexuelle et l'émission des gamètes se font sous l'effet d'une hausse progressive de température. L'essentiel de la reproduction s'effectue pendant le printemps et secondairement en automne (Medhioub, 1986), période coïncidant avec une augmentation de la production primaire (Trigui- El Menif, 1995).

2. *Cerastoderma glaucum* et *Cerastoderma edule*

a. Taxonomie

Embranchement : Mollusques

Classe : Bivalves

Sous classe : Pélécypodes

Ordre : Eulamellibranches

Famille : Cardiidae

Genre : *Cerastoderma*

Espèce : *glaucum*/ *edule*

b. Biologie de *Cerastoderma glaucum*/ *edule*

Ce sont des animaux au corps mou (Mollusque) entouré d'un manteau qui délimite une cavité palléale dans laquelle baignent 2 paires de branchies lamelleuses (Lamellibranche). La tête est atrophiée et le pied développé "en forme de hache" (= Pélécypodes). La coquille possède 2 valves égales unies par la charnière du côté dorsal (Fischier et al. 1987). Il s'agit d'espèces benthiques sédentaires qui vivent enfouies, à faible profondeur, dans les vases littorales, les sables ou les graviers côtiers (Fischier et al. 1987). A la surface du sable, on distingue difficilement deux trous qui correspondent aux deux orifices respiratoires qui se prolongent par des siphons courts, le siphon inhalant est proche du pied alors que le siphon exhalant est proche du crochet de la coquille. Ces siphons communiquent avec la cavité palléale qui est donc traversée par un courant d'eau qui baigne les branchies formées de filaments, couvertes de cils vibratiles. La respiration est branchiale (Zouari, 1985). Ce sont des consommateurs microphages suspensivores qui se nourrissent de particules en suspension dans l'eau, notamment des algues unicellulaires qui sont entraînées par le courant d'eau qui traverse la cavité palléale; l'eau est filtrée, et un tri des particules est effectué avant l'ingestion. Il s'agit d'animaux à sexes séparés; à l'issue d'une fécondation aquatique externe, les oeufs donnent naissance à des larves véligères ciliées qui après métamorphose donneront un juvénile (Machreki-Ajmi, 2002).

c. Différences morphologiques entre *C. glaucum* et *C. edule*

Une différenciation basée sur la morphologie de la coquille a été réalisée par Rasmussen (1973) :

Caractéristiques de la coquille	*C. edule*	*C. glaucum*
Forme	Normalement arrondie, parfois asymétrique, rarement allongée dans la partie postérieure	Asymétrique, allongée postérieurement, varie en fonction des conditions environnementales, extrêmement asymétrique dans les eaux stagnantes salées.
Côtes	Côtes denses, plates, arrêtes transversales largement espacées, l'espace entre les Côtes est réduit	Côtes aiguisées, l'espace entre les Côtes est large
Structure interne	Marginale qui s'étend sur une partie de la coquille	Marginale qui s'étend sur toute la partie interne de la coquille
Longueur du ligament de la charnière par rapport à celle de la coquille	Ligament long, coquille compressée	Ligament court, coquille gonflée
Periostracum	Epais, développé autour de la coquille, absent au centre	Epais et mieux développé, il couvre 75% de la surface de la coquille
Couleur	Blanchâtre, pigment bleu - marron entourant l'ouverture des siphons	La pigmentation dépend des conditions environnementales

Tableau 1. Différences observées au niveau de la coquille de *C. glaucum* et *C. edule*



Figure 4. *C. glaucum*



Figure 5. *C. edule*

C. Les biomarqueurs

Un biomarqueur est un changement observable et/ ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic et al. 1997). Les expérimentations en conditions contrôlées ont largement démontré que les biomarqueurs peuvent être utilisés pour évaluer l'exposition des individus à des xénobiotiques et, dans certains cas, les effets de ceux-ci sur les structures et fonctions vitales de l'organisme (Huggett et al. 1992). Ces bases expérimentales ont permis d'envisager l'utilisation des biomarqueurs dans le milieu naturel, notamment dans le cadre des programmes de surveillance de la qualité de l'environnement (McCarthy et Shugart, 1990 ; Peakall, 1992).

L'analyse du rôle fonctionnel des biomarqueurs proposée par Depledge (1994) a montré que les biomarqueurs contribuent essentiellement au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Lorsque la dose interne et/ou la durée d'exposition augmentent, certains biomarqueurs, comme les métallothionéines, interviennent pour compenser l'action des contaminants, notamment en limitant leur toxicité. D'autres biomarqueurs au contraire ne contribuent en rien à limiter l'action des toxiques : ils la subissent. C'est par exemple le cas de la synthèse du malonedialdéhyde et l'inhibition de l'acétylcholinestérase (Lagadic et al. 1997).

1. Les métallothionéines

Les métallothionéines (MTs) appartiennent au groupe des biomarqueurs qui contribuent à limiter la toxicité des xénobiotiques. Historiquement, les premières MTs ont été isolées par Margoshes et Vallee (1957) dans le cortex rénal des chevaux. Les MTs sont des protéines stables à la chaleur, de faible poids moléculaire (6-7 KD chez les mammifères), ne possèdent aucun acide aminé aromatique, ni histidine, ni méthionine, mais elles ont, en revanche, une exceptionnelle richesse en résidus de cystéine (20 à 30% de la totalité des acides aminés) et de ce fait une importante capacité de liaison des métaux (Kagi et Vallee, 1960).

1.1 Classification et Nomenclature

Le critère retenu pour classer les différentes MTs est l'alignement des séquences Cys-Cys, Cys-X-Cys et Cys-X-Y-Cys, où X et Y représentent un acide aminé autre que la cystéine. Selon ce critère, trois classes de MTs ont été définies (Fowler et al. 1987). La classe I regroupe l'ensemble des MTs découvertes chez les vertébrés ainsi que celles

appartenant à d'autre phyla mais qui présentent un alignement des résidus de cystéines très proche des MTs des vertébrés. La classe II comprend des protéines qui présentent plusieurs propriétés communes avec les MTs mais pas d'homologie avec les MTs de mammifères. Parmi les MTs de la classe II figurent les MTs de drosophiles, d'oursins, de nématodes, de champignons et de cyanobactéries. La classe III regroupe des polypeptides qui sont très différents des MTs des deux premières classes. Ils sont organisés en motifs ayant pour structure $(Glu\text{-}Cys)_n$-Gly où n varie de deux à dix.

1.2 Propriétés biochimiques

a. Composition en acides aminés

La caractéristique principale des MTs est leur forte teneur en résidus cystéines présents dans des motifs Cys-X-Cys (Fig. 6) décrits pour la première fois par Kojima et al (1976). Ce motif s'est révélé présent dans l'ensemble des MTs qui ont été décrites jusqu'à présent. La composition en acides aminés des MTs varie selon les espèces, la plupart des vertébrés présente des MTs contenant entre 60 et 63 résidus d'acides aminés (Palmiter et al. 1992). Seulement 25 acides aminés composant la MT du champignon filamenteux *Neurospora crassa* (Munger et al. 1985) alors que chez les mollusques bivalves les MTs présentent de 71 à 75 résidus d'acides aminés (Mackay et al. 1993).

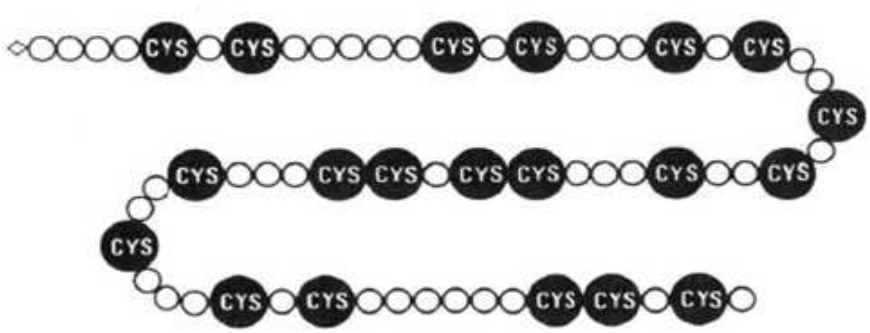


Figure 6. Mode de distribution des résidus de cystéines au sein d'une métallothionéine de mammifères (Kagi et Kojima, 1987)

b. Fixation des ions métalliques

La capacité des MTs à se lier à certains métaux par l'intermédiaire des groupements thiol, a été étudiée essentiellement chez les mammifères (Braun et al. 1992), quelques invertébrés tels que les crustacés (Zhu et al. 1994) et les échinodermes (Riek et al, 1999). La fixation des métaux s'effectue selon la valence des ions métalliques qui ne possèdent pas tous la même affinité pour les sites ligands des MTs, ainsi Hg et Ag ont une affinité

plus grande que celle du Cu, elle-même 100 fois plus élevée que celle du Cd, elle-même 1000 fois plus forte que celle du Zn (Cosson, 1992).

c. Structure primaire et spatiale

Chez les mammifères, qui constituent le groupe le plus étudié, les MTs se présentent sous l'aspect d'une monocouche peptidique entourant deux noyaux métalliques (Fig. 7) (Furey et al. 1987). La disposition des résidus de cystéines dans la chaîne polypeptidique permet de distinguer deux domaines au niveau de la molécule. Le premier domaine, appelé domaine β, se caractérise par la présence de 9 résidus de cystéines et porte la terminaison amine. Ce domaine β est impliqué dans des liaisons avec 3 ions métalliques et fixe avec une plus forte affinité le cuivre et l'argent. Le deuxième domaine, appelé domaine α, comporte 11 résidus de cystéines dont certains forment des motifs Cys-Cys et se termine par la fonction carboxyle. Les deux domaines ne fixent pas le même nombre d'ions (4 pour le domaine α et 3 pour le domaine β), ne se remplissent pas simultanément et présentent des affinités respectives différentes vis-à-vis des métaux. Le zinc et le cadmium se lient plus fermement au domaine α qu'au domaine β, alors que le cuivre et l'argent présentent une affinité inverse. Cependant, bien que fermement liés à l'apoprotéine, ces ions peuvent être déplacés de leur site de fixation par d'autres ions en solution. Ces derniers faciliteraient le relargage des métaux chélatés en agissant au niveau des liaisons cystéinique des sites de fixation (Otvos et al. 1993). Cette propriété expliquerait la facilité avec laquelle les MTs peuvent échanger leur zinc avec d'autres ligands intracellulaires. En ce qui concerne la cinétique de cet échange, il a été montré que le domaine α était beaucoup plus réactif, bien qu'il lie plus fermement le zinc que le domaine β. De nombreux études ont été menées pour mieux comprendre la sélectivité du mode de remplissage des deux domaines ou les échanges intermétalliques, en utilisant soit directement des MTs saturées en Zn (Zn_7-MT) ou en cuivre (Cu_{12}-MT), soit leurs analogues respectifs ($^{109}Cd_7$ et $^{111}Ag_{12}$-MT). Elles ont mis en évidence que la structure des deux domaines est parfaitement adaptée à la fixation simultanée, mais séparée spatialement, du cuivre et du zinc, et que cette fixation particulière du cuivre n'interfère pas avec la fonction essentielle des MTs, c'est-à-dire, le transfert rapide de zinc aux autres ligands intracellulaires (Otvos et al. 1993).

Globalement, la métallothionéine mammalienne se présente sous la forme d'une haltère. Il n'y a aucun contact entre les deux domaines sinon la liaison entre deux lysines (30 et 31). L'indépendance des ensembles explique l'indépendance des modes de remplissage des deux domaines et leur différence d'affinité pour les métaux. Labsence des liaisons croisées

multiples entre les deux domaines autorise une plus grande souplesse de la molécule lui permettant la fixation d'ions de tailles différentes sans grande perturbation stérique (Lagadic et al. 1998).

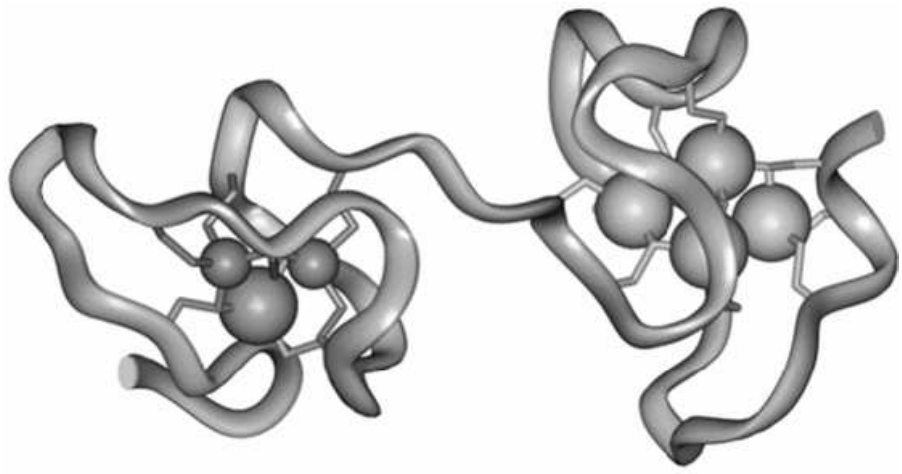


Figure 7. Structure tridimensionnelle de métallothionéine chez le rat. Les sphères représentent les ions métalliques insérés entre les résidus de cystéines (modifié d'après Romero-Isart et Vasak, 2002)

1.3 Rôle des métallothioneines

a. L'homéostasie du zinc et du cuivre

Kojima et Kagi (1978) ont montré que les MTs de mammifères jouent un rôle de réservoir de métaux intracellulaires capables de moduler l'homéostasie et de transférer les éléments essentiels (zinc et cuivre) à partir de et vers les métalloenzymes. Différentes études ont montré la capacité des MTs à donner ou à fixer le Zn au cours des interactions avec les Zn-métalloenzymes (Jacob et al. 1998 ; Jiang et al. 1998 ; Maret et Vallee, 1998). Pour avoir une signification physiologique, le complexe MT-Zn doit avoir la capacité d'échange avec les autres structures Zn dépendantes, les MTs peuvent avoir le rôle de chaperonne pour le Zn (Suhy et al. 1999). Des cellules dépourvues d'un apport extracellulaire de Zn répondent avec un transfert de Zn des MTs vers les autres molécules (Krezoki et al. 1988), ce qui reflète le rôle donneur de Zn des MT. Deux modèles d'échange de Zn entre les MT et les autres Zn chélateurs ont été avancés : un échange direct entre les 2 types de molécules ou un transfert qui se fait avec la libération des ions Zn.

b. Détoxication des métaux

Les métallothionéines induites par le cadmium (Piscator, 1964) jouent un rôle fondamental dans la défense contre la toxicité de ce métal. En effet, les MTs agissent comme des agents de séquestration des métaux toxiques afin d'empêcher leur fixation sur

les sites actifs d'autres protéines provoquant alors leur dénaturation ou leur inactivation. Le mécanisme de détoxication résulterait d'échanges entre les cations toxiques et le zinc sur la protéine.

Des études ultérieures ont montré que la perturbation du gène MT chez le rat et la levure élimine l'apparition du phénotype metal-résistant (Thiele et al. 1986 ; Michalska et choo, 1993 ; Masters et al. 1994). Une insertion du gène MT humain à la levure dépourvue de gène MT, confère à cette dernière une résistance contre le cuivre (Thiele et al. 1986).

c. Protection contre le stress oxydant

Il semble que les MTs soient impliquées dans la protection contre le stress oxydant (Fabisiak et al. 1999). Viarengo et ses collaborateurs (1999) ont montré que les moules (*M. edulis*) intoxiquées par le cadmium résistent mieux au stress oxydant que celles qui sont non exposées. Ces auteurs suggèrent que les métallothionéines sont capables de protéger les cellules vis-à-vis du stress oxydant. Si dans certaines conditions l'induction des MTs permet de séquestrer les radicaux hydroxyles (OH) et superoxydes (O2-) et, de protéger contre la peroxydation lipidique, l'importance relative des MTs comparée à d'autres systèmes de défense (glutathion et superoxyde dismutase) n'est pas élucidée (Andrews, 2000).

1.4 Mécanisme d'induction des métallothionéines

La synthèse des MTs est inductible par différents facteurs dont les métaux lourds sont les plus répandus. Cette induction est d'autant plus forte que la concentration intracellulaire en Zn^{2+} ou en Cd^{2+} est importante (Amiard et Cosson, 1997). Pour connaître le mécanisme d'induction des MTs par les métaux, différentes études sur la localisation des MTs au niveau de la cellule ont été réalisées (Banerjee et al. 1982). Ces études ont montré la présence de MTs non seulement au niveau du cytoplasme mais aussi au niveau du noyau. Chez les individus témoins, les MTs sont présentes au niveau du cytoplasme d'une façon exclusive. Après une injection de métaux les MTs se trouvent aussi bien au niveau du cytoplasme qu'au niveau du noyau. Ce qui suggère que la faible quantité en thionéines présente dans le cytoplasme des cellules des individus témoins peut inhiber la traduction des ARNm en MTs. Après injection de métaux lourds, les thionéines cytoplasmiques se lient aux métaux et vont être transportées au niveau du noyau où la transcription en ARNm codant pour la MT serait importante. Par conséquent, une traduction des ARNm et une synthèse active des thionéines. Dans les cas où l'apport en métaux s'arrête, les thioneines cytoplasmiques libres vont s'accumuler causant l'inactivation des ARNm (Cherian et Nordberg, 1983).

1.5 Dégradation des métallothionéines

Plusieurs études ont montré que les lysosomes étaient impliqués dans la dégradation des métallothionéines mais le rôle du cytosol ne peut être exclu (Steinebach et Wolterbeek, 1992). Curtis et ses collaborateurs (1994) ont montré une dégradation plus importante au niveau des lysosomes qu'au niveau du cytosol, ceci est probablement du au pH qui est nettement plus faible au niveau des lysosomes par rapport à celui du cytoplasme et au grand nombre d'enzymes tel que les cathepsines présentes dans les lysosomes. En présence de ces protéases et du pH acide, les métallothionéines ont tendance à libérer les ions métalliques qui les protégeaient contre la dégradation (Curtis et al. 1994). Cette protection varie en fonction de la nature du métal associé. En effet, la demi-vie biologique pour la Cd-thionéine et la Hg-thionéine est beaucoup plus longue que pour la Zn-thionéine. La Cu-MT résiste à la dégradation lysosomale et des agrégats insolubles de Cu-MT se forment dans les lysosomes (Amiard et Cosson, 1997). Les métaux accumulés au niveau du système lysosomal sont stockés sous forme non toxique et excrétés par des vésicules d'exocytose contenant des granules où sont précipités les métaux (Viarengo et al. 1981 ; 1989).

1.6 Mécanismes moléculaires de l'induction

a. Les promoteurs des gènes MTs

La régulation de l'activité des gènes de métallothionéines est complexe. Elle est caractérisée par la présence dans la région située en amont du point d'initiation de la transcription de plusieurs éléments constitutifs capables d'initier de manière indépendante l'activation de la transcription du gène. Les séquences impliquées dans la régulation des gènes de métallothionéines sous l'effet d'ions métalliques sont appelées MRE pour « Metal Responsive Element » (Stuart et al. 1984 ; Carter et al. 1984) (Fig. 8). Ces séquences sont souvent localisées dans les 150 premières bases en amont du site de transcription (Fernando et Andrews, 1989). L'alignement des différents MRE isolés chez plusieurs organismes a permis de dégager une séquence consensus de huit nucléotides. CTCTGCRCNCGGCCC où R représente A ou G et N représente l'un des quatre nucléotides (Stuart et al. 1985 ; Serfling et al. 1985). Les séquences régulatrices des gènes de métallothionéines contiennent également une région de type « TATA Box » (TATAAAA) et une région de type « GC box » (GGGGCGGGG) responsables de la fixation de l'ARN polymérase (Breathnach et al. 1981).

En plus des MRE, les promoteurs des gènes de MTs possèdent d'autres sites de fixation de nombreux autres facteurs de transcription comme Nrf2, protéine activée par le stress oxydatif et dont l'interaction avec les ARE « Antioxydant Responsive Element » assure l'induction de protéines cytoprotectives comme la NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) et de protéines anti oxydantes comme la heme oxygenase 1 (HO1) (He et al. 2008).

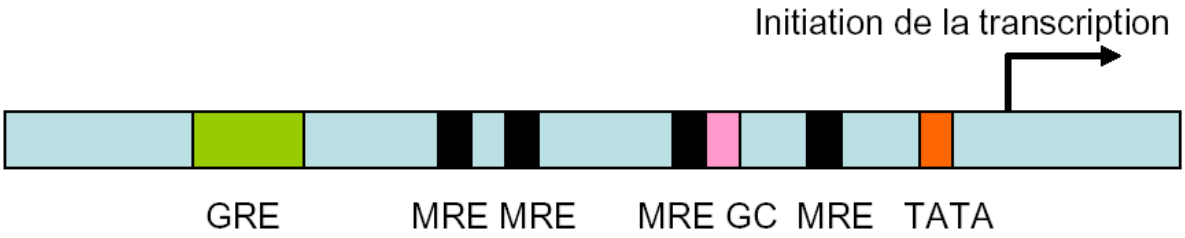


Figure 8. Représentation schématique de l'organisation des séquences de régulation localisées en amont des gènes responsables de la synthèse des métallothionéines (GRE :Glucocorticoid Responsive Element ; MRE : Metal Responsive Element ; GC : GC box ; TATA: TATA box) (Hardivillier, 2005).

b. Contrôle transcriptionnel

L'existence de protéines capables de se lier aux MREs des gènes des MTs a été décrite. Ces protéines appelées MTF-1 (Metal transcription Factor) sont caractérisées par la présence de six doigts à zinc et sont indispensables à l'expression basale et jouent un rôle médiateur dans la réponse au stress métallique (Palmiter, 1994). L'activité de MTF-1 pourrait être régulée par un facteur d'inhibition sensible au Zn appelé Metal Transcription Inhibitor (MTI). En l'absence de zinc, le facteur MTF-1 est complexé avec MTI et en présence de zinc MTI se dissocie de MTF-1 ce qui permet à ce dernier d'interagir avec les séquences MRE du promoteur de MT et d'activer la transcription (Palmiter, 1994 ; Roesijadi, 1996). Le zinc intracellulaire est présent dans de nombreuses métalloprtéines. Après une exposition à d'autres métaux tels que le cuivre, le cadmium et le mercure, qui ont une plus grande affinité pour ces ligands, le zinc va être remplacé par ces métaux et libéré pour être lié à l'inhibiteur. Le facteur MTF-1 actif permet alors l'expression des gènes de MT (Palmiter, 1994).

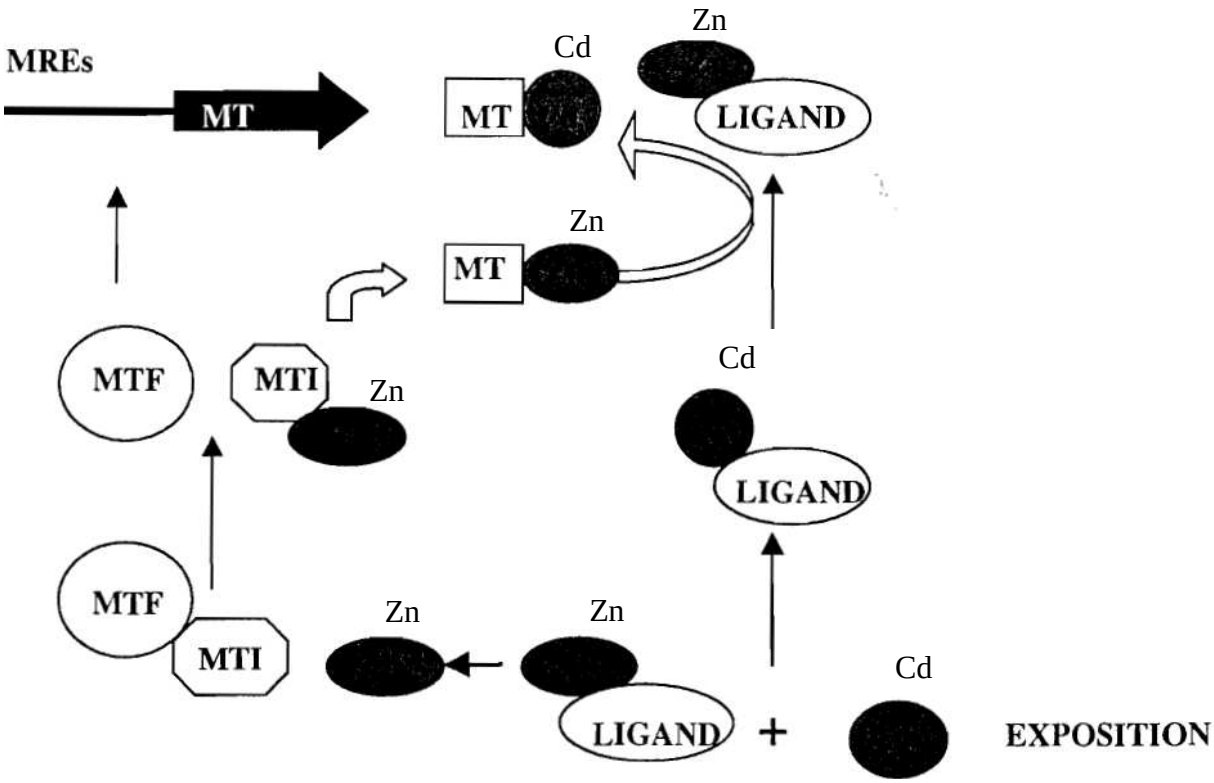


Figure 9. Modèle d'induction de MT faisant intervenir un ligand. Le zinc fixé sur ce ligand est libéré par le cadmium. Le zinc libéré est fixé aux MTI ce qui provoque une dissociation entre les MTF et les MTI. Les MTF libres interagissent avec les séquences MRE du promoteur de MT et activent la transcription (Roesijadi, 1996).

1.7 Les métallothionéines comme biomarqueur

L'induction de MTs est une réponse biologique à une exposition métallique dans l'environnement, cette caractéristique est typique de biomarqueurs tels qu'ils sont définis par Lagadic et ses collaborateurs (1997) : un biomarqueur est une modification d'un paramètre observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant.

La synthèse de MTs suite à une contamination par les métaux (Ag, Cd, Cu, Hg etc) a été démontrée chez plusieurs espèces (annelides, mollusques, crustacés, les poissons etc), ce qui suggère la possibilité d'utiliser les MTs comme biomarqueur d'exposition métallique (Amiard et al. 2006). En effet, cette induction a été mise en évidence chez plusieurs mollusques bivalves exposés à une contamination métallique soit dans leur milieu naturel, soit au laboratoire (Tableau 2). L'utilisation de MTs comme biomarqueur permet l'évaluation de l'état de « santé » des écosystèmes en permettant la détection de façon

précoce les modifications biologiques qui pourraient intervenir à long terme (Hamza-Chaffai et al. 1998).

Groupes zoologiques	**Espèce**	**Condition**	**Inducteur**				**Référence**
			Cd	**Cu**	**Zn**	**autre**	
Bivalves	*Crassostrea gigas*						
	Embryon, Larve	Terrain	+	+	+		Geffard et al. (2003)
	Tissu mou	Lab	+	+			Frazier et George (1983)
	Tissu mou	Lab	+				Fowler et al. (1986)
	Tissu mou	Lab	+				Roesijadi et al. (1989)
	Tissu mou	Terrain	+	+	+		Mouneyrac et al. (1998)
	Digestive gland	Terrain	+	++			Imber et al. (1987)
	Gills	Terrain	+	+	+		Geffard et al. (2001)
	Crassostrea glomerata						
	Tissu mou	Terrain	Non		Non		Nordberg et al. (1986)
	Crassostrea virginica						
	Embryon	Lab	+	+			Ringwood et Brouwer, 1993 ; Ringwood et Brouwer, 1995
	Tissu mou	Lab	+				Ridlington et Fowler (1977)
	Tissu mou	Lab	+				Ridlington et Fowler (1979)
	Branchies	Lab	+				Roesijadi et Klerks (1989)
	Branchies	Lab	+				Unger et al. (1991)
	Branchies	Terrain	+	+			Roesijadi (1992)
	Branchies	Lab	+				Roesijadi (1994)
	Branchies	Terrain	+	+	Non		Roesijadi (1994)
	Dreissena polymorpha						
	Tissu mou	Terrain		+		Se	Lafontaine et al. (2000)
	Tissu mou	Lab	+	Non			Lecoeur et al. (2004)
	Macoma balthica						
	Tissu mou	Lab		+			Johansson et al. (1986)
	Tissu mou	Terrain		+	+	Ag	Johansson et al. (1986)

	Tissu mou	Lab	+[a]	+[a]	+[a]		Bordin et al., 1994 ; Bordin et al., 1997
	Tissu mou	Terrain	+	+	+		Bordin et al. (1997)
	Tissu mou	Lab	+			Ag, Hg	Mouneyrac et al. (2000)
	Tissu mou	Terrain		+		Ag	Bray et al. (1983)
	Mytilus edulis						
	Tissu mou	Lab	+				Noël-Lambot (1976)
	Tissu mou	Lab	+				George et al. (1979)
	Tissu mou	Terrain	+				Frankenne et al. (1980)
	Tissu mou	Lab	+				Nolan et Duke (1983)
	Tissu mou	Lab	+				Frazier (1986)
	Tissu mou	Lab	+				Langston et al. (1989)
	Tissu mou	Lab	+				Bebianno et Langston (1991)
	Tissu mou	Lab	+				Mackay et al. (1993)
	Tissu mou	Lab	+	+			Bebianno et Langston (1999)
	Tissu mou	Terrain				V	Amiard et al. (2004)
	Manteau	Lab	+				Carpenè et al. (1980)
	Branchies	Lab	+				Carpenè et George (1981)
	Branchies	Lab				Hg	Roesijadi et al. (1982a)
	Branchies	Lab				Hg	Roesijadi et al. (1982b)
	Branchies	Lab				Hg	Roesijadi (1986)
	Branchies	Lab	+	+	+		Roesijadi et Fellingham (1987)
	Branchies	Terrain	+	+	+		Talbot et Magee (1978)
	Branchies	Lab	+	+	Non	Hg	Roesijadi et al. (1988)
	Glande digestive	Lab				Ag	George et al. (1986)
	Glande digestive	Lab		+			Harrison et al. (1983)
	Glande digestive	Lab	+				Barsyte et al. (1999)
	Glande digestive	Terrain	+	+	+		Geffard et al. (2001)
	Viscère	Field	+	+	+		Talbot et Magee (1978)
	Rein	Lab	+				George et Pirie (1979)
	Mytilus galloprovincialis						
	Tissu mou	Lab		+			Viarengo et al. (1984)
	Tissu mou	Lab	+				Bebianno et Langston

							(1992)
	Tissu mou	Terrain	+	+	+		Bebianno et Machado (1997)
	Tissu mou	Terrain	+	+	+	Ni	Mourgaud et al. (2002)
	Branchies	Lab		+			Viarengo et al. (1980)
	Branchies	Lab		+			Viarengo et al. (1981)
	Branchies	Lab	+				Isani et al. (1997)
	Branchies	Lab		+			Viarengo et al. (1997)
	Branchies	Lab	+				Bebianno et Serafim (1998)
	Branchies	Lab	+				Serra et al. (1999)
	Manteau	Lab		+			Viarengo et al. (1981)
	Glande digestive	Lab		+			Viarengo et al. (1981)
	Glande digestive	Lab		+			Viarengo et al. (1985)
	Glande digestive	Terrain			+		Viarengo et al. (1997)
	Glande digestive	Lab	+	+		Pb	Pavicic et al. (1993)
	Glande digestive	Lab	+				Langston et al. (1989)
	Muscle adducteur	Lab	+				Carpenè et al. (1983)
	Muscle adducteur	Lab	+				Isani et al. (1997)
	Pied	Lab	+				Carpenè et al. (1983)
	Gonade	Lab	+				Carpenè et al. (1979)
	Viscère	Lab	+				Isani et al. (1997)
	Embryon-larve	Lab	+		+		Pavicic et al., 1994a Pavicic et al., 1994b
	Embryon-larve	Lab	+[a]	+[a]	+[a]		Geffard et al. (2002)
	Ruditapes decussatus						
	Tissu mou	Lab	+				Bebianno et al. (1993)
	Glande digestive	Lab	+				Bebianno et al. (1993)
	Branchies	Lab	+				Bebianno et al. (1993)
	Glande digestive	Lab		+			Hamza-Chaffai et al. (1998)
	Branchies	Lab		+			Roméo et Gnassia-Barelli (1995)
	Branchies	Lab	+				Bebianno et Serafim (1998)
	(=*Ruditapes*) *Tapes philippinarum*						
	Branchies	Terrain		+			Irato et al. (2003)

	Glande digestive	Lab	+		Non	Ag	Ng et Wang (2004)
	Tissu mou	Lab	+				Ishiguro et al. (1982)

Tableau 2. Exemples de mollusques au niveau desquels une induction de MT a été observée suite à une exposition aux métaux au laboratoire ou dans leur milieu naturel (Terrain) (Amiard et al. 2006).
[a] =Mélange.

1.8 Les différentes méthodes de dosage des MTs

Pour estimer le taux des MTs contenu dans les tissus des organismes, différentes méthodes peuvent être proposées :

- La chromatographie :

La chromatographie est une technique analytique qui permet la séparation des constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeuse. Les méthodes chromatographiques peuvent être classées en fonction de la nature physique des phases (mobile et stationnaire). Parmi ces méthodes, les plus courantes sont la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Lagadic et al. 1998).

- La méthode de saturation métallique :

L'affinité d'agglomération des métaux avec les thionéines suit l'ordre suivant : Hg>Cu> Cd>Zn. Ainsi l'échange avec Hg^{203} et le Cd^{109} radioactifs peut être utilisé pour l'estimation des MTs (Hamer, 1986).

- La polarographie :

La polarographie à impulsion différentielle est une technique de voltampérométrie permettant la quantification des groupements SH présents dans un électrolyte spécifique (Olafson et Sim, 1979). La voltampérométrie est basée sur la détection d'une variation d'intensité du courant électrique qui survient dans un électrolyte quand un composé est réduit ou oxydé. Lors du dosage des MTs par voltampérométrie, c'est le signal correspondant à la réduction des groupements SH qui sera mesurée.

- La colorimétrie

Les métallothionéines sont des protéines exceptionnellement riches en cystéines et par conséquent en groupements thiol (SH). En présence du DTNB {5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acide)}, l'apparition de la coloration jaune est proportionnelle à la teneur en groupements SH contenu dans les MTs (Viarengo et al. 1997).

- Essais immunologiques (ELISA , RIA)

ELISA : enzyme linked immunoassays

RIA: radio immunoassays.

L'utilisation des anticorps est la méthode la plus sensible pour la quantification des MTs.

L'avantage de ces méthodes est de pouvoir travailler avec un grand nombre d'échantillons durant un temps relativement court.

Les inconvénients sont :

☞ L'accès à de bonnes qualités d'anticorps est limité.

☞ La spécificité des anticorps (spécificité liée à l'espèce) (Cosson et Amiard, 1998).

- La détermination des ARNm codant pour la MT :

Il s'agit d'une méthode de dosage indirecte qui consiste à mettre en évidence l'induction du gène MT. La détermination de la teneur en ARNm reflète directement la teneur en MT qui est le produit de la traduction de ces ARNm. Pour cela, il faut disposer d'une sonde nucléique (simple brin marqué) qui puisse se lier (hybridation par complémentarité) avec les ARNm et former un brin double. Cette technique, nettement plus sensible que les précédentes, permet de détecter des réponses au niveau cellulaire (Cosson et Amiard, 1998)

2. L'acétylcholinestérase

Les acétylcholinestérases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique (Matozzo et al. 2005).

Dans les jonctions neuromusculaires et interneurales, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui va permettre la transmission de l'influx nerveux (Fig.10). Lors d'une stimulation nerveuse, l'acétylcholine libérée des terminaisons nerveuses dans l'espace synaptique, active les récepteurs cholinergiques postsynatiques. L'interaction de l'acétylcholine avec le récepteur provoque une dépolarisation de la membrane post-synaptique, générant ainsi un potentiel d'action qui assure la transmission du signal nerveux. L'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase, permet au système de revenir à son état de repos (Bocquené et al. 1997). L'inhibition de l'AChE par de nombreux neurotoxiques tels que les métaux lourds provoque une transmission permanente de l'influx nerveux causant de nombreuses anomalies telles que la paralysie et même la mort (Matozzo et al. 2005). L'AChE peut être donc considérée l'un des

biomarqueurs de non-compensation qui représentent des marques plus ou moins indélébiles du passage des polluants dont peuvent résulter des conséquences fâcheuses pour le maintien des individus (Lagadic et al. 1997).

L'inhibition de l'activité de l'AChE par différents types de polluants chez les bivalves a été l'objet de plusieurs études. Cette inhibition a été observée chez *C. glaucum* exposée à la pollution métallique (surtout Cd) (Machreki-Ajmi et al. 2008), *R. decussatus* exposée au Cu (Hamza-Chaffai et al. 1998), *R. philippinarum* et *Crassostrea gigas* exposées aux composés organochlorés (Bris et al. 1995), *M. galloprovincialis* exposée aux pesticides (Mora et al. 1999), *M. trossulus* exposée à différents métaux (Cu, Pb, Ni, Zn, Hg) (Kopecka et al. 2004)

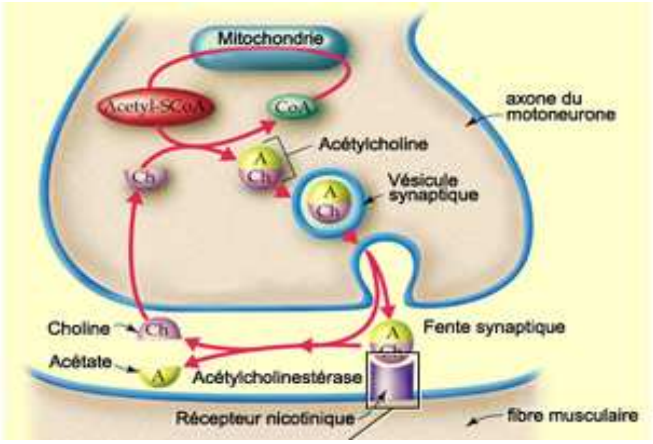


Figure 10. A la jonction neuromusculaire, l'acétylcholine est synthétisée dans le cytoplasme de la terminaison nerveuse à partir de l'acétylCoA et de la choline. Plusieurs milliers de molécules d'acétylcholine (ACh) sont ainsi stockée par vésicule synaptique. Dès leur libération, environ la moitié des molécules d'acétylcholine sont hydrolysées par l'enzyme acétylcholinestérase. Mais l'enzyme ne peut tout dégrader et l'autre moitié atteint les récepteurs nicotiniques (http://lecerveau.mcgill.ca/).



Figure 11. Structure de l'acétylcholinéstérase (http://commons.wikimedia.org/wiki/Acetylcholinesterase)

3. Malonedialdéhyde

Le malonedialdéhyde (MDA), produit terminal de la dégradation des lipides et dont la teneur est en relation étroite avec les dégradations de la membrane céllulaire, permet de montrer l'effet d'une pénétration d'un xénobiotique dans l'organisme. Ce paramètre constitue un indicateur précoce d'une agression toxique et par conséquent il peut être utilisé comme biomarqueur du stress oxydatif (Ladhar-Chaabouni et al. 2007 ; Funes et al. 2005 ; Giguère et al. 2003).

a. Le stress oxydatif

Sous ses formes hyperactives appelées « radicaux libres », l'oxygène peut devenir un redoutable toxique. Il serait même l'une des causes majeures du vieillissement cellulaire favorisé par un déséquilibre entre la production des radicaux libres de l'oxygène et la capacité de défense antioxydante de l'organisme. On parle alors de stress oxydatif ou encore de stress oxydant (Sies, 1991).

Un radical libre est une substance chimique qui possède un électron non apparié, ce qui lui confère une grande instabilité et une forte réactivité. Les radicaux libres les plus courants sont le radical superoxyde ($O_2^{-}°$), le radical hydroxyle (OH°) et le monoxyde d'azote (NO°). La production des radicaux libres de l'oxygène est physiologique et nécessaire à de nombreux métabolismes. Seul leur excès devient néfaste d'autant que s'y ajoutent les radicaux libres d'origine exogène liés à l'environnement (rayonnement UV, ozone…) (Cossu et al. 1997). Les radicaux libres en particulier les radicaux hydroxyle, sont susceptibles d'interagir au niveau des doubles liaisons C=C avec les chaînes d'acides gras polyinsaturés qui constituent le double feuillet phospholipidique des membranes (Bonnefont-Rousselot, 1994). Ils entraînent alors la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Gutteridge et Halliwell, 1990) provoquant une désorganisation membranaire (perturbation des propriétés physicochimiques des membranes, des communications intercellulaires et du fonctionnement des enzymes membranaires) pouvant aboutir à la lyse cellulaire. Les hydroperoxydes lipidiques formés sont dégradés principalement en malonedialdéhyde (MDA) (Chaudhary et al. 1996) et 4-hydroxynonénal (4-HNE) (Chen et Chung, 1996) (Fig. 13). qui réagissent de manière covalente avec les protéines et les inactivent.

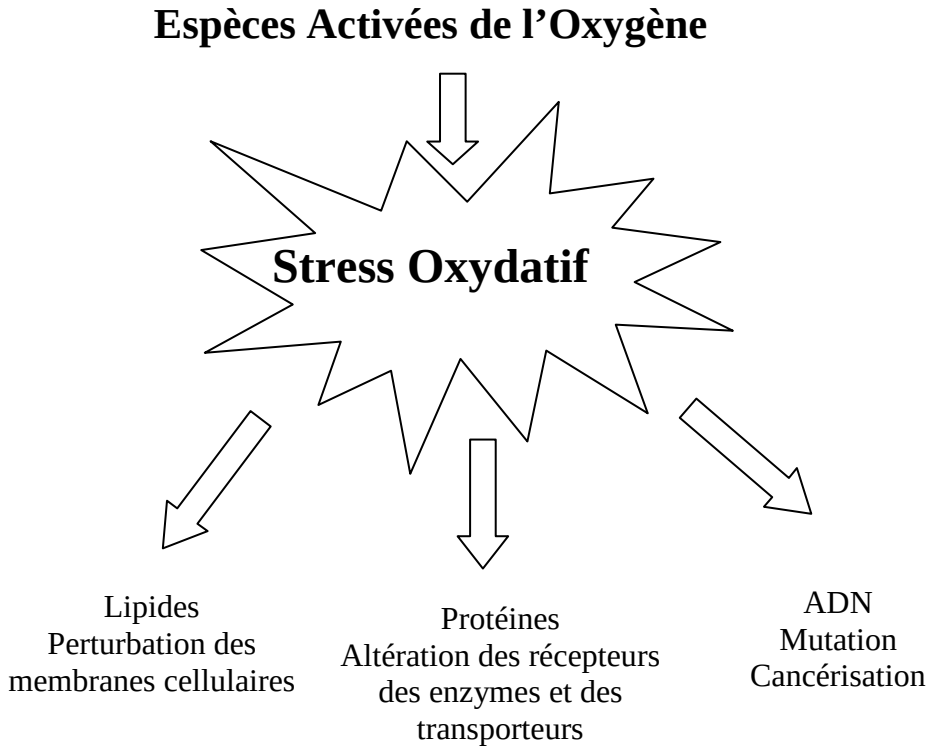


Figure 12. Mécanismes des lésions biochimiques induites par le stress oxydant (Sergent et al. 2000)

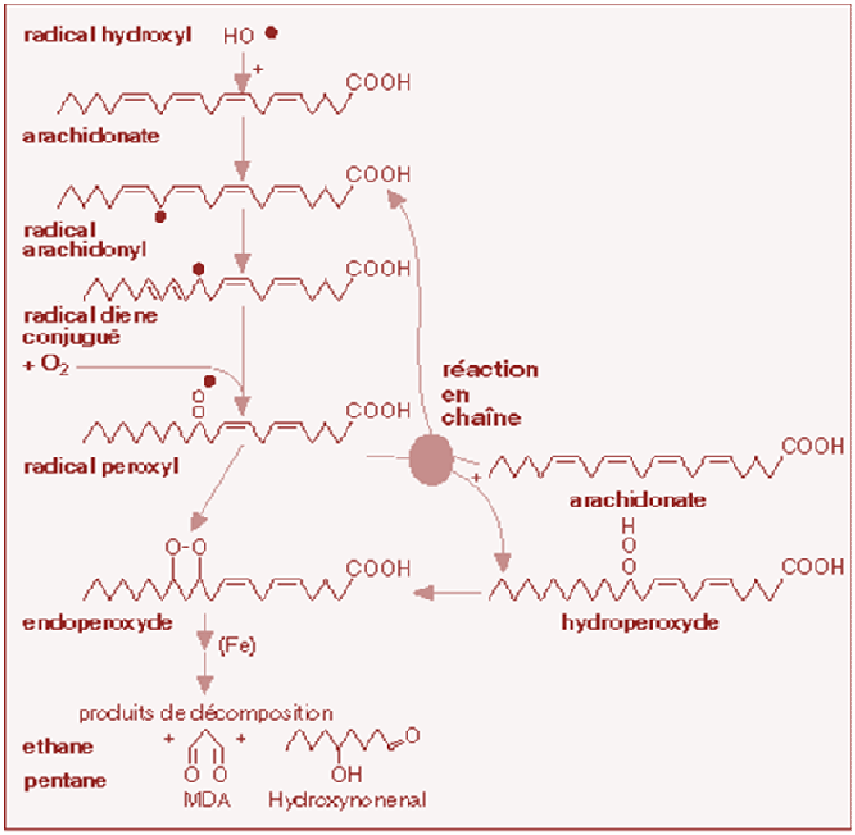


Figure 13. Mécanisme en chaine de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

Les études *in vivo* consistent en général à évaluer les effets cellulaires et subcellulaires qui témoignent indirectement de l'implication d'un stress oxydant postulé à partir de mécanismes élucidés *in vitro*. Les principales études réalisées sur les mollusques bivalves soumis expérimentalement et *in situ* à des conditions de stress oxydant, se sont intéressées à la peroxydation lipidique (Ladhar-Chaabouni et al. 2007 ; Bebianno et al. 2005 ; Giguère et al. 2003) et l'activité des systèmes antioxydants (Bebianno et al. 2005 ; Funes et al. 2005).

b. Systèmes de défense contre le stress oxydatif

Les systèmes de défense contre le stress oxydatif ont pour rôle d'inhiber l'oxydation d'un substrat. Les antioxydants primaires, qui sont pour la plupart des enzymes, vont limiter la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les antioxydants secondaires, qui peuvent être des substances lipo- ou hydrosolubles, vont piéger les ROS sous une forme peu réactive (Zielinski et Portner, 2000). Parmi les enzymes antioxydantes on peut citer les superoxydes dismutases (SOD) dont le rôle est de catalyser la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Fig. 14). Bien que ces enzymes soient très efficaces dans l'elimination du radical superoxyde, ils conduisent à la production de peroxyde d'hydrogène, un composé lui aussi toxique pour les cellules. Les activités des SOD doivent donc être associées à des activités catalase et peroxydase pour permettre une détoxication complète. Les catalases ont pour rôle de catalyser la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène (O_2) et eau (H_2O) (Fig. 15) (Di Giulio et al. 1995 ; Halliwell et Gutteridge, 1999).

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} O_2 + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} O_2 + 2H_2O$$

Figure 14. Réactions catalysées par les SOD et les catalases

Les peroxydases protègent contre le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en catalysant la réaction suivante où SH_2 est le substrat qui va subir l'oxydation :

$$SH_2 + H_20_2 \rightarrow S + 2H_2O$$

Les peroxydases les plus étudiées sont les glutathion peroxydases qui se divisent en deux groupes : les glutathion peroxydases sélénium-dépendantes (Se-GSH- Px) et les phospholipide-hydroperoxyde-glutathion peroxydases (PLOOH-GSH-Px). En présence de phospholipase, la glutathion peroxydase sélénium-dépendante agit comme réductrice des hydroperoxydes d'acides gras de la membrane cellulaire suivant les réactions suivantes :

$$PLOOH \xrightarrow{\text{Phsopholipase}} \text{Lysophospholipides} + LOOH$$

$$LOOH + 2\,GSH \xrightarrow{\text{Se-GSH- Px}} LOH + GSSG + H2O$$

PLOOH : hydroperoxyde de phospholipides

LOOH : hydroperoxyde d'acides gras

LOH : alcool d'acides gras

GSSG : glutathion oxydé

La glutathion réductase (GSH réductase) permet de coupler la détoxification des peroxydes au métabolisme rédox intermédiaire utilisant NADPH/ H^+.

$$GSSG + NADPH/H^+ \xrightarrow{\text{GSH réductase}} 2\,GSH + NADP^+$$

En ce qui concerne les PLOOH-GSH-Px, elles agissent directement sur les hydroxyperoxydes de phospholipides sans hydrolyser les hydroxyperoxydes d'acides gras et leur libération (Krinsky, 1992).

$$PLOOH + 2\,GSH \xrightarrow{\text{PLOOH-GSH-Px}} PL\text{-}LOH + GSSG + H_2O$$

Parmi les antioxydants secondaires on peut citer la vitamine E, vitamine C, caroténoïdes, etc qui sont généralement d'origine alimentaire (Krinsky, 1992).

D. Les marqueurs génétiques

Des outils moléculaires ont été utilisés pour l'identification et la différenciation des espèces. Ces outils sont représentés par les macromolécules biologiques telles que l'ADN, l'ARN où les protéines (Fig. 15). Ces molécules sont des polymères constitués de l'enchaînement de briques moléculaires de base dont la succession constitue la séquence primaire. Ainsi, l'ADN peut être considéré comme un texte écrit dans un alphabet à 4 lettres : Adénine (A), Thymine (T), Guanine (G) et Cytosine (C) et les protéines comme un texte écrit dans un alphabet à 20 lettres, les 20 acides aminés. La parenté des êtres vivants considérés est reflétée par la similarité de ces séquences primaires.

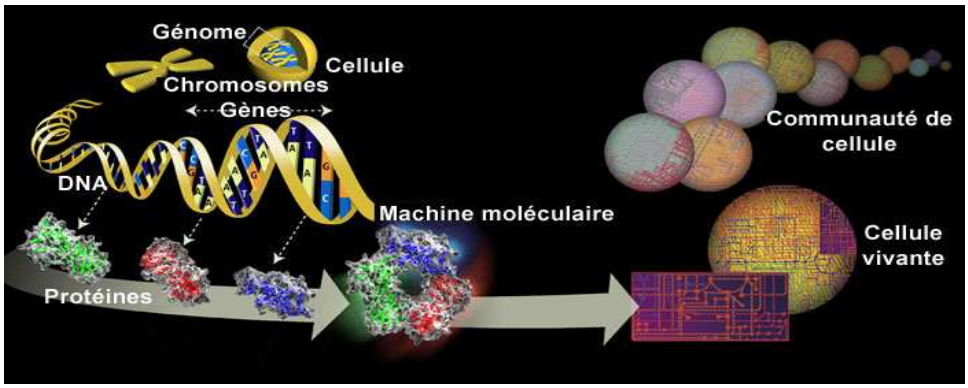


Figure 15. Formation des cellules vivantes
(http://www.courscapitole.com/doku.php/niveau:lycee/svt)

Parmi les outils moléculaires on peut citer les ADN des gènes et des régions intercalaires ribosomales et les ADN mitochondriaux.

Les gènes d'ARN ribosomal 28S ont été utilisés comme marqueurs de l'évolution parce qu'ils sont ubiquistes et homogènes dans tous les types de cellules ainsi qu'en raison de la constance de leur structure (Woese, 1987). Ces séquences sont efficaces pour établir des relations phylogénétiques parmi les taxons éloignés jusqu'au niveau d'ordres et/ou de classes (Beati et al. 2004 ; Passamaneck et al. 2004 ; Cadoret et al. 1999)

Les cassettes ribosomales (Fig. 16) sont présentes en plusieurs centaines de copies par génome eucaryote. Une cassette ribosomale comprend les gènes 18S, 5,8S et 28S qui sont séparés par les régions intercalaires (Internal Transcribed Spacer: ITS-1 et ITS-2). Les régions bordant les cassettes correspondent aux zones transcrites externes (External Transcribed Spacer : ETS) (Harris et Crandall. 2000). Les régions ITS-1 et ITS-2 sont beaucoup moins conservées car la pression sélective qui s'exerce sur ces parties non codantes est moindre. Pour ces raisons, la séquence des ITS est employée plus précisément pour discriminer les espèces et rarement pour établir les liens de parenté qui existent au-delà du statut des espèces (Imai et al. 2004 ; Zhang et Simmons, 2006).

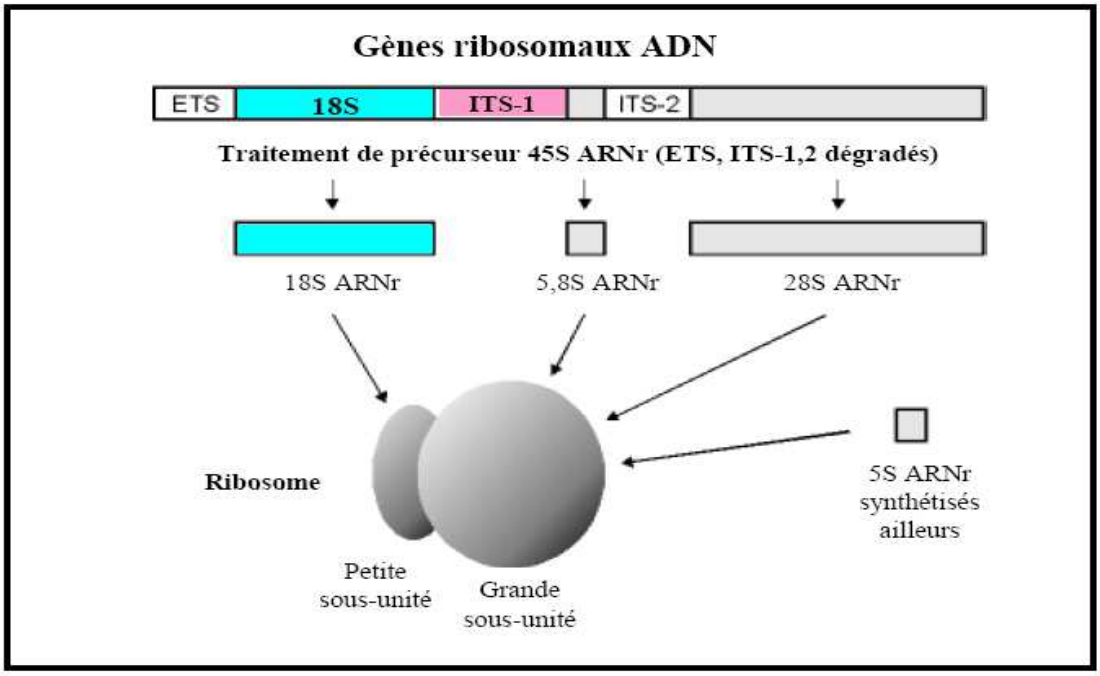


Figure 16. L'ADN codant les ARNr (ARN ribosomiques) est transcrit en un preARNr (précurseur 45S) dans le nucléole. Le preARNr est ensuite découpé en trois ARNr (18S, 5,8S et 28S). Simultanément dans le nucléoplasme de l'ADN codant les protéines constitutives des ribosomes est transcrit en ARN messager. L'ARN messager est traduit en protéines dans le cytoplasme. Les protéines traduites rentrent dans le noyau et dans le nucléole, elles s'associent avec les ARN ribosomiques pour former des ribosomes. Les ribosomes néoformés sortent du noyau et migrent dans le cytoplasme jouer leur rôle. Les séquences qui portent les gènes responsables de la synthèse d'ARNr sont présentes sur l'ADN dans le nucléole ; à l'exception de l'ADNr 5S qui est nucléoplasmique (Trang, 2006).

L'ADN mitochondrial est une molécule d'ADN circulaire contenue dans les mitochondries des cellules eucaryotes. Certaines caractéristiques de l'ADN mitochondrial en font un matériel de choix pour la phylogénie. Il s'agit d'un ADN abondant dans les cellules, puisque il se retrouve à des milliers d'exemplaires par cellule. Il présente une vitesse de mutation plus importante que dans le génome nucléaire. Le gène codant la première sous-unité de la Cytochrome Oxydase (COI), est soumis autant qu'un gène codant à une pression sélective importante et présente un grand niveau de variabilité. Cette variabilité est en soi une information intéressante pour la discrimination, comme dans le cas des ITS, des espèces, des populations voir même les individus de la même population (Chu et al. 1999 ; Harrison et Crespi, 1999 ; Tang et al. 2003). Chez les bivalves la différenciation des espèces sur des bases morpholgiques est désormais insuffisante. Les séquences d'ITS et de COI ont permis une meilleure segrégation entre les espèces comme le cas pour *C. glaucum* et *C. edule* (Nikula et Vainola, 2003 ; Freire et al. 2005 ; présent travail), *M. edulis* et *M. galloprovincialis* (Kijewski et al. 2009) et *C. gigas* et *C. angulata* (Arnaud et George, 2000). Des différences inter et intra-populationnelles ont été également

mises en évidence cherz certaines espèces de bivalves tels que *Perna viridis* (Wood et al. 2007), *M. edulis* (Gérard et al. 2008), *M. galloprovincialis* (Gérard et al. 2008), *C. glaucum* (Freire et al. 2005 ; présent travail) *et C. edule* (Freire et al. 2005 ; présent travail).



Chapitre I

Répartition spatiale de cadmium et de quelques biomarqueurs déterminés chez Cerastoderma glaucum collectées dans une zone polluée

Article: LADHAR-CHAABOUNI R, *MACHREKI-AJMI M et HAMZA-CHAFFAI A (2009)*
Spatial distribution of cadmium and some biomarkers in Cerastoderma glaucum living in a polluted area. Marine biology research, in press.

A. Introduction

La région du golfe de Gabès a connu depuis un certain temps des activités industrielles et urbaines sans cesse croissantes liées à une importante activité socio-économique (urbanisme, agriculture, pêche, industrie, tourisme). Ces activités ont engendré une multitude de substances synthétiques et étrangères aux mécanismes biologiques susceptibles de porter préjudice à l'écosystème marin et au cadre de vie des habitants de la région. C'est ainsi que plusieurs travaux ont montré la richesse des rejets en certains métaux traces toxiques, surtout ceux découlant des unités spécialisées dans la transformation du phosphate brut (SIAPE). Les résidus de la production des engrais phosphatés sont déchargés dans deux énormes dépôts de phosphogypse (Fig. I. 1 ; I. 2), dont le premier est haut de 12 m et couvre une superficie de 40 ha, et l'autre, d'une hauteur de 30 m s'étend sur une superficie de 60 ha. Les deux dépôts sont situés sur la frange littorale de la zone urbaine et déchargent dans la mer les particules solides transportées par le vent, ainsi que les acides et les particules lessivées. Cette pollution est à l'origine de la disparition de plusieurs espèces d'animaux (Hamza-Chaffai et al. 1996; Zairi et Rouis 1999; Ketata et al. 2007). En effet, à côté de ces dépôts l'écosystème était complètement détruit, ce qui nous a amené à aller 8,5 Km vers le sud pour collecter nos échantillons. Pour déterminer l'état de contamination du site de prélèvement (Zarb El Ain), une étude *in situ* a été réalisée. Cette étude présente l'avantage de donner une vision réelle et globale de l'état de santé du site étudié ainsi que la possibilité d'établir des relations de cause à effet entre la présence des contaminants et les réponses biologiques.

Dans ce travail, le cadmium a été déterminé dans les tissus mous (*in toto*) de *C. glaucum*. Ce métal a été particulièrement choisi d'une part à cause de sa toxicité pour la plupart des organismes marins et sa susceptibilité d'être bioaccumulé, d'autre part en raison de l'abondance de ce métal toxique dans les rejets industriels. L'effet d'accumulation de cadmium au niveau des tissus de *C. glaucum* a été déterminé par l'étude de différents biomarqueurs tels que les métallothionéines, le malonedialdéhyde et l'acétylcholinéstérase. Cette relation de cause à effet a été déterminée antérieurement chez la coque collectée sur d'autres sites de prélèvement. En revanche aucune étude n'a montré la répartition spatiale de cadmium et ses effets au niveau d'un site de prélèvement à travers l'utilisation d'un organisme bioindicateur. Nous nous proposons ainsi d'établir une grille de prélèvement afin de pouvoir visualiser la répartition spatiale du Cd et de determiner l'effet de cette contamination au niveau de chaque point de prélèvement.



Figure I.1 Photographie de la SIAPE



Figure I.2 Photographie du terril de phosphogypse

B. Matériels et méthodes

1. Site de prélèvement : Zarb el Ain (ZA)

Zarb el Ain est situé le long du littoral sud de la ville de Sfax, à 15 km du centre ville (34°38'125''N, 10°39'25"E). Il est localisé à 8,5 km au sud de l'effluent provenant de la station d'épuration de Sfax (SES) et de la SIAPE. (ZA) est caractérisé par un fond sablo-vaseux (Fig. I. 4). Les deux espèces de bivalve les plus abondantes dans cette zone sont les palourdes et les coques. Contrairement à la palourde la coque n'a aucune valeur commerciale et elle n'est pas comestible.

La direction Nord-sud des courants (Fig. I. 3) favorise le déplacement des polluants vers le sud. De ce fait, (ZA) reçoit les effluents urbains et industriels provenant du Nord, principalement ceux de la station d'épuration de Sfax et de la SIAPE. Ce site est également influencé par les rejets d'une décharge municipale et d'une fonderie de plomb, installées à proximité de l'usine de traitement des phosphates (SIAPE). Cette fonderie transforme la matière première composée d'armature de vieilles batteries, de coke et de bicarbonate de sodium. Le plomb est récupéré sous sa forme métallique (Azri et al. 1999). Les polluants émanant de ces différentes sources contribuent d'une manière très significative à l'enrichissement des aérosols, de l'eau de mer et du sédiment en métaux traces tels que Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg, Mo (Azri et al. 1999, 2000 ; Illou, 1999 ; Serbaji, 1991, 2000 ; Zairi et Rouis, 1999). Les effets de ces rejets commencent à devenir perceptibles par les perturbations observées au niveau des paramètres physico-chimiques du milieu récepteur ainsi que l'appauvrissement de la faune et de la flore (Serbaji, 2000).

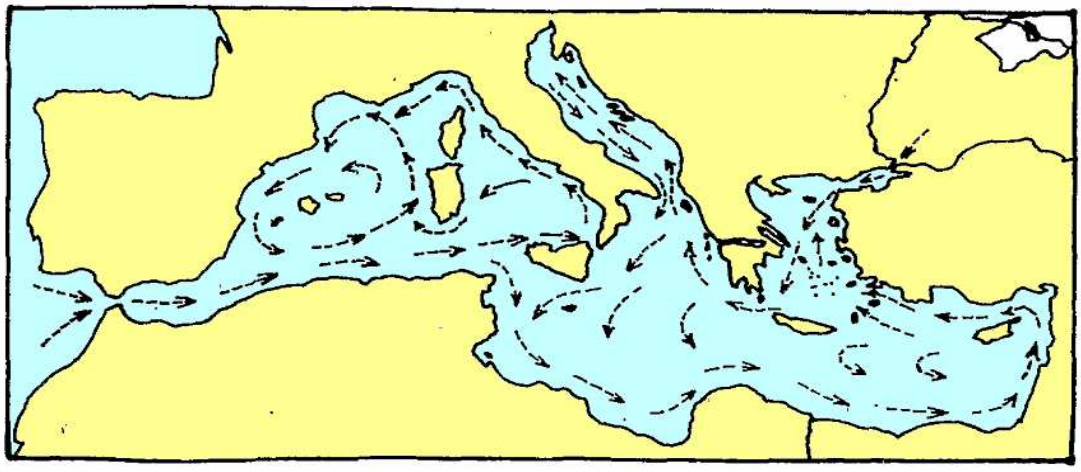


Figure I.3. Les courants superficiels en Méditerranée (Serbeji, 2000)



Figure I.4. Photographie du site de prélèvement Zarb El Ain

2. Echantillons

a. Choix

Dans cette partie, nous avons choisi de travailler sur la coque *C. glaucum* pour plusieurs raisons :

- Il s'agit d'une espèce très abondante sur les côtes méditerranéennes en particulier le golfe de Gabès.
- Elle constitue un excellent indicateur de contamination en raison de sa forte capacité à bioconcentrer les xénobiotiques
- Très peu d'études sur la réponse de *C. glaucum* à une contamination métallique sont disponibles.

b. Collection

C. glaucum a été collectée suivant une grille de prélèvement mais avant la détermination des nœuds de cette grille, une étude préliminaire a été réalisée. Ainsi 17 points de prélèvement ont été choisis : vers le large nous avons fait des prélèvements chaque 20 m puis chaque 40 m, vers le sud nous avons fait des prélèvements chaque 40 m puis chaque 200 m (Fig I. 6). Sur les échantillons collectés, un dosage du cadmium *in toto* a été réalisé (15 échantillons/point de prélèvement). D'après les résultats de la régression multiple, les points ne montrant aucune variation significative des concentrations en cadmium, avec ceux qui les précèdent, ont été éliminés. A la lumière des résultats obtenus par cette étude préliminaire, une grille de prélèvement a été établie. Au niveau de chaque

nœud, 35 échantillons ont été prélevés avec 15 échantillons pour le dosage du cadmium et le reste pour le dosage des MTs, MDA et AChE.

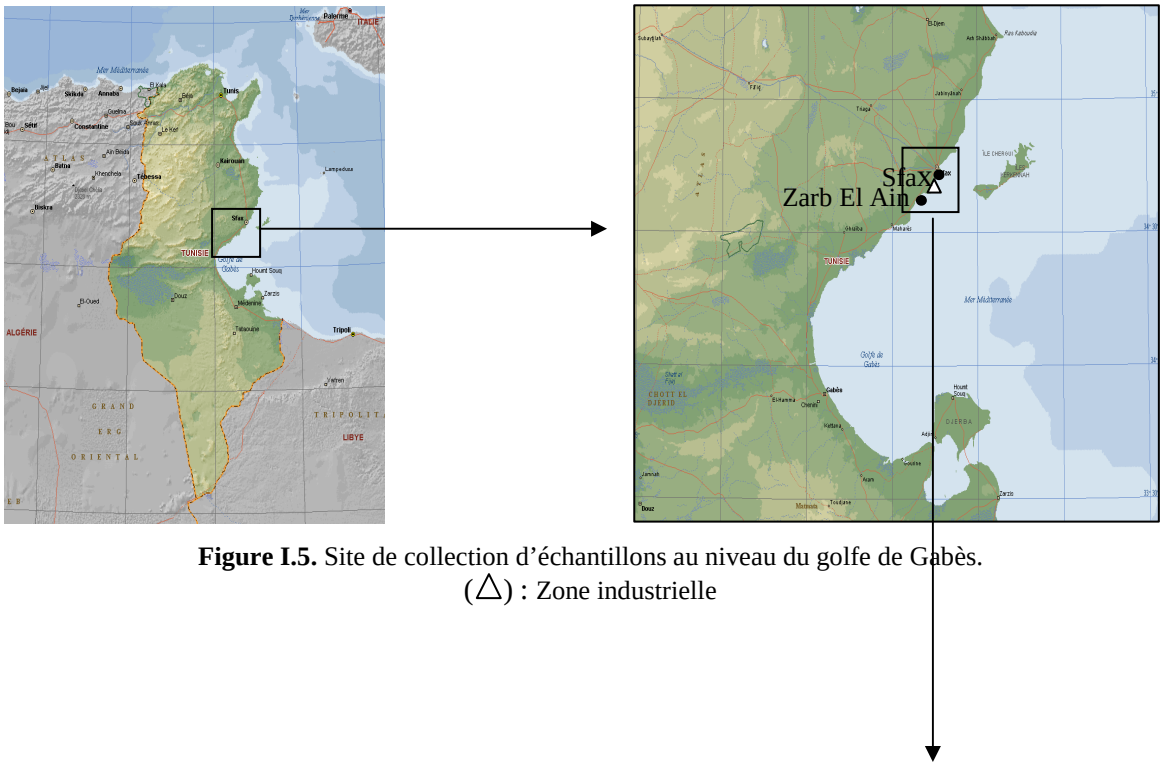


Figure I.5. Site de collection d'échantillons au niveau du golfe de Gabès.
(△) : Zone industrielle

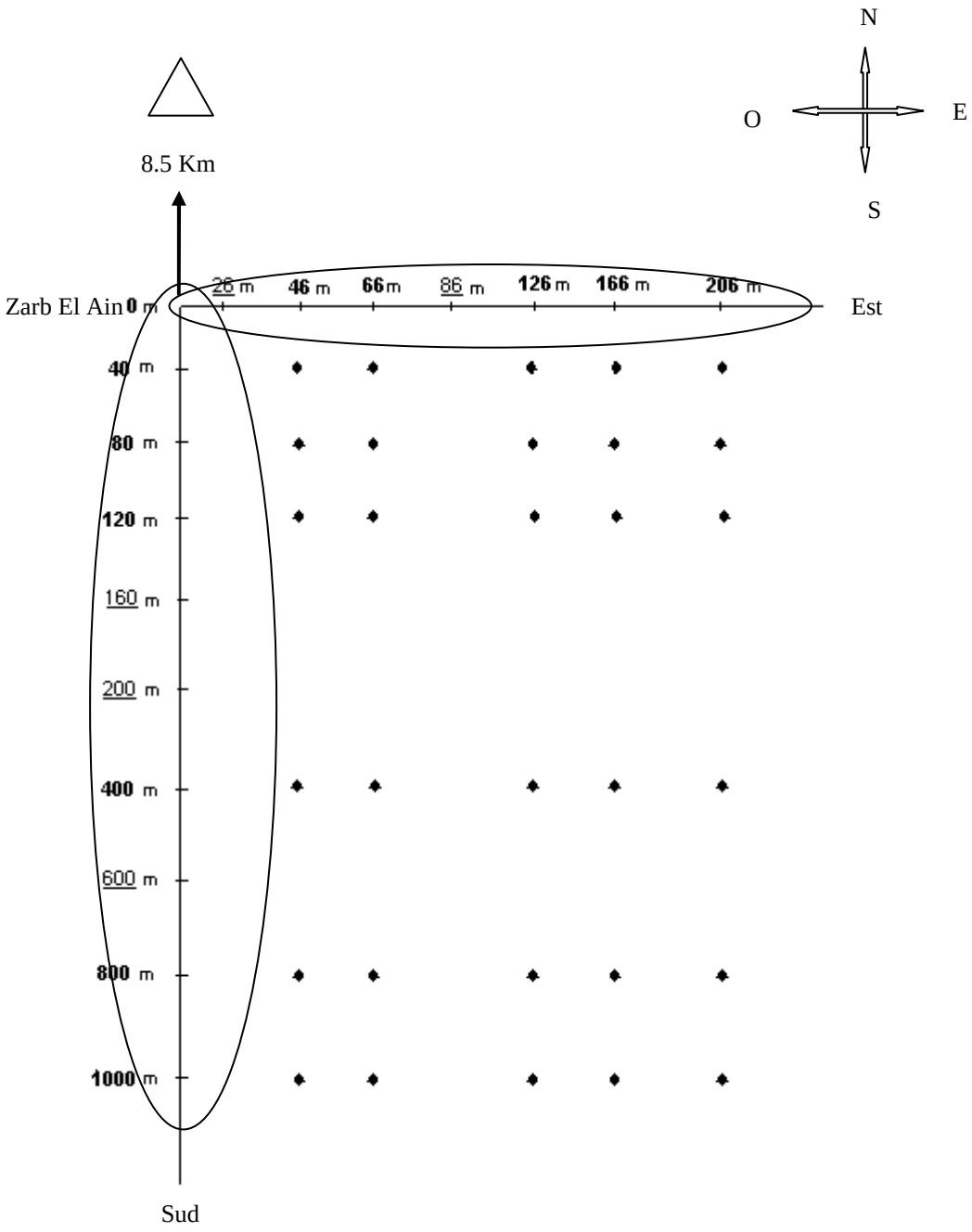


Figure I.6. Grille préliminaire et grille finale de prélèvement : les 17 points de la grille préliminaire sont encerclés, les points éliminés sont soulignés. Les points en gras représentent les nœuds de la grille finale

3. Préparation des échantillons

a. Prétraitement

La taille des coques a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse. La taille de chaque individu est comprise entre 29 et 32 mm. Les coques ont été pesées afin de déterminer le poids total (avec la coquille).

b. Dissection

Avant d'entamer la dissection nous avons pris toutes les précautions afin d'éviter les risques de contamination. Il faut donc avoir une verrerie lavée avec de l'acide nitrique dilué à 10% et rincée 3 fois avec de l'eau bidistillée, et un milieu de travail propre.

Pour déterminer la quantité métallique dans l'ensemble des tissus mous, ces derniers sont mis dans des tubes en verre propres, séchés à 100°C puis minéralisés. Par contre, pour déterminer les concentrations en biomarqueurs, des dissections ont été réalisées (Figure I.7) et les organes ont été stockés séparément à -20°C.

Lors de la dissection, nous avons enlevé le liquide palléal. Nous avons également rincé l'ensemble du tissu dans l'eau bidistillée pour éliminer les particules de sédiments susceptibles de fausser les résultats.

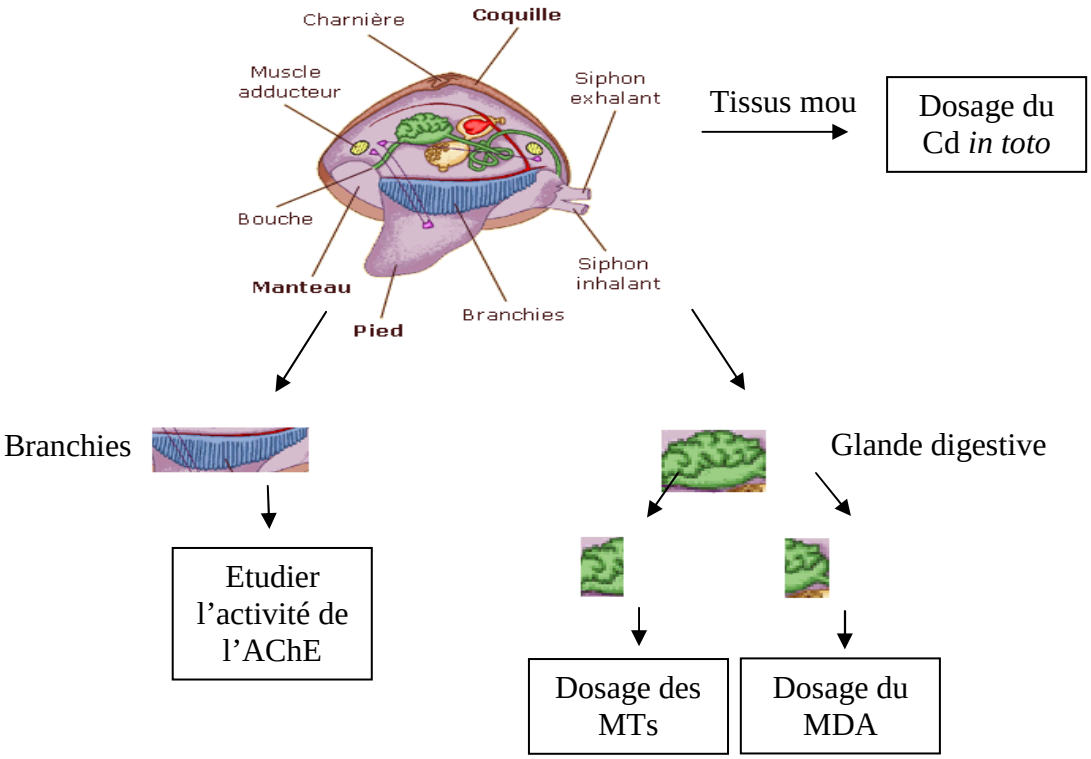


Figure I.7. Schéma montrant les différents compartiments utilisés pour les différents dosages réalisés.

4. Broyage

Les échantillons, destinés aux dosages des MTs (moitié des glandes digestives), ont été homogénéisés dans le tampon Tris 50 mM à pH 8,6 à raison de 4 ml de Tris par gramme de tissus frais et en présence de ß-mercaptoethanol (4 mM), afin d'éviter les risques d'oxydation des MTs et leur destruction par les protéases.

Pour le dosage du MDA l'homogénéisation de la deuxième moitié des glandes digestives a été réalisée dans du KCl (150 mM).

5. Minéralisation

La minéralisation consiste en une destruction complète de la matière organique sous l'effet combiné de la température et de l'acide nitrique concentré.

Aux tissus préalablement séchés, nous avons ajouté 2 ml d'acide nitrique concentré (65%). L'ensemble est mis à 65°C durant 2h, 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.

6. Dosage du cadmium par spectrophotométrie d'absorption atomique

a. Principe

L'échantillon sous forme liquide est porté dans une flamme à une haute température, de sorte qu'il se forme une vapeur atomique qui sera irradiée avec une lampe spectrale émettant des raies de transition des atomes recherchés. En raison de la quantification des états énergétiques, seuls les atomes concernés absorbent la radiation excitatrice.

L'absorption lumineuse que l'on mesure est liée à la concentration des atomes étudiés par la loi de Beer Lambert.

$\text{Log } (I_0 / I) = K.L.C$

I_0 : Intensité de la radiation incidente.

I : Intensité de la radiation après absorption.

L : Longueur du chemin optique.

C : Concentration de l'élément à doser dans la solution.

K : constante

b. Appareillage

Le spectrophotomètre utilisé est un Hitachi Z 6100. Il est constitué des éléments suivants :

- Une source d'émission primaire, à base de la pompe à cathode creuse spécifique au métal à doser.
- Un dispositif d'atomisation à flamme.
- Un ensemble optique.
- Un dispositif de réaction photoélectrique qui mesure le flux absorbé.

Ce spectrophotomètre à effet Zeeman élimine les bruits de fond dus aux interactions entre l'élément à doser et la matrice.



Figure I.8. Spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme

c. Condition opératoire

Les paramètres opératoires du spectrophotomètre d'absorption atomique Hitachi Z6100 à effet Zeeman ont été fixés dans le tableau suivant :

Paramètres opératoires				
Métaux	Longueur d'onde λ (nm)	Fente (nm)	Flamme	Intensité de la lampe (mA)
Cadmium	228,8	1,3	Air-C2H2	7,5

Tableau I.1. Conditions opératoires fixées pour le Cd analysés en spectrophotométrie d'absorption atomique (mode flamme).

d. Etalonnage

Une gamme d'étalonnage a été réalisée à partir des solutions mères de concentrations connues (annexe I). La courbe d'étalonnage est représentée par la fonction DO= f (C) (DO : densité optique, C : concentration de l'élément à doser). La courbe d'étalonnage est linéaire dans une certaine gamme de concentration puis apparait un palier de saturation. Les valeurs de densité optique obtenues sont retenues uniquement dans le cas où elles appartiennent à la zone linéaire sinon la solution doit être diluée.

e. Précision des analyses

En absorption atomique, la précision des analyses est fonction de certains critères tels que :

- la sensibilité qui est exprimée par le rapport entre le % d'absorption et la variation de la concentration, conventionnellement, la concentration de l'élément chimique à doser correspondant à 1% d'absorption.
- La limite de détection (LD) qui est définie comme la concentration exprimée en µg/kg donnant, dans le cas pratique, un rapport signal/bruit de fond égal à 2 (Tableau I.2).

	Cd
LD (µg/kg)	0,004

Tableau I.2. Limite de détection du métal analysé

La qualité des dosages effectués est vérifiée en réalisant tout d'abord des « blancs » (ne contenant que le produit chimique HNO_3) traités en même temps et de la même manière que les autres échantillons. Le laboratoire où nous avons réalisé nos analyses participe à des exercices d'intercalibration internationaux (NILU HTU/O- 7729) par l'analyse des teneurs métalliques (Cd) dans des échantillons de bivalve standard (moules). Les résultats sont représentés dans le tableau I.3.

Tissus de moules SRM-2976			
Métaux	Nos valeurs	valeurs certifiées	Recouvrement (%)
Cd	0,75 (0,12)	0,82 (0,16)	91,14

Tableau I.3. Résultats de contrôles de qualité interne (SRM-2976). Les concentrations moyennes sont présentées en mg/kg de poids sec. Les écarts types de nos valeurs et des valeurs certifiées (National Institute of Standard and Technology) sont présentés entre parenthèses.

7. Dosage des métallothionéines par la méthode colorimétrique

a. Principe de la méthode

La fixation des molécules de DTNB {5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acide)} aux groupements thiol (SH) a comme conséquence l'apparition d'une coloration jaune dont l'intensité est proportionnelle à la teneur en groupements SH contenus dans les MTs.

La méthode utilisée consiste à évaluer le nombre de groupements SH en utilisant comme référence le réactif GSH (Viarengo et al. 1997).

Les concentrations en MTs dans les divers échantillons (n=20), exprimées en µg/g de poids frais de l'organe, sont déterminées en utilisant l'équation suivante :

$$C_{(MTs)} = \frac{GSH\ (\mu g) \times 8600}{307.3 \times 21 \times pf}$$

$C_{(MTs)}$: concentration en MTs

8600 : masse molaire de MTs

307.3 : masse molaire de GSH

pf : poids frais de l'organe (g)

21 : nombre de groupements SH par molécule de MTs

b. Dosage des MTs

Après l'homogénéisation de la moitié des glandes digestives (n=20/ point de prélèvement) dans le tampon Tris-HCl (annexe V), le broyat obtenu a subi une première centrifugation (25000 g durant 1 heure à 4°C). Le surnageant obtenu est dénaturé à la chaleur (80°C) puis centrifugé à 20000 g durant 30 min à 4°C. C'est à partir du surnageant obtenu que le dosage des MTs a été réalisé en présence du DTNB, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

L'absorbtion des échantillons est lue à 412 nm et les teneurs en MTs sont quantifiées en utilisant le GSH comme standard (annexe II).

8. Dosage du malonedialdéhyde (MDA) au niveau de la glande digestive

a. Principe

Le MDA est dosé par la méthode colorimétrique en présence de l'acide thiobarbiturique. La réaction au TBA (acide thiobarbiturique) est une méthode très sensible qui permet de détecter de faibles quantités de peroxydes lipidiques et plus particulièrement le MDA libre. La détection du MDA présent dans les échantillons biologiques se base sur la réaction au cours de laquelle, 2 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.

b. Extraction du MDA

L'homogénéisation des moitiés des glandes digestives (n=20/ point de prélèvement) a été réalisée 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 immédiatement congelés à –20° C afin d'éviter la dégradation du MDA.

Le MDA étant un composé instable, la gamme d'étalonnage a été établie à partir d'une solution mère de TEP (1,1,3,3- tétraéthoxypropane) (annexe III).

9. Dosage de l'acétylcholinestérase

- **Préparation des échantillons**

Les branchies sont homogénéisés à l'aide d'un broyeur dans un tampon phosphate (K_2HPO_4/KH_2PO_4, 0.1M, pH 7,4) suivant un rapport poids/volume de 1/3. Les homogénats sont ensuite centrifugés à 9000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant sera utilisé pour le dosage de l'AChE et des protéines.

- **Quantification de l'activité cholinestérase**

La méthode utilisée est dérivée de celle d'Ellman (Ellman et al. 1961), adaptée au lecteur en microplaque par Bocquené et Galgani (1998). Ainsi l'acétylcholinestérase contenue dans la fraction des 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-Bis-nitrobenzoate) en donnant du TNB produit de couleur jaune qui absorbe à 412 nm et dont la concentration est proportionnelle à la quantité d'enzymes présente dans le milieu. La réaction peut se schématiser ainsi :

$$ASCh + H_2O \xrightarrow{AChE} Sch + \text{acide acétique}$$

$$Sch + DTNB \longrightarrow Tch\text{-}TNB + TNB$$

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

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

DO/mn : variation de densité optique par minute

V : volume de l'échantillon en ml

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

Vcyt : volume de cytosol

ϵ : coefficient d'extinction molaire de l'acétylcholinestérase égale à 13.6 m mol/ mn

10.Analyse statistique

Pour déterminer la répartition spatiale de Cd et des biomarqueurs utilisés (MT, MDA, AChE), une interpolation a été établie par le logiciel MINITAB 15. Cette interpolation est basée sut la méthode polynomiale d'Akima. Cette dernière est une méthode d'interpolation cubique basée sur la triangulation de Delaunay. Il s'agit de construire à partir de surfaces élémentaires interconnectées, une surface globale passant par tous les points de référence (Akima, 1978).

Pour déterminer l'effet des facteurs biotiques sur les concentrations des biomarqueurs étudiés, une régression linéaire multiple et les coefficients de corrélation ont été déterminés par le programme SPSS (version11).

Le modèle de régression linéaire multiple s'écrit de la façon suivante :

$Y= a + b_1X_1+ b_2X_2,\ldots.b_kX_k$

Où Y est la variable dépendante, $X_1,X_2,\ldots X_k$, sont les variables indépendantes ; a est l'ordonnée à l'origine estimée ; b1,b2,…bk, sont les pentes estimées. Chaque pente

indique le changement attendu dans Y pour un changement de une unité dans X_k. Les valeurs de p (probabilité) reflètent la présence ($p < 0,05$) ou l'absence ($p > 0,05$) d'effet significatif des variables indépendantes sur les variables dépendantes

C. Résultats

1. Choix des nœuds de la grille de prélèvement

Les résultats de l'étude préliminaire ont montré l'absence de variation significative des concentrations en Cd chez les organismes collectés à 160 m et 200 m par rapport à 140 m vers le sud de Zarb El Ain, à 26m par rapport à 46m et à 86m par rapport à 66m vers le large. C'est pour cette raison que les points 160 m et 200 m vers le sud et 26m et 86 m vers le large n'ont pas été retenu sur la grille finale de prélèvement.

2. Répartition spatiale du Cd bioaccumulé et des biomarqueurs étudiés

Les figures I. 9 ; I. 10 et I. 11 montrent que les concentrations en Cd, MT et MDA ont tendance à augmenter en se dirigeant vers le sud de Zarb El Ain et à diminuer en se dirigeant vers le large. Les teneurs maximales en Cd ont été enregistrées approximativement à partir de 700 m à 1000 m vers le sud. De même pour les variations des concentrations en MT et en MDA avec quelques exceptions. En effet les teneurs maximales en MDA ont été enregistrés aux points (480 m vers le sud ; 175 m vers le large) et (600 m vers le sud ; 160 m vers le large). En se dirigeant vers le sud de Zarb El Ain, une diminution de l'activité de l'AChE a été observée. Une augmentation de cette activité a été enregistrée en se dirigeant vers le large. Cependant, à partir d'à peu près 800 m vers le sud, cette augmentation avec le large n'a pas été observée (Fig. I. 12).

Une corrélation positive a été établie entre les concentrations en MT et en MDA et les teneurs en cadmium, et présentée par la figure I. 13 (a,b). Cette corrélation est plus significative pour les MTs que pour le MDA. En revanche, une diminution significative de l'activité de l'AChE avec l'augmentation des concentrations en Cd a été démontrée (Fig. I. 13c).

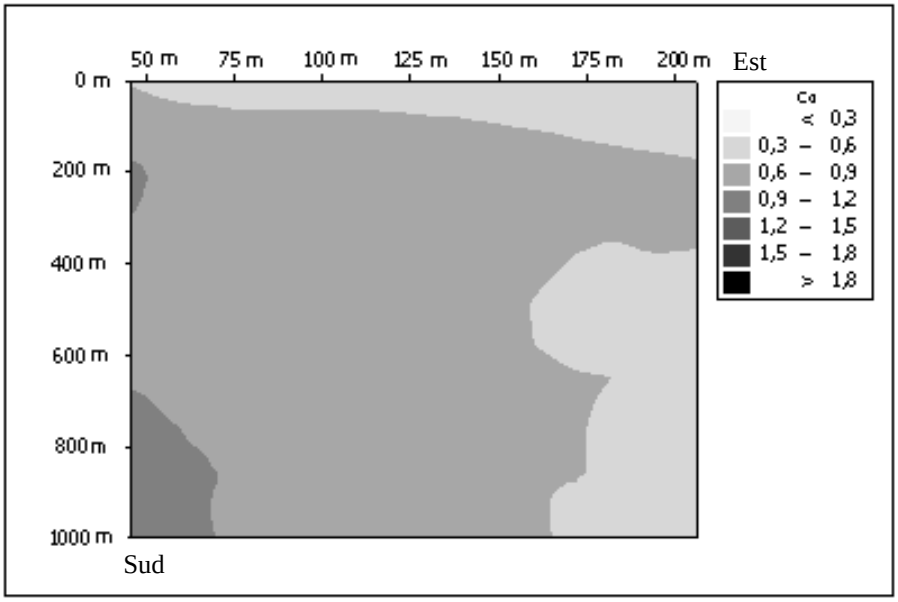


Figure I.9. Répartition spatiale du cadmium (µg/g poids sec) dosé au niveau du tissu mou de *C. glaucum.*

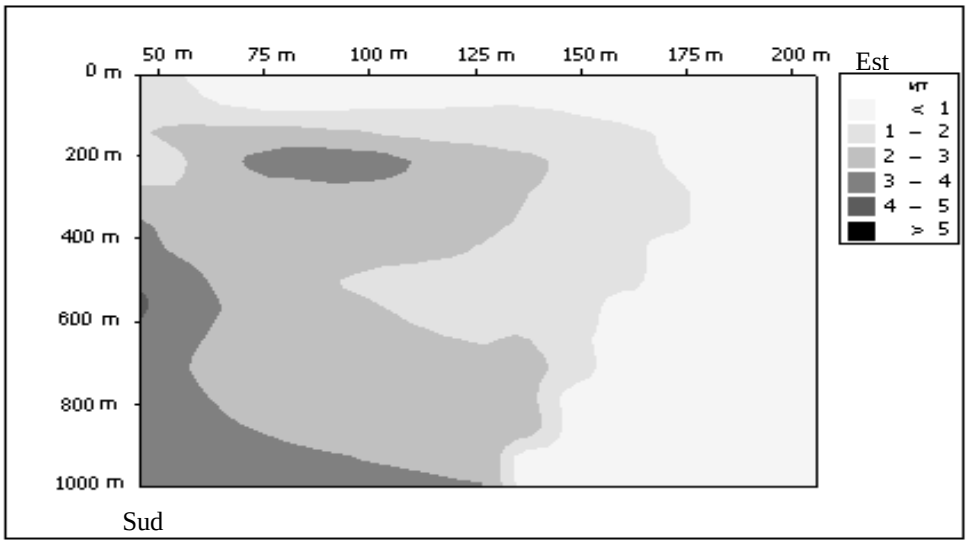


Figure I.10. Répartition spatiale de MT (mg/g poids frais) dosé au niveau de la glande digestive de *C. glaucum*.

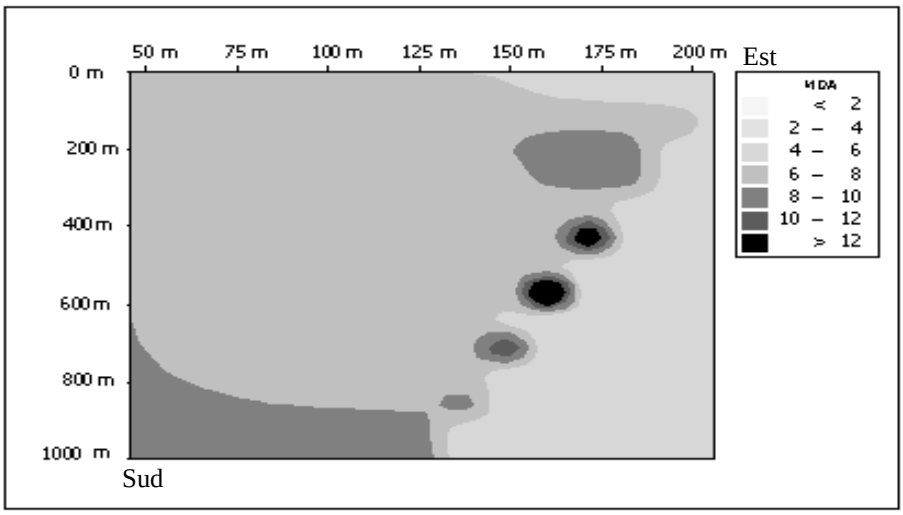


Figure I.11. Répartition spatiale du MDA (mM/g poids frais) dosé au niveau de la glande digestive de *C. glaucum*.

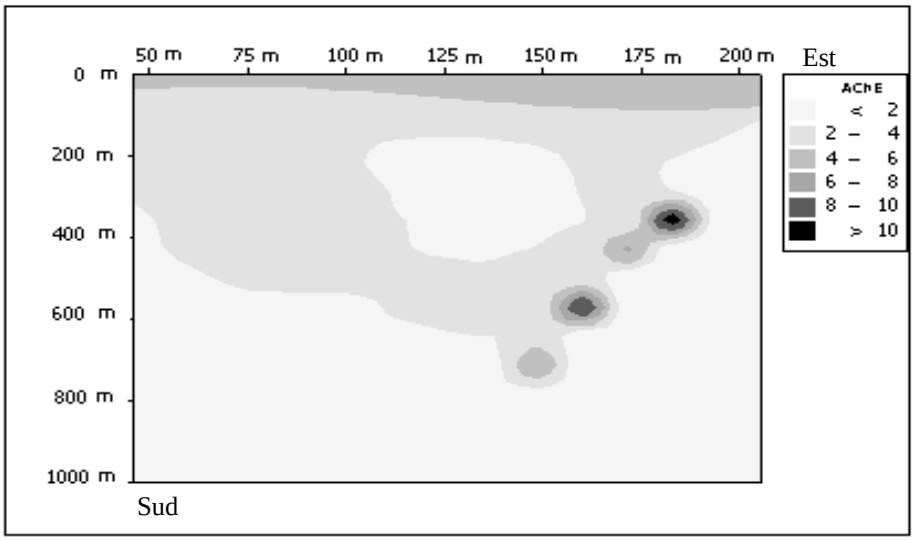


Figure I.12. Répartition spatiale de l'activité de l'AChE (nmol/min/mg Prot) déterminée au niveau des branchies de *C. glaucum*.

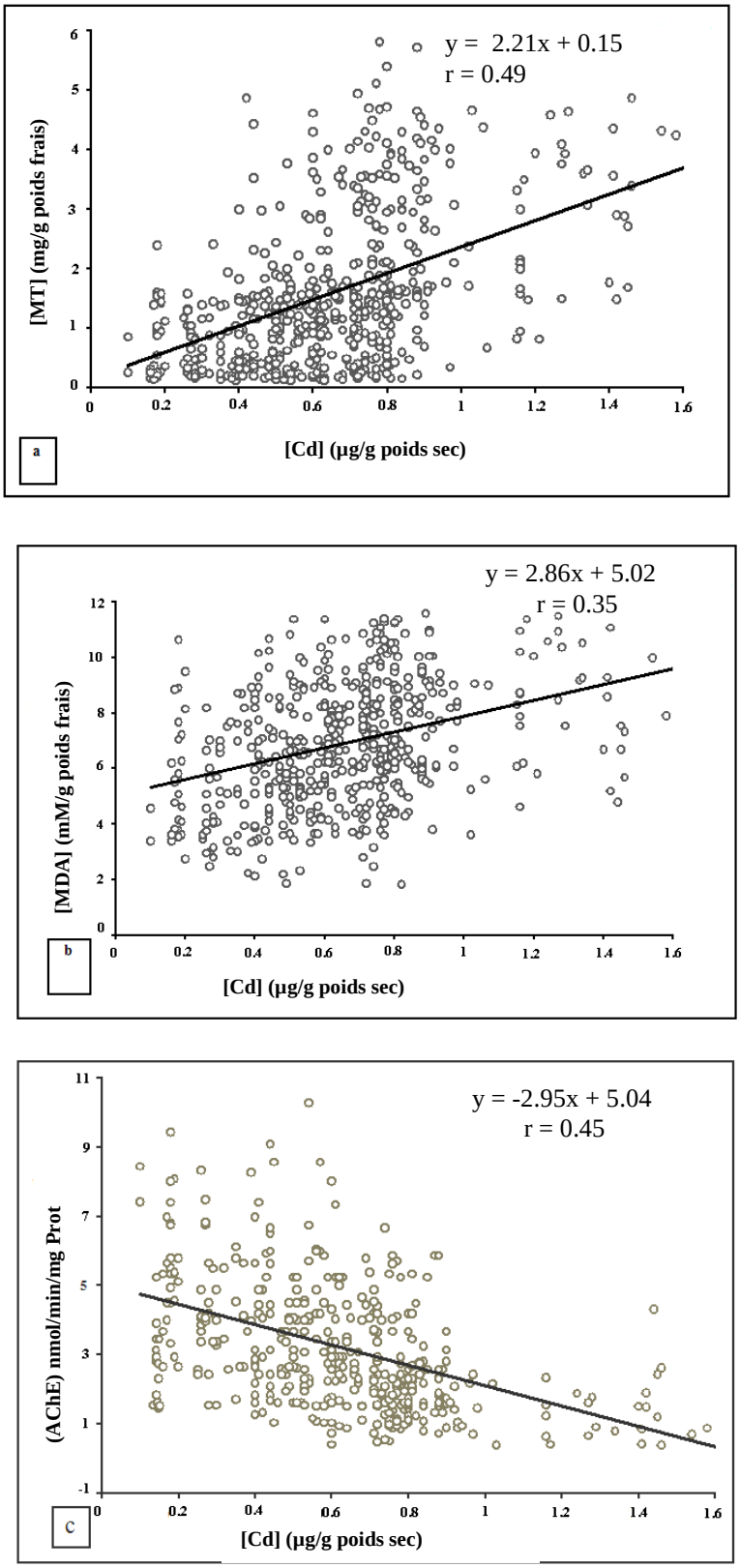


Figure I.13. Variation des concentrations en MTs (a), MDA (b) et variation de l'activité de l'AChE (c) en fonction des concentrations de cadmium *in toto* chez *C. glaucum* (signification de r est à 99%) (n= 561).

3. Effets des facteurs biotiques (sexe, masse, taille) sur les concentrations des biomarqueurs étudiés

Afin d'établir une comparaison entre l'effet du contaminant (Cd) et l'effet de certains facteurs biotiques (taille, poids et sexe) sur les concentrations des bioamarqueurs étudiés, des modèles linéaires multiples ont été estimés.

(I) MTs (DG) = 3.85 + 1.98 Cd – 0.12 taille (R^2 = 0.27)

(11.62) (-5.14)

(II) MDA = 9.967 + 2.55 Cd – 0.158 taille (R^2 = 0.14)

(7.64) (-3.51)

(III) AChE = -0.66 – 2.48 Cd + 0.18 taille (R^2 = 0.24)

(-8.51) (3.95)

Les modèles (I), (II) et (III) ont montré un effet significatif du Cd et de la taille sur les concentrations en MT et MDA et sur l'activité de l'AChE. Cet effet est plus important pour le Cd que pour la taille. Des corrélations négatives entre la taille et les concentrations en MT et en MDA ont été établies. En revanche, ces corrélations sont positives dans le cas de l'AChE. Les facteurs masse et sexe ne semblent pas influencer les concentrations ou les activités des biomarqueurs étudiés.

D. Discussion

Le cadmium a été détecté à des fortes concentrations dans différents sites du golfe de Gabès (Illou, 1999 ; Serbeji, 2000). Or, les invertébrés marins, notamment les bivalves concentrent très rapidement cet élément (Ray, 1986). Il est donc nécessaire d'évaluer les risques que présentent ces apports sur la faune du golfe. Pour cela, des individus de *C. glaucum* ont été prélevés dans un site pollué et ont servi pour l'étude de la **bioaccumulation du cadmium** et de ses effets suivant **un gradient** de contamination métallique. Les résultats ont montré que la coque *C. glaucum* est capable d'accumuler au niveau de ses tissus des concentrations en cadmium pouvant dépasser 1µg/g de poids sec.

Ces concentrations relativement importantes restent inferieures aux normes fixées par la législation tunisienne, soit 2 µg/g de poids sec (CRDA, 2002) et utilisées dans le réseau de biosurveillance des contaminants nocifs en Tunisie (Chouba et al, 1998). En revanche chez les palourdes du même site, les concentrations moyennes en Cd (*in toto*) sont supérieures à 2 µg/g de poids sec (les teneurs sont maximales en novembre atteignant 6,6 µg/g de poids sec) (Ketata et al. 2007). Les fortes teneurs métalliques (Cd) enregistrées aussi bien chez les coques que chez les palourdes du site Zarb El Ain présenteraient des risques écotoxicologiques et sanitaires potentiels. Chez la population d'étude, l'évaluation *in situ* de la bioaccumulation métallique a été basée sur l'analyse de cadmium *in toto*. Les analyses « *in toto* » nous renseignent sur la biodisponibilité des métaux dans l'environnement et de leur assimilation par les coques. De même, ces analyses ont été réalisées sur la palourde *R. decussatus* issue de différents sites du golfe de Gabès (Ketata et al. 2007, Machreki-Ajmi et al, 2008 ; Smaoui-Damak et al. 2004) et du Portugal (Bebianno et al. 1993).

L'étude de la **répartition spatiale du cadmium *in toto*** a montré une augmentation des concentrations en cadmium en se dirigeant vers la partie sud de Zarb El Ain et une diminution vers le large. Cette diminution peut être expliquée par le phénomène de dilution, alors que l'augmentation est peut être due aux courants nord-sud qui transportent à côté des polluants contenus dans les effluents industriels, une charge bactériologique importante liée aux fortes concentrations en particules vivantes (notamment les bactéries) au niveau de l'effluent issu de la station d'épuration de Sfax (Serbaji, 1991 ; 2000). Ce qui pourrait être un vecteur potentiel de transfert du Cd dans les tissus des coques du site Zarb El Ain. En effet, des travaux de la littérature ont montré que les moules (*M. edulis*) accumulent plus facilement le Cd fourni par l'intermédiaire de souches bactériennes, préalablement cultivées sur un milieu cadmié, que le Cd ionique (Flatau et Gauthier, 1983). Aussi, il ne faut pas oublier la présence du phénomène de lessivage des terrils de phosphogypse, déposés sur le littoral à quelques kms du site Zarb El Ain et qui constitue également un générateur important de pollution en Cd (Darmoul, 1979, Darmoul et Vitiello, 1980 ; Illou, 1999 ; Zairi et Rouis, 1999 ; Serbaji, 2000). Le transport de la pollution à des distances assez importantes comme cela a été décrit dans ce travail n'a pas été observé dans la baie de Port Phillips (Australie) où les concentrations en cadmium les plus importantes chez *M. edulis* ont été enregistrées à proximité de la source de pollution (Phillips, 1976).

Afin d'évaluer l'impact écotoxicologique des polluants sur les organismes marins, l'utilisation des marqueurs biologiques ou **biomarqueurs** est envisageable. Ces biomarqueurs ont été largement utilisés dans le cadre des programmes de surveillance de la qualité de l'environnement vu leur capacité à fournir des informations sur l'état de santé des individus. Néanmoins, cet état de santé ne peut être révélé en utilisant un biomarqueur unique. L'utilisation *in situ* de batteries de biomarqueurs permettrait vraisemblablement une évaluation réaliste et fiable des effets écotoxicologiques des polluants sur les écosystèmes (Lagadic et al. 1997). Cependant, cette application nécessite la présence d'organismes bioindicateurs. Les bivalves ont été considérés comme d'excellents indicateurs de contamination en raison de leur forte capacité de bioaccumulation de polluants. Ce qui reflète, contrairement aux analyses réalisées sur le sédiment ou l'eau, la quantité de polluants biodisponibles dans l'environnement. De ce fait, les bivalves ont été utilisés dans les **programmes de biosurveillance** de la qualité de l'environnement. Les moules *M. edulis* et *M. galloprovincialis* ont été utilisés dans les programmes « Mussel Watch » aux Etats-Unis ou « RNO » en France. De même la palourde *R. decussatus* a été utilisée dans le programme national tunisien de surveillance de la qualité de l'environnement. La coque *C. glaucum* a été aussi validée comme bioindicateur de pollution (Machreki-Ajmi et al. 2008). Dans cette étude une **approche multiparamétrique** a été mise en place en utilisant plus d'un biomarqueur pour l'évaluation diagnostique et prédictive des effets de la pollution sur une population de *C. glaucum.* Les biomarqueurs utilisés sont la **métallothionéine (MT), le malonedialdéhyde (MDA) et l'acétylcholinéstérase (AChE).**

Il a été admis pendant très longtemps que les **MTs** jouaient un rôle protecteur vis-à-vis des métaux toxiques en immobilisant ceux-ci et en empêchant leur fixation sur certaines protéines de haut poids moléculaire et la dénaturation de ces dernières (Lagadic et al. 1997). L'induction de synthèse des MTs par les métaux toxiques tels que le cadmium a été prouvée par différentes études (Amiard et al. 2006 ; Ladhar-Chaabouni et al. 2007 ; Machreki-Ajmi et al. 2008). Dans cette étude l'augmentation de la quantité de cadmium bioaccumulé est suivie d'une augmentation de la synthèse des MTs au niveau de la glande digestive de *C. glaucum*. En effet, une corrélation positive et significative a été établie entre les concentrations en Cd *in toto* et en MTs dans la glande digestive de *C. glaucum*. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs sur la même espèce (Machreki-Ajmi et al. 2008), sur *R. decussatus* (Smaoui-Damak et al. 2004), *M. edulis* (Geffard et al.

2001) et *M. galloprovincialis* (Isani et al. 1997). Comparées à la littérature, les concentrations en MTs dans la glande digestive des coques (1-5 mg/g poids frais) sont proches de celles obtenues chez les palourdes du site Gargour (golfe de Gabès) (3,4 mg/g poids frais) (Hamza-Chaffai et al. 1999) et chez la moule *M. galloprovincialis* (3mg/g poids frais) prélevée de la lagune Pialassa Baiona (Italie) (Donnini et al. 2007). Les travaux de Machreki-Ajmi et ses collaborateurs (2008) ont montré des concentrations en MTs ne dépassant pas les 1,2 mg/g de poids frais de la glande digestive de *C. glaucum* collectée du site Gargour qui est le site le plus proche de Zarb El Ain vers le sud. Ceci prouve que les échantillons ont été collectés loin de la côte en se dirigeant vers le large. L'induction de synthèse des MTs par les métaux ne peut être une règle générale puisque cette réponse n'a pas été détectée chez certaines espèces telles que *Crassostrea glomerata* exposée à la pollution métallique dans son milieu naturel (Norbderg et al. 1986). La résistance de cette espèce à cette contamination est peut être due à la présence d'autres mécanismes de détoxication faisant intervenir les lysosomes, des protéines de haut poids moléculaire, des enzymes, des molécules riches en groupements –SH telles que des acides aminés, des peptides (GSH) (Viarengo, 1989 ; George, 1990). Chez l'huitre *Crassostrea gigas*, il a été montré que la détoxication du Cd (Jeantet et al. 1997) et du Pb (Amiard et al. 1989) se faisait par des lysosomes qui immobilisent ces métaux dans un état chimique stable et inerte. De plus, chez *Ruditapes decussatus* il a été montré que certaines enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase, la catalase ou le glutathion agissent comme premier mécanisme de défense contre l'excès de Cd (Géret et al. 2002 b ; 2003). Plus encore, une inhibition de la synthèse des MTs par les métaux est plausible. C'est le cas de la palourde collectée dans un site contaminé aussi bien par le cadmium que par l'argent et le cuivre (Smaoui-Damak et al. 2004).

Le second biomarqueur étudié dans ce chapitre est le malonedialdéhyde. Les résultats ont montré une augmentation des concentrations en MDA avec l'augmentation du taux de cadmium bioaccumulé. Une corrélation positive a été déterminée entre les concentrations en Cd *in toto* et en MDA dans la glande digestive de *C. glaucum*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Machreki-Ajmi et ses collaborateurs (2008) qui ont montré une augmentation des concentrations en MDA dans un site où les taux en Cd sont élevés par rapport à un site témoin. Géret et ses collaborateurs (2002 a) ont montré une augmentation des concentrations en MDA chez la moule *M. edulis* exposée au cadmium pendant 21 jours. Cette augmentation a été également mise en évidence chez *R.*

decussatus exposée au cadmium (Géret et al. 2002 b), *Pyganodon grandis* (Bonneris et al. 2005) et *Bathymodiolus azoricus* exposées à des métaux dans leur milieu naturel (Bebianno et al. 2005). Cette augmentation des concentrations en MDA chez les organismes contaminés par le cadmium peut être expliquée par le fait que le cadmium engendre la production de radicaux libres dans une cellule ce qui entraîne différentes conséquences cytotoxiques, dont l'inactivation des systèmes enzymatiques et surtout la détérioration de la membrane cellulaire par attaque de ses acides gras constitutifs, ce qui se traduit par des phénomènes de peroxydation lipidique. La méthode d'évaluation de ce phénomène consiste alors à doser un des produits finaux de dégradation des acides gras, le MDA, dont la teneur est en relation étroite avec les dégradations de la membrane cellulaire et, d'une manière générale, avec le stress oxydant subi par les cellules de l'organisme.

Aucune relation n'a été déterminée entre les concentrations en MDA et les teneurs cytosoliques en cuivre et en zinc chez *Pyganodon grandis* (Bonneris et al. 2005). Suite à une contamination par ces mêmes métaux, une diminution des concentrations en MDA a été observée chez *Crassostrea angulata* et *Mytilus galloprovincialis* (Funes et al. 2005). Ce dernier résultat peut être expliqué par le fait que les systèmes enzymatiques antioxydants n'ont pas été touchés suite à une contamination par le cuivre ou le zinc.

Concernant l'activité de l'acétylcholinestérase (**AChE**) qui représente le troisième biomarqueur étudié dans ce chapitre, une diminution suite à l'augmentation des teneurs en Cd a été observée au niveau des branchies de *C. glaucum*. Une corrélation négative a été observée entre les concentrations en Cd *in toto* et l'activité en AChE dans les branchies de *C. glaucum*. L'activité maximale a été détectée dans la zone la moins polluée (partie nord et est de Zarb El Ain) ce qui est en accord avec les résultats obtenus sur *M. galloprovincialis* (Mora et al. 1999) collectée sur un site relativement propre de la baie d'Arcachon (France). Cependant une diminution de cette activité avec l'augmentation des teneurs en cadmium a été observée dans le site de Zarb El Ain. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Machreki-Ajmi et ses collaborateurs (2008) qui ont montré une inhibition de l'activité de l'AChE au niveau du reste (pied, manteau, muscle adducteur et siphons) de *C. glaucum* exposée *in situ* au cadmium. En plus du cadmium, il a été démontré que le cuivre joue un rôle au niveau de l'inhibition de l'activité de l'AChE. En effet, Najimi et ses collaborateurs (1997) ont montré que l'inhibition de l'activité de l'AChE est plus importante chez les moules exposées au cuivre qu'au cadmium. A côté des métaux, l'effet inhibiteur de l'activité de l'AChE a été attribué à d'autres xénobiotiques

tels que les pesticides (Lionetto et al. 2003) et les composés organophosphorés (Ricciardi et al. 2006). Sous l'effet des pesticides, une réduction de 50% de l'activité de l'AChE a été notée chez *M. galloprovincialis* (Lionetto et al. 2003). Dans ce chapitre, une diminution jusqu'à 20% de l'activité de l'AChE a été observée. D'après l'US EPA (1998), une réduction au niveau de l'activité de l'AChE de 20% ou plus reflète la présence d'effet toxicologique significatif. Une inhibition de l'activité de l'AChE au niveau des points (800 m sud, 206 m large) et (1000 m sud, 206 m large) malgré la diminution des concentrations en Cd a été observée. Ce résultat peut être expliqué par la présence de facteurs inhibiteurs autres que le cadmium.

A côté du cadmium, les concentrations en biomarqueurs peuvent être influencées par quelques **facteurs biotiques** comme le sexe, la masse et la taille. Dans ce travail il a été démontré que les facteurs masse et sexe n'ont aucun effet sur les concentrations des biomarqueurs étudiés. Par contre, un effet taille a été observé.

L'effet **sexe** sur les variations des concentrations en MTs dans la glande digestive de la palourde dans la période de reproduction allant de juin à septembre a été démontré par les travaux de Hamza-Chaffai et ses collaborateurs (1999). Sur cette même espèce, Smaoui-Damak et ses collaborateurs (2004) ont montré que les concentrations en MTs branchiales sur toute une année ne montrent pas de différence significative en fonction du sexe. En revanche, dans la glande digestive un effet sexe sur une période de l'année a été observé. Dans la glande digestive de la palourde portugaise, aucune différence significative des teneurs en MTs n'a pu être établie entre les sexes (Serafim et Bebianno, 2001). De même, aucun effet significatif du facteur sexe sur les variations des concentrations en malondialdéhyde chez *C. glaucum* n'a été déterminé dans cette étude. Ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Ladhar-Chaabouni et ses collaborateurs (2007) sur la palourde *R. decussatus*. En ce qui concerne l'activité de l'acétylcholinéstérase, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Lionetto et ses collaborateurs (2003) sur la moule *M. galloprovincialis*.

L'effet **masse** sur les variations des concentrations en MTs dans la glande digestive de la coque *C. glaucum* n'a pas été observé dans cette étude. En revanche, une variation significative des concentrations en MTs en fonction de la masse a été établie chez la palourde *R. decussatus* (Smaoui-Damak et al. 2004).

Contrairement aux facteurs sexe et masse, nos résultats ont montré un effet **taille** significatif sur les variations des teneurs en biomarqueurs étudiés chez *C. glaucum*. L'influence de la taille sur les concentrations en MTs et en MDA a été également déterminée chez la palourde *R. decussatus* issue du golfe de Gabès (Hamza-Chaffai et al. 1999 ; Hamza-Chaffai et al. 2003). Chez la moule portugaise *M. galloprovincialis*, un effet significatif du facteur taille sur les variations des teneurs en MTs a été déterminé (Serafim et al. 2002). Cependant, aucun effet taille n'a été observé sur l'activité de l'AChE au niveau des branchies de la moule *Perna viridis* (Lau et Wong, 2003).

La **corrélation** négative entre le facteur taille et les concentrations en MTs et en MDA, et positive dans le cas de l'AChE, peut être expliquée par la présence d'un effet taille sur la bioaccumulation des métaux mise en évidence chez d'autres espèces. En effet, les concentrations en cadmium chez la moule *M. edulis* sont corrélées négativement avec la taille dans plusieurs sites pollués (Pophan et d'Auria, 1983). De même, chez la palourde *R. decussatus* collectée du site Zarb El Ain (Ketata et al. 2007). Ces résultats montrent une diminution des concentrations en cadmium dans les tissus des organismes étudiés avec l'augmentation de la taille. Toutefois, les phénomènes expliquant cette relation inverse demeurent un sujet de discussion. Pour certains auteurs, la grande capacité d'accumulation des métaux observée chez les bivalves de petite taille est liée à leur forte activité métabolique en comparaison avec les organismes de large taille (Das et Jana, 2003). Pour d'autres auteurs, cette forte bioaccumulation est plutôt liée à l'importance relative de la surface par rapport au volume chez les organismes de petite taille, ce qui entraîne une adsorption d'une proportion importante des métaux à leur surface (Rainbow, 1993).

Dans cette étude *in situ*, la répartition spatiale de Cd et de certains biomarqueurs au niveau d'un site exposé à la pollution a été déterminée en utilisant un organisme bioindicateur. Les principaux résultats ont montré :

- Une augmentation des teneurs en Cd, MTs et MDA et une diminution de l'activité de l'AChE en se dirigeant vers le sud.

- Une migration de la pollution par les courants nord-sud.

- L'état alarmant de l'écosystème étudié.

- La présence d'effet taille sur les teneurs en MTs, MDA et AChE.



Chapitre II

Variations in vivo des concentrations en biomarqueurs (métallothionéine et malonedialdéhyde) avec le temps et la concentration du cadmium chez Cerastoderma glaucum

***Article: LADHAR-CHAABOUNI R**, SMAOUI-DAMAK W and HAMZA-CHAFFAI A (2009)*

In vivo variation of some biomarkers with time and cadmium concentration in the cockle Cerastoderma glaucum. Marine biology research, in press.

A. Introduction

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à étudier *in vivo* l'effet d'une contamination par différentes concentrations de chlorure de cadmium durant des temps variables sur la synthèse de MT, MDA et protéines chez la coque *C. glaucum.* Cette étude présente l'avantage d'être réalisée *in vivo*. En effet, contrairement aux travaux réalisés *in situ*, cette étude permettra d'estimer les conditions optimales d'induction de synthèse des MTs chez *C. glaucum* ce qui n'a jamais été réalisé auparavant. Cette optimisation a été réalisée en choisissant la concentration de $CdCl_2$ et la durée d'exposition qui provoquent une induction maximale de synthèse des MTs tout en évitant les fortes perturbations métaboliques. Ainsi, le suivi de l'état de santé des animaux contaminés a été réalisé à travers l'étude des variations des teneurs en malonedialdéhyde et en proteines à côté du test de « stress on stress ».

B. Matériels et Méthodes

1. Site de prélèvement

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi Mahrès comme site d'échantillonnage. Mahrès est une ville côtière située à 30 kilomètres au sud de Sfax et à 300 kilomètres de Tunis. Cette ville est connue par la culture de l'olivier, l'extraction de l'huile d'olive, la pêche. Ainsi, la plus grande oliveraie d'Afrique se situe au sein de la délégation de Mahrès. Le choix de ce site d'étude a été basé sur quelques critères à savoir son éloignement de la zone industrielle, la facilité d'accès à ce site et sa richesse en *C. glaucum* qui représente notre matériel biologique.



Figure II.1. Photographies du site de prélèvement (Mahrès)

2. Prélèvement et expérience de contamination *in vivo*

1250 individus de *C. glaucum* ont été prélevés et répartis sur cinq bacs contenant chacun 7l d'eau de mer et 250 échantillons, Après une durée de 24 heures d'acclimatation, les bivalves ont été exposés à différentes concentrations de $CdCl_2$ inspirées de la littérature : 50, 75, 100 et 150 µg/l durant 5, 10, 15 et 20 jours (Fig. II. 2). Un premier bac a été utilisé pour les échantillons témoins. Les bivalves ont été nourris, l'eau et le contaminant ont été renouvelés 2 fois par semaine.

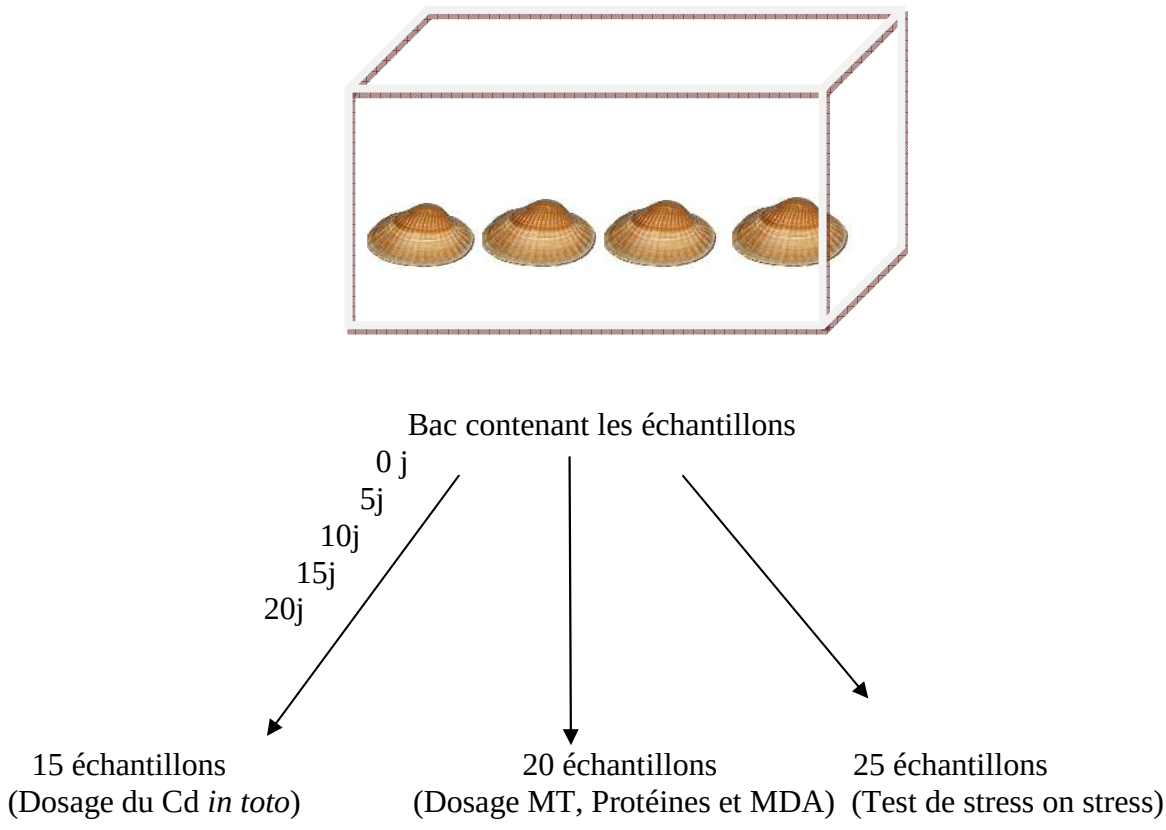


Figure II.2. Nombre d'échantillons utilisés pour les différents dosages.

3. Préparation des échantillons

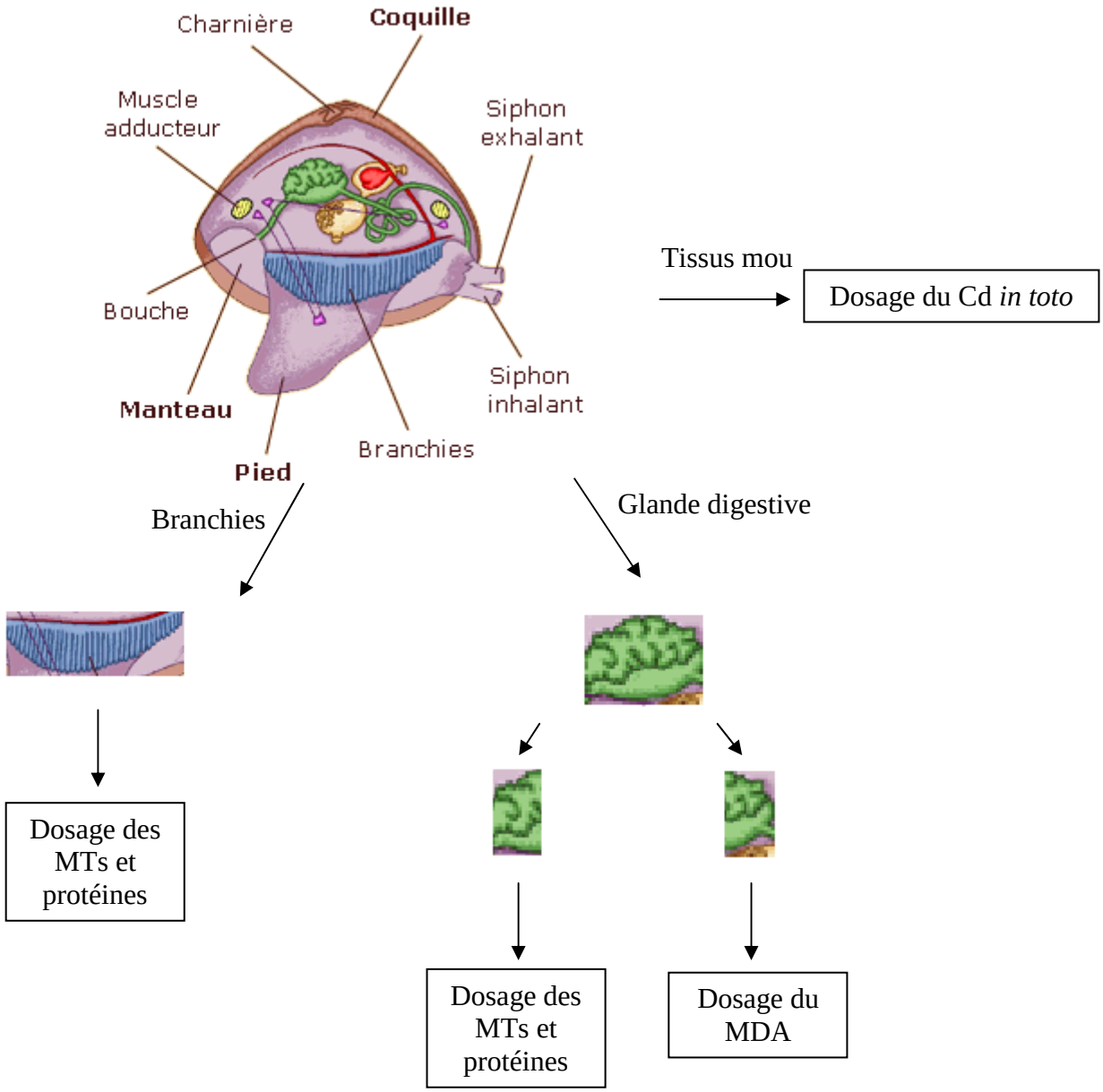


Figure II.3. Schéma montrant les diffèrents compartiments utilisés pour les différents dosages réalisés.

4. Dosage du cadmium, des métallothionéines et du malonedialdéhyde

On a utilisé les mêmes précautions et les mêmes protocoles vus dans la partie matériels et méthodes du chapitre I.

5. Dosage des protéines

Après l'homogénéisation des branchies et des glandes digestives dans le tampon Tris-HCl (annexe V), les broyats obtenus sont centrifugés à 25000 g durant 1heure à 4° C. Le dosage des protéines est réalisé sur les fractions cytosoliques (S1).

En présence du réactif de Biorad, nous avons noté l'apparition d'une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la teneur en protéines. L'absorbtion des échantillons est lue à 595 nm (Bradford, 1976).

La gamme d'étalonnage a été établie à partir des solutions de BSA (sérum albumine bovine) (annexe IV).

6. Test de « stress on stress »

Le test de «stress on stress» est un indicateur non spécifique qui donne une évaluation globale de l'état de santé des organismes. Ce test est basé sur la capacité des organismes à supporter les conditions d'anoxie. En effet, la méthode consiste à superposer deux types de stress : le stress causé par la présence du Cd et celui qui est due à l'anoxie (exposition des organismes à l'air libre).

Ainsi, 25 individus prélevés dans chaque bac et durant chaque période de contamination, sont exposés à l'air libre (anoxie). Chaque jour, un comptage de nombre d'individus qui meurent est déterminé afin de calculer la LT50 (temps létal pour 50% d'individus).

7. Analyse statistique

Pour suivre l'effet de facteurs temps et des concentrations de $CdCl_2$ sur les concentrations des facteurs étudiés, une régression multiple a été réalisée.

Un test de Tukey nous a permis de déterminer les différences statistiques entre les moyennes obtenues. Cette étude statistique a été réalisée avec le programme SPSS version 11.

C. Résultats

1. Variations de cadmium dans les tissus mous (*in toto*)

Les résultats de la régression multiple ont montré la présence d'un effet significatif des facteurs temps et dose de $CdCl_2$ sur la bioaccumulation du cadmium au niveau des

tissus mous de *C. glaucum*. Les variations des teneurs en cadmium *in toto* en fonction du temps et de la concentration en $CdCl_2$ sont illustrées dans la figure II. 4. Les résultats ont montré une augmentation significative de la bioaccumulation du cadmium après 15 jours d'exposition à 50 µg/l $CdCl_2$, 10 jours à 75 µg/l $CdCl_2$ et 5 jours à 100 et 150 µg/l $CdCl_2$. Une mortalité totale des coques a été observée après 18 jours de contamination par 100 µg/l de $CdCl_2$. A t=20 jours, une augmentation significative de la bioaccumulation du cadmium a été déterminée chez les individus exposés à 50, 75 et 150 µg/l $CdCl_2$ par rapport à t=15 jours. Cette augmentation est, respectivement, de 2, 5 et 3 fois plus importante.

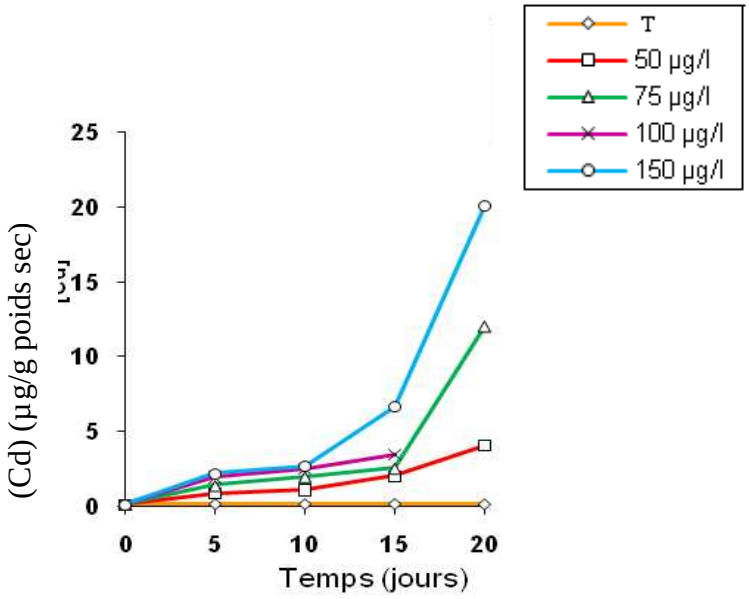


Figure II.4. Variation des concentrations en cadmium *in toto* (µg/g poids sec) chez *C. glaucum* exposée à différentes concentrations de $CdCl_2$ (50, 75, 100 et 150 µg/l) durant 5, 10, 15 et 20 jours (n= 285)

2. Variation des concentrations en métallothionéines au niveau des branchies et de la glande digestive de *C. glaucum*

Les facteurs temps et concentration de $CdCl_2$ affectent d'une façon significative les teneurs en métallothionéines.

a. Variation des MTs en fonction du facteur temps

- Pour une contamination par 50 µg/l $CdCl_2$, la synthèse des MTs a été observée après 15 jours d'exposition. Cette synthèse maximale est suivie d'une diminution significative après 20 jours de contamination.

- Pour une contamination avec 75 µg/l $CdCl_2$, la synthèse de MTs a été détectée après uniquement 5 jours d'exposition.
- Pour une contamination par 100 et 150 µg/l $CdCl_2$, les variations des concentrations en MTs gardent presque la même allure. L'induction commence dés le 5^{éme} jour. Les valeurs maximales en MTs ont été observées après 10 jours d'exposition. Une diminution significative a été déterminée à t=15 jours.

b. Variation des concentrations en MTs en fonction du facteur concentration de $CdCl_2$

Lorsque le temps d'exposition est inférieur à 15 jours, l'induction de synthèse des MTs a été observée avec 75, 100 et 150 µg/l $CdCl_2$. Cependant, Durant le 15ème jour de contamination, l'induction de synthèse des MTs a été déterminée avec 50 et 75 µg/l de $CdCl_2$. Une perturbation de la synthèse des MTs a été détectée à t=20 jours d'exposition (Fig. II. 5 et II.6).

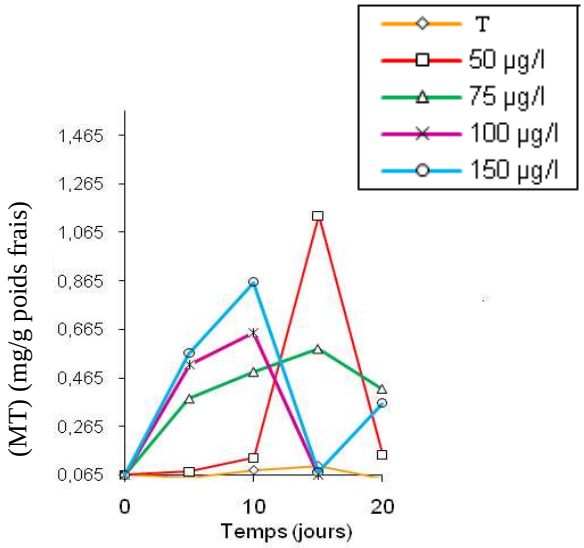


Figure II.5. Variation des concentrations en métallothionéine (mg/g poids frais) au niveau des branchies de *C. glaucum* exposée à différentes concentrations de $CdCl_2$ (50, 75, 100 et 150 µg/l) durant 5, 10, 15 et 20 jours (n= 380)

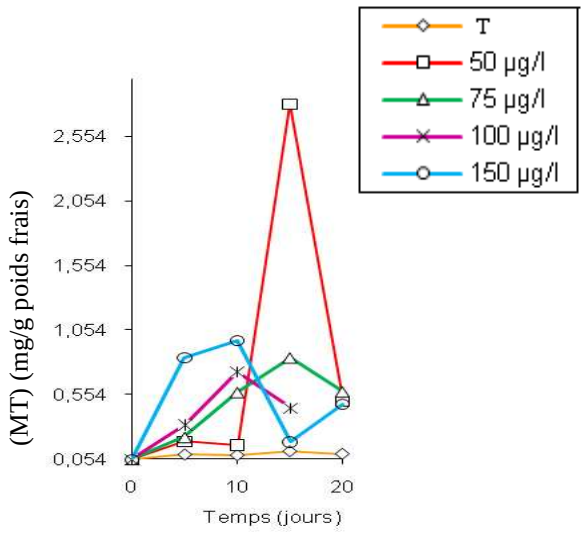


Figure II.6. Variation des concentrations en métallothionéine (mg/g poids frais) au niveau des glandes digestives de *C. glaucum* exposée à différentes concentrations de $CdCl_2$ (50, 75, 100 et 150 µg/l) durant 5, 10, 15 et 20 jours (n= 380)

3. Variations des concentrations en protéines au niveau des branchies

Un effet significatif des facteurs doses de $CdCl_2$ et temps sur la variation des concentrations en protéines au niveau des branchies de *C. glaucum* a été déterminé.

La synthèse de protéines a été observée après uniquement 5 jours (Fig II. 7) chez les coques exposées aux différentes concentrations de $CdCl_2$. Concernant les trois concentrations de $CdCl_2$: 50, 75 et 100 µg/l, une augmentation progressive des teneurs en protéines a été enregistrée. Dans le cas des animaux contaminés par 150 µg $CdCl_2$/l, les concentrations en protéines augmentent jusqu'au 10ème jour puis diminuent au 15 ^{ème} jour d'exposition.

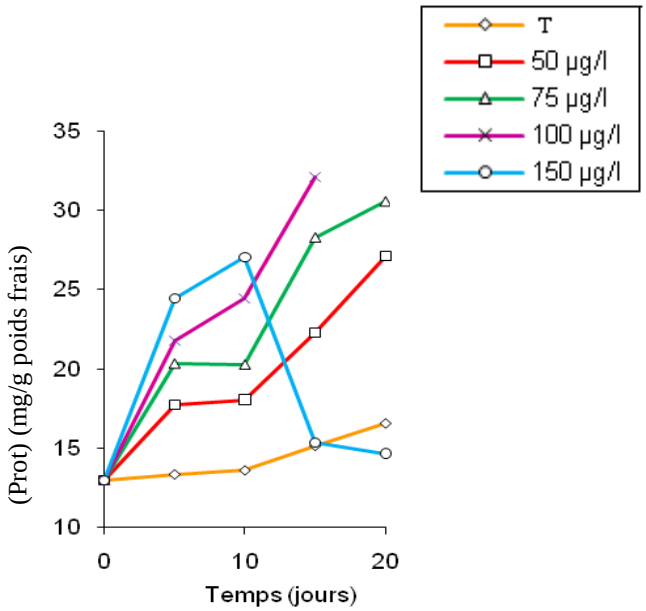


Figure II.7. Variation des concentrations en protéines (mg/g poids frais) au niveau des branchies de *C. glaucum* exposée à différentes concentrations de $CdCl_2$ (50, 75, 100 et 150 µg/l) durant 5, 10, 15 et 20 jours (n= 380)

4. Variation des concentrations en protéines au niveau de la glande digestive

Un effet significatif des facteurs concentration de $CdCl_2$ et temps sur la variation des teneurs en protéines au niveau de la glande digestive de *C. glaucum* a été mis en évidence. La figure II. 8 montre une augmentation progressive des concentrations en protéines avec le temps et les concentrations de $CdCl_2$. Par contre une diminution significative des concentrations en protéines a été observée chez les coques exposées à 150 µg $CdCl_2$/l après 15 jours de contamination.

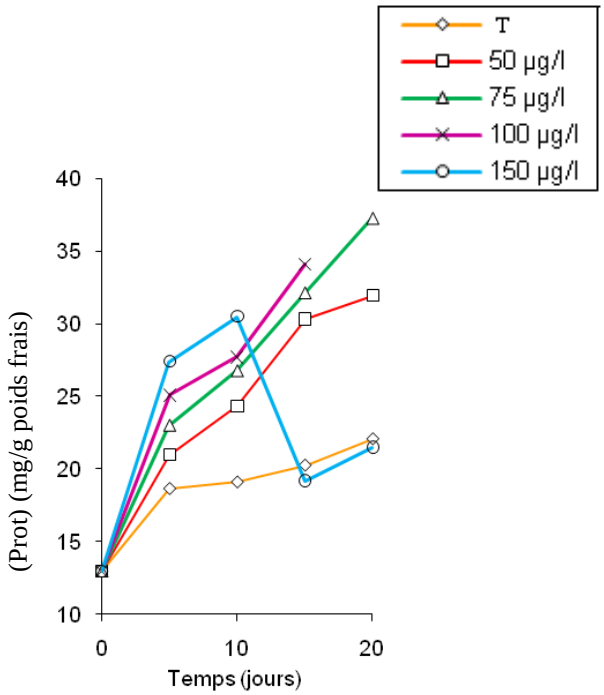


Figure II.8. Variation des concentrations en protéines (mg/g poids frais) au niveau des glandes digestives de *C. glaucum* exposée à différentes concentrations de $CdCl_2$ (50, 75, 100 et 150 µg/l) durant 5, 10, 15 et 20 jours (n= 380)

5. Variation des concentrations en malonedialdéhyde au niveau de la glande digestive de *C. glaucum*

Le stress oxydatif causé par le cadmium a été démontré par le dosage du malonedialdéhyde (Fig. II. 9). Les facteurs temps et dose de $CdCl_2$ affectent d'une façon significative les variations des teneurs en malonedialdéhyde. En comparant avec les témoins, les concentrations en MDA augmentent significativement avec les concentrations de $CdCl_2$ dés le $5^{ème}$ jour d'exposition. Cette augmentation varie linéairement avec le temps de contamination de 0 à 15 jours. A t=10 jours, une augmentation significative des concentrations en MDA a été observée. En effet, le taux de MDA est 3 fois plus important chez les coques exposées à 50µg/l $CdCl_2$ par rapport aux témoins.

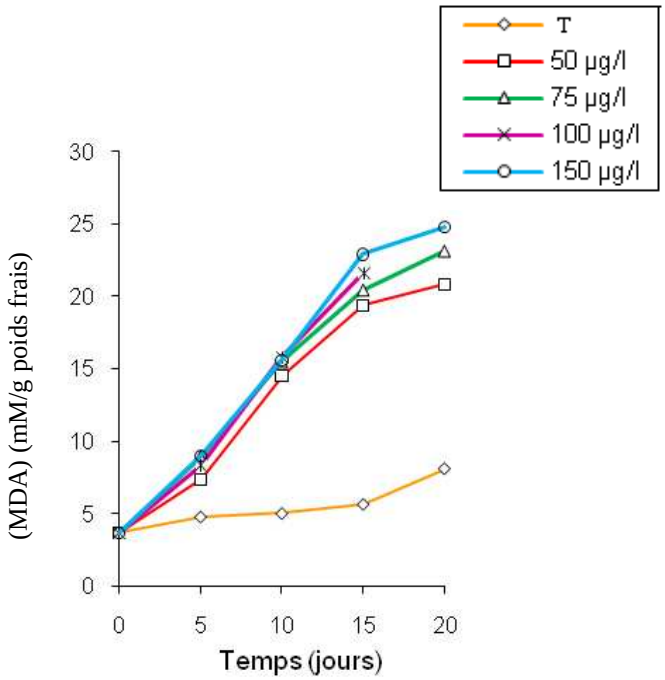


Figure II.9. Variation des concentrations en malonedialdéhyde (mM/g poids frais) au niveau des glandes digestives de *C. glaucum* exposée à différentes concentrations de $CdCl_2$ (50, 75, 100 et 150 µg/l) durant 5, 10, 15 et 20 jours (n= 380)

6. Le test de stress on stress

Le test de stress on stress a été réalisé sur des coques qui ont été préalablement exposées au cadmium (n=25). Le temps létal pour 50 % d'individus (LT50) a été déterminé et présenté dans le tableau II. 1. Une diminution de la LT50 avec l'augmentation de la concentration de cadmium et le temps d'exposition a été observée. Ce qui reflète une diminution de la tolérance au stress chez les animaux contaminés.

[$CdCl_2$] \ Jours	5	10	15	20
Control	6.65	6.44	6.30	5.50
50 µg l^{-1}	**6.58**	**6.40**	**6**	**5**
75 µg l^{-1}	6.50	6.23	5.5	4.90
100 µg l^{-1}	6.25	6	2	100% de mortalité après 18 jours de contamination
150µg l^{-1}	**5.42**	**5.30**	**5**	**3.50**

Tableau II.1. La LT50 après 5, 10, 15 et 20 jours de contamination avec 50, 75, 100 et 150 µg/l de $CdCl_2$ (n= 475)

D. Discussion

Pour évaluer la réponse de *C. glaucum* à une contamination par le cadmium et pour étudier l'impact de cette contamination au niveau cellulaire, **une étude *in vivo*** s'avère très utile. Au cours de cette étude, une augmentation de la **bioaccumulation de Cd** avec le temps et la concentration de $CdCl_2$ a été observée chez les coques contaminées ce qui reflète la capacité de *C. glaucum* à bioaccumuler le cadmium au niveau de ses tissus. La capacité bioaccumulatrice des bivalves exposés à une contamination métallique soit au laboratoire soit dans leur milieu naturel a été mise en évidence chez plusieurs espèces telles que *R. decussatus* (Bebianno et al. 1993 ; Smaoui-Damak et al. 2003 ; 2004), *C. fluminea* (Legeay et al. 2005) et *D. polymorpha* (Marie et al. 2006).

Après 18 jours de contamination avec 100 µg/l de $CdCl_2$ une mortalité totale des coques a été observée. Des résultats similaires ont été décrits chez *R. decussatus* exposée à une concentration de cadmium beaucoup plus importante (500 µg/l) pendant 96 heures (Roméo et Gnassia-Barelli, 1995). Il semble que la palourde *R. decussatus* est plus résistante à une contamination par le cadmium que la coque *C. glaucum.*

La contamination par le Cd a induit une augmentation de **la synthèse des MTs** chez les organismes exposés. L'inductibilité des MTs par les métaux a été déterminée chez plusieurs espèces de mollusques bivalves telles que la palourde (Bebianno et Serafim, 1998), la moule (Bebianno et Langston, 1991) et l'huître (Roesijadi et klerks, 1989; Géret et al. 2002 a). Ces études ont mis en évidence la participation de ces protéines aux processus de détoxication et d'acquisition d'une certaine tolérance/résistance vis-à-vis des métaux (Kagi et Kojima, 1987). L'observation d'une telle induction chez *C. glaucum*, confirme le statut d'espèce sentinelle de la coque et l'intérêt de ce modèle dans le suivi de contamination environnementale par le cadmium.

Chez *C. glaucum*, la synthèse des MTs est temps et dose dépendante. Chez certaines espèces, l'induction de synthèse des MTs suite à une contamination métallique s'est avérée rapide. C'est le cas de *Dreissena polymorpha* pour laquelle une synthèse des MTs a été observée après 24 h d'exposition à 2 et 20 µg Cd l^{-1} (Lecoeur et al. 2004) et le cas de *C. virginica* pour laquelle cette induction a été déterminée après 4 jours d'exposition à 50 µg Cd l^{-1} (Roesijadi et Klerks, 1989). Dans d'autres cas, la synthèse des MTs est moins rapide. Elle a été observée après 12 jours chez la palourde *R. decussatus* exposée à 400 µg Cd l^{-1} (Bebianno et al. 1993). Après 21 jours d'exposition à 200µg Cd $l,^{-1}$ aucune induction

de MTs n'a été observée dans la glande digestive de *M. edulis* (In Amiard et al. 2006). Il est clair que la capacité de synthétiser la MT suite à une contamination par le Cd n'est pas uniforme chez les mollusques bivalves (Langston et al. 1989).

Pour cette raison, il a été nécessaire de déterminer **les conditions optimales** de synthèse des MTs chez *C. glaucum*, d'autant plus que très peu d'études se sont intéressées à cette espèce. D'après notre point de vue, identifier les meilleures conditions pour la synthèse de MTs est essentiel pour l'étude de l'expression des gènes codant ces protéines. Pour l'induction de synthèse des MTs chez *M. edulis* Barsyte et ses collaborateurs (1999) ont utilisé 400µg Cd/l durant 22 jours, si ces mêmes conditions ont été utilisées avec *C. glaucum*, une inhibition de la synthèse des MTs aurait été observée.

En effet, après le 15ème jour d'exposition aux différentes concentrations de $CdCl_2$, une diminution significative des concentrations en MTs dans les branchies et la glande digestive des coques a été observée. Cette diminution peut être expliquée par le fait qu'au début du traitement, le Cd est associé à des protéines solubles telles que les MTs, puis il est déplacé vers d'autres tissus ou vers des granules intracellulaires (Roméo et Gnassia-Barelli, 1995). Une deuxième explication qui peut se présenter, c'est que le mécanisme de détoxication a été endommagé par les concentrations élevées en Cd (Giguére et al. 2003). Cette deuxième hypothèse est plutôt valable pour le cas des branchies au niveau desquelles une destruction des lamelles a été montrée par une étude histologique réalisée sur les branchies de *L. elliptica* exposée à 50 µg/l de cadmium durant 14 jours. Cette destruction n'a pas été observée au niveau de la glande digestive (Choi et al. 2007). De même, le facteur demi-vie est à prendre en considération. Chez *C. virginica* la différence de demi-vie entre le Cd (70 jours) et les MTs (4 à 20 jours) (Roesijadi, 1994) pourrait expliquer la relation complexe entre la réponse des MTs à une induction par le cadmium. En effet, si le Cd libéré se lie de nouveau aux MTs nouvellement synthétisées celà va prolonger le temps de son renouvellement. Baudrimont et ses collaborateurs (1999) ont montré que la chute de synthèse des MTs chez *C. fluminea* contaminés par le Cd et le Zn est rapidement suivie par la mortalité de ces animaux. Dix-sept % de mortalité ont été observés chez l'huître exposée durant 21 jours à 200 ng/l de Cd (Géret et Cosson, 2002).

Les MTs ont été identifiées dans la **glande digestive** (Viarengo et al. 1985) et les **branchies** (Roesijadi et Klerks, 1989) des bivalves. Ces deux organes sont parmi les organes essentiels d'accumulation des métaux. La glande digestive agit comme un site de

détoxication des métaux en excès et les branchies comme organe d'excrétion (Rainbow, 1993). Dans cette étude, les concentrations les plus importantes en MTs sont observées dans la glande digestive et non dans les branchies. En effet, les branchies sont en contact direct avec le milieu extérieur et reflètent ainsi une contamination à court terme alors que la glande digestive représente un organe de stockage montrant ainsi une contamination métallique à long terme (Bebianno et al, 2004). Les variations des MTs en fonction du tissu ont été signalées chez plusieurs espèces telles que *R. decussatus* (Smaoui-damak et al. 2004 ; Bebianno et al. 1993), *C. gigas* (Mouneyrac et al. 1998), *M. galloprovincialis* (Mourgaud et al. 2002) etc.

C. glaucum exposée au cadmium montre également une augmentation des **concentrations en protéines** suivie d'une diminution significative après 15 et 20 jours de contamination avec 150 µg/l de $CdCl_2$. Des résultats similaires ont été observés par Géret et Cosson (2002) qui ont montré une augmentation des concentrations en protéines après 4 jours d'exposition au cadmium (200 µg/l) au niveau des branchies, de la glande digestive et du manteau de *M. edulis* suivie d'une diminution après 21 jours de contamination. Ces résultats suggèrent en premier lieu une augmentation de la synthèse protéique pour la fixation du cadmium tel que les MTs, le glutathion et quelques enzymes (superoxyde dismutase, catalase etc.) et l'intensité des perturbations métaboliques causées par le cadmium en second lieu. Dans le cas de notre étude cette perturbation est nettement détectée chez les animaux exposés à une concentration de150µg/l de $CdCl_2$.

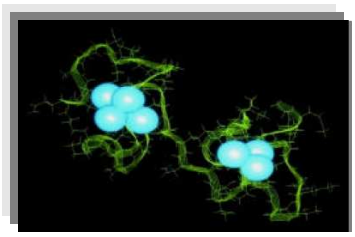
Les ROS, résultant d'une exposition au Cd, altèrent la structure membranaire de la cellule en stimulant la **peroxydation lipidique** (Harris, 1992 ; Stohs et al. 2000). Le malonedialdéhyde est un produit secondaire de cette peroxydation. Dans cette étude, les concentrations en **MDA** ont été déterminées dans la glande digestive qui représente un organe de stockage métallique à long terme contrairement aux branchies (Amiard et al. 1989). Dans la glande digestive de *C. glaucum*, les concentrations en MDA augmentent avec la concentration métallique. Des résultats similaires ont été observés chez d'autres bivalves tels que *M. edulis* exposée durant 21 jours au cadmium (Géret et al. 2002 a) et *P. grandis* exposée à une contamination métallique dans son milieu naturel (Giguère et al. 2003). Cette augmentation peut être expliquée par le fait qu'en se fixant aux MTs et au glutathion le cadmium inhibe leur rôle d'antioxydant (Christy et Costa, 1984) ou encore en se substituant avec les métaux essentiels (Cu, Zn), le cadmium peut changer la

conformation des enzymes antioxydantes et affecter leur activité (Hamilton et Mehrle, 1986). Néanmoins, ce type de réponse ne peut être généralisé. Bonneries et ses collaborateurs (2005) ont observé une diminution des concentrations en MDA avec l'augmentation des concentrations en Cd et en MTs. Cette diminution peut être le résultat d'une intensification de production d'antioxydants tels que la MT. Ce phénomène n'a pas été observé chez *C. glaucum*.

Les fortes perturbations métaboliques causées par le cadmium chez *C. glaucum* ont été aussi détectées par la diminution de la **LT50** chez les animaux contaminés. En effet, le test de stress on stress a montré que les coques ont souffert de l'addition de contamination par le cadmium et l'anoxie. Les mêmes résultats on été observés chez *R. decussatus* (Hamza-Chaffai et al. 1998), *M. galloprovincialis* (Viarengo et al. 1995) et *M. trossulus* (Veldhuisen-Tsoerken et al. 1991). Ces derniers travaux ont montré qu'une exposition aux polluants provoque une diminution de la tolérance des organismes à l'anoxie. De ce fait, le test de stress on stress a été utilisé dans ce chapitre comme indicateur d'évaluation de « l'état de santé » des organismes. En plus, il s'agit d'une méthode simple, rapide et non couteuse.

Dans cette étude les variations des concentrations en Cd, MTs, MDA et protéines suite à une exposition à différentes concentrations de $CdCl_2$ et durant des périodes différentes chez la coque *C. glaucum* ont été déterminés pour la première fois.

Les résultats ont montré (i) l'induction de la synthèse de métallothionéines chez les coques exposées au cadmium, ce qui confirme des travaux antérieurs sur *R. decussatus* (Bebianno et al. 1993), *M. edulis* (Bebianno et Langston, 1991) et *M. galloprovincialis* (Bebianno et Langston, 1991), (ii) Les concentrations les plus importantes de MTs ont été enregistrées pour 50 µg $CdCl_2$/l après 15 jours suivie par 150 µg $CdCl_2$/l après 10 jours, donc on peut considérer que ce sont les meilleures conditions pour l'induction de la synthèse de MTs chez *C. glaucum*. Cependant, en se basant sur les résultats obtenus par le dosage des protéines et du MDA ainsi que les résultats de test de stress on stress, il s'est avéré que la concentration 150 µg $CdCl_2$/l cause de fortes perturbations métaboliques chez l'espèce étudiée. Cette concentration ne sera donc pas retenue pour les futures expériences ayant pour but l'induction de synthèse des MTs chez *C. glaucum*.



Chapitre III

Clonage et caractérisation d'ADNc de métallothioneine chez deux bivalves Méditerranéens: Ruditapes decussatus et Cerastoderma glaucum

Article : LADHAR-CHAABOUNI R, *GARGOURI- MOKDAD R, DENIS F and 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, DOI 10.1007/s11033-008-9274-8.*

A. Introduction

Certains métaux sont considérés comme toxiques, d'autres par contre sont considérés comme essentiels. En ce qui concerne les métaux dits toxiques tels que le cadmium aucune fonction biologique n'a été démontrée. Ils sont en général toxiques lorsque leur concentration dépasse un seuil physiologique toléré. L'association avec des ligands solubles spécifiques comme les métallothionéines permet aux invertébrés aquatiques de réguler leur teneur intracellulaire en métaux et éventuellement de neutraliser les métaux toxiques. Cette propriété des MTs est mise à profit pour estimer les effets de pollution par les métaux lourds. Ainsi, Les MTs ont été proposées comme des biomarqueurs potentiels d'exposition aux métaux. Compte tenu de l'évolution croissante des techniques permettant la quantification des métallothionéines, l'utilisation de techniques de la biologie moléculaire pour la détection et la quantification de l'expression des gènes codant pour les MTs est en plein développement puisqu'il s'agit d'une méthode nettement plus sensible que celles utilisées pour la quantification de la protéine (Cosson et Amiard, 1998). Pour cela il faut disposer d'une sonde nucléique. Les séquences nucléotidiques codant pour les MTs sont bien connues chez les vertébrés, mammifères et poissons (Bargelloni et al. 1999 ; Bonham et al. 1987 ; Kille et al. 1991 ; Mbikay et al. 1981). En ce qui concerne les invertébrés et plus précisément les mollusques bivalves, les séquences d'ADNc des MTs ont été isolées pour *M. edulis* (Barsyte et al. 1999), *C. gigas* (Tanguy et al. 2001) *L. elliptica* (Park et al. 2007), *B. thermophilus* et *B. azoricus* (Hardivillier, 2005) etc. En revanche aucune séquence d'ADNc codant pour la MT n'a été isolée pour *C. glaucum* et seule une séquence de 176 pb a été déterminée pour *R. decussatus* (numéro d'accession à GenBank : **AJ249687**) et qui n'a pas été publiée. Dans cette étude deux séquences partielles d'ADNc codant pour la MT ont été isolées afin de pouvoir les utiliser comme sonde pour quantifier l'expression des gènes MT chez *C. glaucum* et *R. decussatus*. Cette quantification réalisée au niveau de ces deux organismes bioindicateurs et largement répartis dans le golfe de Gabès, représente un outil adéquat pour estimer l'impact des métaux sur cet écosystème.

B. Matériels et méthodes

1. L'expérience de contamination

R. decussatus et *C. glaucum* ont été collectées dans la station de Mahrès. Les bivalves ont été exposés à des concentrations de 100 µg $CdCl_2$/l durant 20 jours et 50 µg $CdCl_2$/l durant 15 jours, respectivement.

Le choix des conditions de contamination de *R. decussatus* a été basé sur les résultats des études faites par Bebianno et Serafim (1998) et par Ladhar-Chaabouni et ses collaborateurs (2007). Pour *C. glaucum*, le choix a été basé sur les résultats obtenus par l'étude préliminaire précédemment réalisée. Les bivalves ont été nourris, l'eau et le contaminant ont été renouvelés 2 fois par semaine.

2. Extraction des ARN totaux

Les ARNs sont extraits à partir de branchies des palourdes et des coques contaminés et témoins et le manteau, le muscle adducteur et le pied de ces bivalves contaminés. La méthode d'extraction que nous avons utilisé, suit le protocole décrit dans le RNAgents® Total RNA Isolation System kit (Promega) et qui consiste à :

- Broyer 250 mg de tissu dans l'azote liquide en utilisant un broyeur de « Potter ».
- Ajouter 6 ml de la solution de dénaturation.
- Transférer le mélange dans un tube falcon (50 ml) stérile.
- Ajouter 300 µl d'acétate de sodium (2 M, pH 4) et homogénéiser en inversant le tube 4 ou 5 fois.
- Ajouter 3 ml du mélange phénol, chloroforme et alcool isoamylique, agiter vigoureusement pendant 10 secondes et garder 15 min dans la glace.
- Transfèrer le mélange dans des tubes de 2 ml stériles et centrifuger durant 20 min a 10000 g et à 4°C.
- Récupérer la phase aqueuse contenant l'ARN, ajouter un volume équivalent d'isopropanol et laisser à -20°C durant 30 min.
- Centrifuger durant 10 min a 10000 g et a 4°C.
- Laver le culot obtenu avec 2 ml d'éthanol (75%) et centrifuger pendant 10 min à 10000 g et à 4°C.
- Dissoudre l'ARN dans de l'eau traitée au DEPC et conserver à -80°C.

- La quantification est réalisée par spectrophotométrie. On estime qu'une unité de DO (260 nm) correspond à une solution dont la concentration est égale à 40 µg ml^{-1} d'ARN.

3. Purification des ARN méssagers

Afin d'éliminer les ARN ribosomaux et de concentrer les ARN messagers, une purification des ARN totaux a été réalisée en utilisant le protocole décrit dans Quick Prep micro mRNA purification Kit (Amersham) :

- Ajouter 370 µl « sample buffer » au 30 µg d'ARN.
- Prendre 1ml de la solution d'oligo dT, centrifuger pendant 1 min et récupérer le culot auquel on ajoute l'ARN dissout.
- Agiter durant 3 min et centrifuger pendant 10 sec.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter au culot 1 ml de « high salt buffer », agiter, centrifuger durant 1 min et éliminer le surnageant. Répéter 5 fois.
- Ajouter 1ml de « low salt buffer », agiter, centrifuger durant 1 min et éliminer le surnagent. Répéter 2 fois.
- Resuspendre le culot dans 0,3 ml de low salt buffer et le transférer dans une colonne.
- Centrifuger durant 5 sec.
- Laver la colonne avec 0,5 ml de « low salt buffer ». Répéter 3 fois.
- Eluer l'ARN avec 20 µl d'eau stérile et conserver à -80°C

4. Transcription inverse (RT)

La synthèse de l'ADNc à partir de l'ARNm est réalisée suivant le protocole décrit dans M-MLV Reverse Transcriptase Kit (promega) :

- Ajouter 0,5 µg d'oligo dT à 0,2 µg d'ARN et ajuster le volume à 13 µl par de l'eau stérile.
- Dénaturer les ARN à 75°C durant 5 min, puis les mettre immédiatement dans la glace.
- Ajouter 5 µl de M-MLV 5 x Reaction Buffer, 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl de Recombinant RNasin® Ribonuclease inhibitor, 1 µl de M-MLV RT et 4 µl d'eau stérile.
- Incuber 60 min à 37°C.

- Arrêter la réaction par incubation à 70°C durant 5 min pour dénaturer l'enzyme.

Les ARNm sont utilisés comme matrice par la reverse transcriptase pour synthétiser le premier brin d'ADNc. Cette synthèse est amorcée à partir de l'extrémité 3' terminale des messagers par hybridation entre les séquences polyadénylées et les oligo dT utilisés.

5. PCR (Polymerase Chain Reaction)

La technique de réaction de polymérisation en chaîne ou PCR que nous avons utilisé suit le protocole décrit dans Go Taq DNA polymerase Kit (Promega). Cette technique permet d'amplifier une séquence particulière d'ADN. Des séquences oligonucléotidiques complémentaires des extrémités 3' des deux brins du fragment d'ADN à amplifier sont utilisées comme amorces pour la synthèse d'ADN en présence de l'ADN polymérase.

Mélange de réaction :

5 µl de matrice ADNc
10 µl de tampon
1 µl dNTP (10 mM)
2,5 µl de l'amorce 1 (20 pmoles/µl)
2,5 µl de l'amorce 2 (20 pmoles/µl)
0,5 µl de Taq polymérase (Promega)
28,5 µl d'eau stérile

Programme utilisé

Les étapes d'amplification sont constituées d'une dénaturation de 1 min à 94°C, d'une hybridation de 1 min et d'une élongation de 1 min à 72°C. Cinquante cycles d'amplification sont effectués par PCR.

Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	T° d'hybridation
Amorces spécifiques des gènes MTs (Hardivillier, 2005)		
MT1 :	CCWTGYAAYTGYRTYGA	47°C
MT2 :	Oligo dT	
Amorces spécifiques du gène ribosomique 18S (Nygren et Sundberg, 2003)		
18S1 :	AYCTGGTTGATCCTGCCAGT	60°C
18S2 :	TASGACGGTATCTGATCGTCTT	

Tableau III.1. Liste des oligonucléotides utilisés lors des réactions de PCR.

6. Extraction de fragments d'ADN de gels d'agarose

Les fragments d'ADN séparés par électrophorèse sont extraits du gel d'agarose en utilisant le Kit d'extraction WIZARD SV Gel and PCR clean up system (Promega). Ce Kit permet de purifier des fragments de tailles comprises entre 100 pb et 10 Kpb. L'ADN est ensuite élué des colonnes par 20 µl d'eau stérile et stocké à -20°C.

7. Clonage de fragments d'ADN

Les bandes obtenues au terme d'amplification par PCR, récupérés après purification sont clonées dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega) (Fig. III. 1). Le volume réactionnel de ligation est composé de 5 µl de tampon de réaction (2x), 1 µl du vecteur pGEM-T easy (25 ng), 1 µl de T4 ligase (1 unité) et 3 µl de fragment d'ADN purifié. Le milieu réactionnel est incubé une nuit à 16°C.

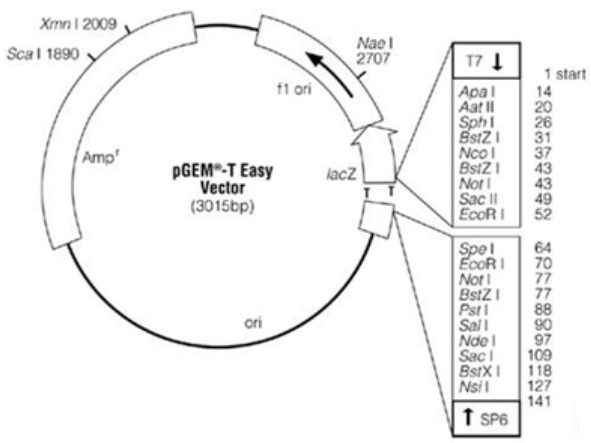


Figure III.1. Carte de restriction du plasmide pGEMT

8. Transformation bactérienne

Préparation des cellules compétentes

- Inoculer 50 ml de LB par 0,5 ml d'une préculture bactérienne (phase stationnaire).
- Incuber à 37° C avec agitation jusqu'à une D.O de l'ordre de 0,3 à 0,6 à 600 nm.
- Refroidir l'erlen dans la glace puis centrifuger 10 min à 500 rpm et à 4°C.
- Eliminer le surnageant et ajouter 15 ml de tampon $CaCl_2$- MOPS froid.
- Incuber 20 min dans la glace et centrifuger dans les mêmes conditions que précédemment.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 2 ml de $CaCl_2$-MOPS.

- Etaler quelques µl sur une boite LBA pour contrôler la qualité de la préparation (contamination, clones résistantes, etc).
- Conserver le reste en aliquotes de 200 µl contenant 20% de glycérol à – 70° C.

Transformation

- Ajouter à 200 µl de cellules compétentes, 3 µl du mélange de la ligation et incuber 20 min dans la glace.
- Effectuer un choc thermique à 42° C pendant 2 min.
- Remettre dans la glace durant 5 min.
- Ajouter 1 ml LB et incuber à 37° C durant 1h.
- Ajouter 2 µl IPTG (inducteur du gène lacZ) et 40 µl Xgal (substrat utilisé par la β galactosidase codée par le gène LacZ).
- Etaler sur boite LBA et incuber à 37° C durant toute la nuit.

9. Extraction de l'ADN plasmidique

Après la transformation d'*E.coli* ; les colonies de coloration blanche qui apparaissent ont été récupérées chacune dans 2 ml LBA et incubées à 37° C durant toute la nuit. Récupérer 1,5 ml du mélange précédent et centrifuger pendant 4 min. Ajouter au culot obtenu 100 µl de la solution I (annexe V), vortexer, puis ajouter 200 µl de la solution II (annexe V), agiter et ajouter 150 µl de la solution III (annexe V). Agiter et laisser 5 min à température ambiante. Centrifuger pendant 10 min, on récupère le surnageant auquel on ajoute 450 µl d'isopropanol. Incuber pendant 5 min à température ambiante et centrifuger durant 15 min. Le culot est repris dans 500 µl d'éthanol 70% pour éliminer l'excès de sel. Après centrifugation de 5 min et séchage du culot, ce dernier est dissous dans 50 µl d'eau stérile. Une aliquot (5µl) est analysée sur gel d'agarose 1% pour visualiser les ADNs recombinants.

10.Séquençage automatique

Le séquençage d'un ADN consiste en la détermination de la succession des nucléotides qui le composent. Le séquençage a été réalisé grâce à un séquenceur automatique (ABI PRISM 3100 AVANT) capable de faire les réactions de séquence et de lire les résultats. Cette méthode requiert l'utilisation des nucléotides fluorescents marqués par 4 fluorochromes différents. Une fois la réaction de séquence est terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur détecte la

fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Le résultat est présenté par la machine sous forme de courbes représentant la fluorescence détectée, à chaque marqueur correspond une couleur de courbe (rouge pour T, vert pour A, bleu pour C et noir pour G).

Les réactions de séquences sont réalisées en microplaques de 96 puits sur thermocycleur (Perkin Elmer) dans un volume final de 20 µl contenant le produit de PCR traité (10 ng), 2 µl du tampon de l'enzyme « Big Dye », 4 µl d'un « mix » (enzyme, dNTP, ddNTP marqués) et on complète avec l'eau désionisée.

Le programme de la réaction comporte 25 cycles : 10 sec de dénaturation à 96°C, 5 sec d'hybridation à 50°C et 4 min d'élongation à 60°C. Les produits sont précipités en présence de 2 µl d'une solution d'acétate de sodium 1,5 mM, d'EDTA 250 mM pH 8 et 45 µl d'éthanol 100% froid. Après agitation, les produits sont gardés pendant 15 min à 4°C avant d'être centrifugés, à froid, à 4000g pendant 25 min. Le culot récupéré est lavé par l'éthanol 70% avant d'être resuspendu dans 2 µl de tampon formamide (Kit Amersham). La séparation est effectuée sur un polymère (3100 POP 6 : Performed Optimised Polymer, Applied Biosystem) placé dans un séquenceur automatique (ABI PRISM 3100 AVANT) (Fig III. 2 et III. 3).



Figure III.2. Séquenceur automatique

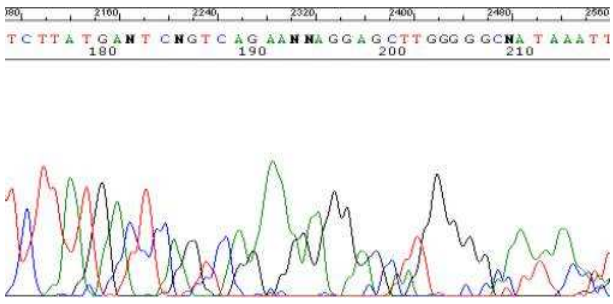


Figure III.3. Séquences obtenues par le séquenceur automatique

11.Dot Blot

- Transfert de l'ARN sur membrane de nitrocellulose (N+)

L'ARN (5µg) est dénaturé pendant 15 min à 55°C dans une solution de dénaturation (50% formamide, 7% formaldéhyde, 1x SSC) puis placé immédiatement dans la glace. L'appareil permet le dépôt de ces ARN sur une membrane de nylon N+ (Amersham). Les puits sont rincés au préalable deux fois avec une solution de 10x SSC traitée au DEPC. Après le dépôt des ARNs, les puits sont soumis à une aspiration sous vide. La membrane est séchée à température ambiante puis mise sous UV ce qui permet de fixer les ARNs.

- Préparation de la sonde radioactive

Préparer le mélange réactionnel suivant :

- 5 µl de d'ADN purifié et obtenu par RT-PCR.
- 40 µl TE.
- Chauffer à 100° C pendant 5 min puis refroidir rapidement.
- Mélanger l'ensemble avec le contenu du tube fourni dans le Kit RediprimeII (Amersham- Pharmacia) et contenant les nucléotides, la polymérase et le tampon puis ajouter 2 µl [α^{32}P] dCTP (20 µCi).
- Incuber 1h à 37°C.
- Préparer une colonne de Séphadex G50, centrifuger 3 min à 2000 rpm, répéter cette opération 2 fois jusqu'à entassement, puis déposer le mélange réactionnel et centrifuger dans les mêmes conditions. Récupérer l'ADN marqué, dénaturer 5 min à 100°C et mettre dans la glace pour l'utiliser ultérieurement.

- Hybridation

La membrane N+ est mise dans une bouteille d'hybridation contenant 20 ml du tampon de préhybridation pendant 2h à 42°C dans un four « Hybaid ». Par la suite, la solution de préhybridation est remplacée par la solution d'hybridation ayant la même composition contenant en plus la sonde préalablement dénaturée 5 min à 100°C. L'hybridation est faite pendant une nuit à 42°C.

- Lavage et Exposition
  - Laver 3x pendant 5 min à température ambiante dans 20 à 40 ml de solution de lavage (2x SSC, 0.1% SDS).
  - Laver 2x pendant 15 min à 42°C dans le même tampon de lavage.
  - La membrane N+ est mise au contact d'un film (RX) et l'exposition est faite à –80°C pendant une durée variable en fonction de l'intensité de la réponse recherchée.
  - Les membranes sont analysées grâce à un Instant Imager (BIORAD) qui sert à évaluer par comptage de la radioactivité contenue dans chaque spot d'hybridation
  - Les membranes hybridées par la sonde d'ADNc de métallothionéine, sont ensuite déshybridées par une incubation de 30 min dans de l'eau bouillante pour être réhybridées par la sonde d'ADNc de 18S.
  - Les valeurs (unité de radioactivité) caractérisant les ARNm MT sont rapportées à une unité de radioactivité obtenue pour 18S. C'est le rapport valeur ARNm MT / valeur 18S qui sera utilisé comme indicateur du niveau ou de la concentration en transcrits pour la MT.

12.Analyse statistique

Les résultats obtenus par l'Istant Imager ont été présentés par une moyenne ±ecart type. Le test de student a été choisi pour la comparaison des moyennes en utilisant le programme Excel. Les différences sont significatives à $p<0,05$

13.Outils d'analyses bioinformatiques

a. Les Banques de séquences nucléiques

La banque de données consultée au cours de cette étude est GenBank (http:/www.ncbi.nlm.nih.gov) (Bethesda, Etats-Unis).

b. Les programmes bioinformatiques de traitement des séquences nucleiques

La recherche de similitudes entre les séquences nucleiques dans une banque de données est réalisée par le biais d'un Blast (Basic Local Alignment Search Tool). Le site NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) permet l'utilisation de cette application en accès libre. Les alignements de séquences sont traités avec un logiciel d'édition de séquences comme BioEdit (v5).

C. Résultats

1. Isolement du 18S chez *R. decussatus*

Le couple d'amorces 18S1/18S2 a été utilisé pour réaliser une RT-PCR à partir d'ARN totaux extraits de branchies de *R. decussatus*. Une séquence d'ADNc ayant une longueur de 379 pb a été clonée et déposée dans la banque génomique (numéro d'accession à GenBank : **FJ617208**).

2. Amplification de deux séquences partielles d'ADNc codant pour la MT

En essayant d'isoler le gène codant pour la MT chez *R. decussatus* et *C. glaucum* contaminés par le cadmium, différentes amorces ont été utilisées (tableau III. 2) mais aucune séquence d'ADNc MT n'a été amplifiée. En utilisant les deux oligonucléotides MT1 et MT2 (tableau III. 1), deux séquences partielles d'ADNc de 480 pb pour *R. decussatus* (Rd MT) (numéro d'accession à GenBank : **EU000310**) et *C. glaucum* (Cg MT) (numéro d'accession à GenBank : **EU518714**) (Fig. III. 4 ; III. 5 et III. 6) ont été amplifiées. Le séquençage a révélé la présence de motif C-X-C (Fig. III. 7). Les deux séquences d'ADNc codant pour la MT nommées Rd MT et Cg MT contiennent une séquence codante de 219 pb et une séquence 3' non codante de 261 pb. Dix neuf différences ont été observées dans les séquences nucléotidiques dont la plupart sont localisées au niveau de la région non codante. Ces différences aboutissent à deux séquences protéiques différentes. Ces protéines sont composées de 72 acides aminés comprenant 21 cystéines organisées suivant le motif suivant : 9 Cys-X-Cys, 1 Cys-X-X-Cys et 7 Cys-X_3-Cys. Les deux séquences protéiques diffèrent par le remplacement de Gln par Pro en position 59 et de Ser par Gly en position 66 (Fig. III. 7). La comparaison entre les séquences protéiques de MT déterminées dans ce travail avec celles d'autres bivalves (Fig. III. 8) disponibles dans les banques de données a révélé en plus de la grande conservation au niveau des positions des résidus de cystéine, une teneur assez importante en glycine. En revanche, un grand nombre de lysine a été détecté au niveau de la MT de *Meretrix lusoria* (9 résidus de lysine) par rapport aux autres MT (2-6 résidus de lysine) (Fig III. 8). Le tableau III. 3 a montré que la MT de *C. gigas* (numéro d'accession : **CAC82788**) possède le pourcentage d'homologie le plus important avec celle de *R. decussatus* (97,2% de similarité) et de *C. galucum* (91,9% de similarité).

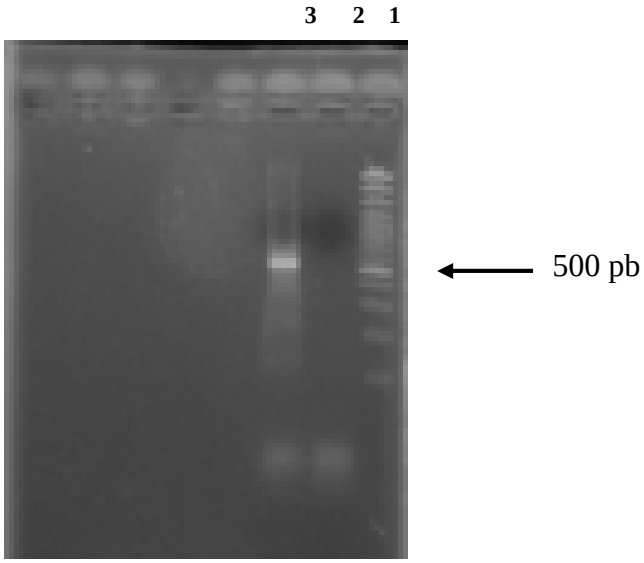


Figure III.4. Analyse des produits de PCR par d'électrophorèse d'ADN MT de *Ruditapes decussatus* (ligne 1= marqueur de taille = ADN du phage λ digéré par Hind III, ligne 2 = témoin négatif, ligne 3= Rd MT)

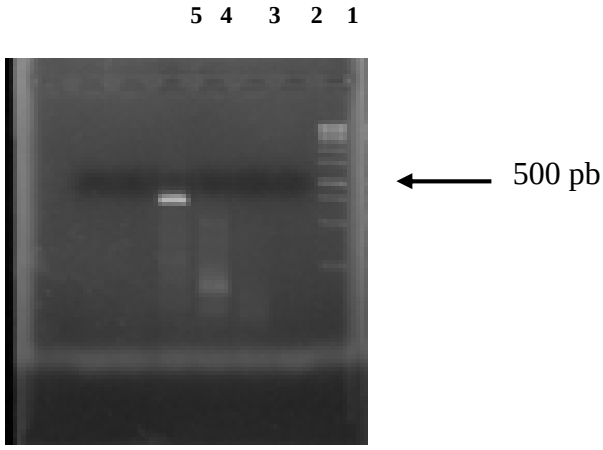


Figure III.5. Analyse des produits de PCR par d'électrophorèse d'ADN MT de *Cerastoderma glaucum* amplifié par PCR (ligne 1= marqueur de taille = ADN du phage λ digéré par Hind III, ligne 4= témoin négatif, ligne 5 = Cg MT).

Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	Référence
MTF	GTATTGAGACTGGAACATGTGTCTGCTCTT	Séquences déterminées à partir d'une séquence partielle d'ADNc MT de *R. decussatus* disponible dans les banques génomiques (numéro d'accession à GenBank : **AJ249687**)
MTR	GGCCCGGTGCACCCTTTTCCACAACCACAA	
MTS1	CC(AGCT)TG(CT)AA(CT)TG(CT)AT(ACT)GA(AG)AC	Séquences dégénérées déterminées à partir d'une séquence protéique partielle de métallothionéine de *R. decussatus* (Simes et al. 2003)
MTS2	CA(AGCT)CC(AGCT)(GC)(AT)(CT)TC(AG)CA(CT)TT(AG)CA	

Tableau III.2 . Liste des oligonucléotides qu'on a utilisé lors des réactions de PCR et qui n'ont pas permis une amplification d'ADNc MT chez *R. decussatus* et *C. glaucum*.

```
Rd          ATTCCATGCA ATTGTGTTGA AACTGGAAGC TGCCAGTGCT CTGCTCAATG
Cg          ATTCCTTGCA ATTGTGTTGA AACTGGAAGC TGCCAGTGCT CTGCTCAATG
            ***** **** ********** ********** ********** **********
Rd          TACTAGCGAA GGTGGCTGCA AATGTGGACC AAACTGCAAG TGTGGTGACG
Cg          TACTAGCGAA GGTGGCTGCA AATGTGGACC AAACTGCAAG TGTGGTGACG
            ********** ********** ********** ********** **********
Rd          GATGCGCTTG TCCCGGTTGT AAAGTCGTCT GTAACTGTAA TGGTTCATGT
Cg          GATGCGCTTG TCCCGGTTGT AAAGTCGTCT GTAACTGTAA TGGTTCATGT
            ********** ********** ********** ********** **********
Rd          GCCTGTGGAC AAGACTGCAC TGGACAAAGC ACGTGCAAAT GTGGTAGTGA
Cg          GCCTGTGGAC AAGACTGCAC GGGACCAAGC ACGTGCAAAT GTGGTGGTGA
            ********** **********  **** **** ********** ***** ****
Rd          TTGCTCATGC AAAAAGTGAT GGGATGATGT CACGTGGTTT CAACGATTTG
Cg          TTGCTCATGC AAAAAGTGAT GGGGTGATGT CACGTGGTTT CAACGATTTG
            ********** ********** *** ****** ********** **********
Rd          CGCGGACTTG GATCCTAATT TCATGTAACC ACTTGCCAAG ATTTCCCATA
```

```
Cg          CGCGGACTTG GATCCTAATT TCATGTAACC ACTTGCCAAG ATTTCCCATA
            ********** ********** ********** ********** **********
Rd          CACCGCTGCA AATCCTCAGA TCAGAGATGG TGGTTTCATA ATTTCCACCA
Cg          CACCGCTGCA AATCCTCAGA TCAGAGATGG TGGTTCCATA ATTTCCACCA
            ********** ********** ********** ***** **** **********
Rd          AATAACATTT CAAAAAGACA CATGTCTTTA CTTAAATCTC GAAACCGCGT
Cg          AATAACATTT CAAGAAGACA CATGTCTTTA CTTAAATCTC GAAACCGCGT
            ********** *** ****** ********** ********** **********
Rd          GACATATTAA AATTGTTCAA A-AACATTTA TTTTCGTTAT CAGCCTTCGG
Cg          GACATATTAA AATTGTTCAA ATAACATTTA TATTC-TGAT CAGCCTTCAG
            ********** ********** * ******** * *** * ** ******** *
Rd          AATAAATTTC ATTATGATCT AAAAAAAAAA
Cg          AATAAATATC AATTAGAATC AAAAAAAAAA
            ******* ** * *  **    **********
```

Figure III.6. Alignement des séquences nucléotidiques d'ADNc MT de *Ruditapes decussatus* (Rd) et *C. glaucum* (Cg). L'amorce sens est soulignée. Le codon stop est en gras. Le signal de polyadénylation est en italique.

```
Rd           1 IPCNCVETGSCQCSAQCTSEGGCKCGPNCKCGDGCACPGCKVVCNCNGSC     50
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Cg           1 IPCNCVETGSCQCSAQCTSEGGCKCGPNCKCGDGCACPGCKVVCNCNGSC     50

Rd          51 ACGQDCTGQSTCKCGSDCSCKK     72
               ||||||||.|||||||.||||||
Cg          51 ACGQDCTGPSTCKCGGDCSCKK     72
```

Figure III.7. Alignement des séquences protéiques de métallothionéines de *Ruditapes decussatus* (Rd) et *C. glaucum* (Cg). Le motif caractéristique des mollusques est en gras (Binz et Kagi, 1999).

```
Rd          --IPCNCVETG-SCQCSAQ--CTSEGGCKCGPNCKC-GDGCACPGCKVVCNCNGSCACGQ 54
Cg          --IPCNCVETG-SCQCSAQ--CTSEGGCKCGPNCKC-GDGCACPGCKVVCNCNGSCACGQ 54
Crg         MSDPCNCAETG-SCQCSAQ--CTSEGGCKCGPNCKC-GDGCACPGCKVVCNCNGSCACGQ 56
Rp          MSDPCDCAETG-SCQCSAQ--CTSEGGCKCGPNCKC-GDGCACPGCKVVCNCNGSCACGQ 56
Me          MPAPCNCIETN-VCICDTG--CSGEG-CCCGDACKCSGADCKCSGCKVVCKCSGSCACGK 56
Ce          MSDPCDCAQTGGDCKCAAGNCCSSDTPCRCGSGCGC-GSECTCH---VKCTCSGSCACGN 56
               **:* :*.  * * :   *:.:  * **  * * *  * *    * *.*.******:

Rd          DCTGQSTCKCGSDCSCKK 72
Cg          DCTGPSTCKCGGDCSCKK 72
Crg         DCTGQSTCKCGSDCSCKK 74
Rp          DCTGPETCKC-------- 66
Me          GCTGPSTCKCAPGCSCK- 73
Ce          NCTGPANCTCGAGCSCQ- 73
            .***  .*.*
```

Figure III.8. Comparaison des séquences protéiques de MTs de *Ruditapes decussatus* (Rd) et *C. glaucum* (Cg) avec celles issues d'autres espèces. Les numéros d'accession de ces protéines sont les suivants: *C. gigas* (crg) (GenBank. **CAC 82788**), *R. philippinarum* (Rp) (GenBank. **ABP57063**), *M. edulis* (Me) (GenBank. **ABM30214**) et *C. edule* (Ce) (GenBank. **ABP57066**). Les residus Cystéine sont en gras. La séquence caractéristique des mollusques est soulignée.

	R. decussatus (GenBank accession no. **EU000310**)	*C. glaucum* (GenBank accession no. **EU518714**)
C. gigas (GenBank accession no. **CAC82788**)	97. 2%	91.9%
R. philippinarum (GenBank accession no. **ABP57063**)	79.7%	81.1%
M. lusoria (GenBank accession no. **AAS92877**)	68.8%	70.1%
D. polymorpha (GenBank accession no. **Q94550**)	54.4%	54.4%
C. edule (GenBank accession no. **ABP57066**)	46.8%	48.1%

Tableau III.3 . Le pourcentage de similarité entre les sequences protéiques des MTs de *R. descussatus* et *C. glaucum* et celles des MTs de *C. gigas*, *R. philippinarum*, *M. lusoria*, *D. polymorpha* et *C. edule*.

3. Expression de MT dans différents tissus

Par des expériences de Dot blot en utilisant la sonde Rd MT, nous avons comparé les niveaux relatifs en ARNm dans quatre tissus : branchies (Br), manteau (MA), pied (P) et muscle adducteur (Ma) de *R. decussatus* et *C. glaucum* contaminés par le cadmium. La radioactivité contenue dans chacun des puits est quantifiée à l'aide d'Instant Imager. Le niveau d'intensité des signaux d'ARNm varie en fonction du tissu étudié. L'intensité du signal observée suit l'ordre décroissant suivant : Br > MA > P = Ma (Fig. III. 9 ; III.10).

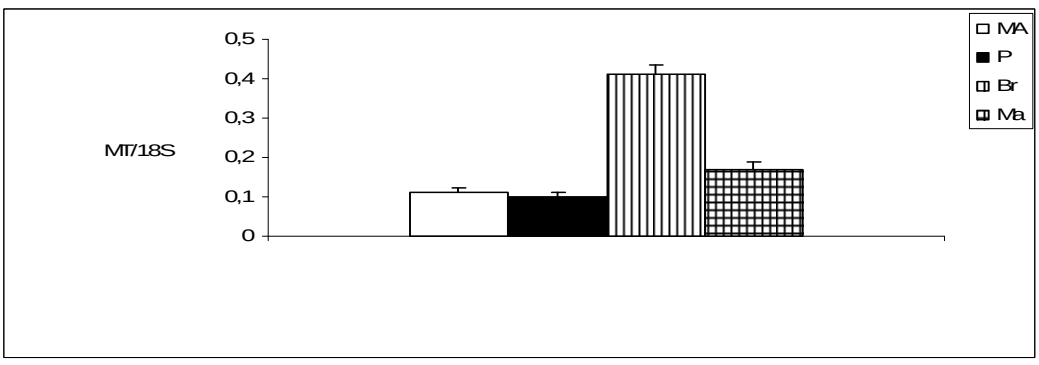


Figure III.9. Taux d'ARNm MT normalisés par les niveaux d'ARN 18S (MT/18S) au niveau des tissus de *R. decussatus*. Les données représentent la moyenne ± S.D. avec n=3.

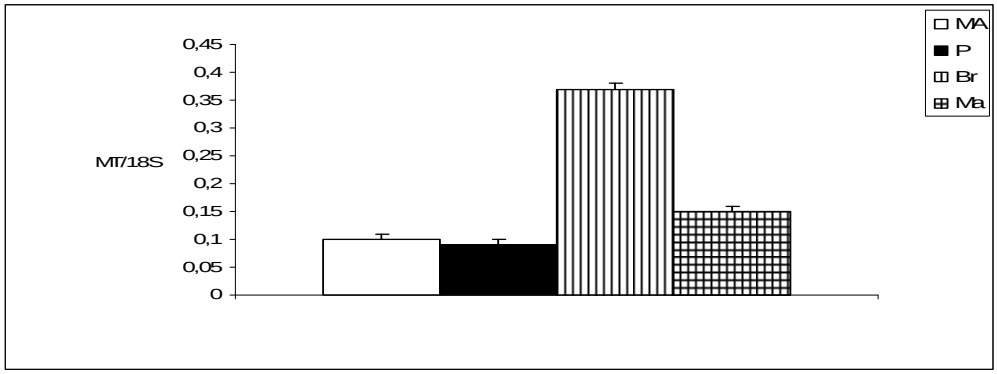


Figure III.10. Taux d'ARNm MT normalisés par les niveaux d'ARN 18S (MT/18S) au niveau des tissus de *C. glaucum*. Les données représentent la moyenne ± S.D. avec n=3.

4. Expression du gène MT chez *R. decussatus* exposés au cadmium par rapport aux témoins

L'effet inducteur de cadmium sur la transcription de gène MT a été démontré chez *R. decussatus*. L'intoxication par le cadmium entraîne une augmentation des niveaux en ARNm MT. Dans les branchies, après une exposition au cadmium, la comparaison des niveaux observés avec ceux des témoins montre que le niveau des ARNm MT est multiplié par 4 (Fig. III. 11).

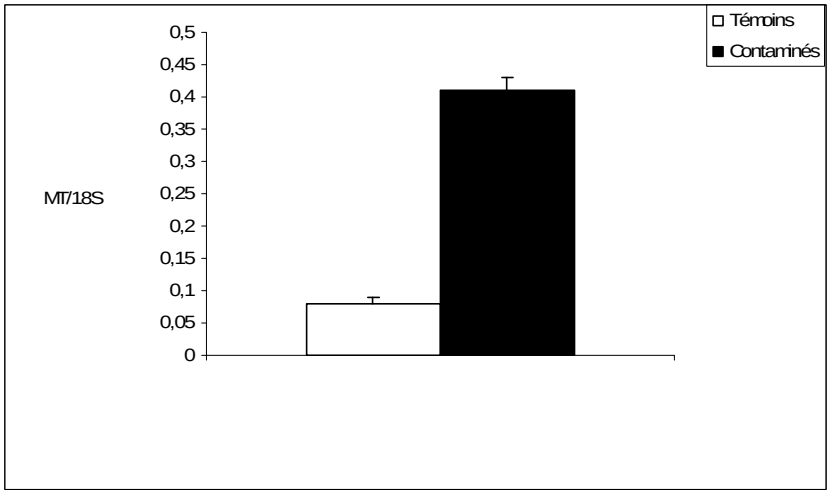


Figure III.11. Taux d'ARNm MT normalisés par les niveaux d'ARN 18S (MT/18S) au niveau des branchies de *R. decussatus*. Les données représentent la moyenne ± ecart type avec n=3.

D. Discussion

Depuis 1960, plusieurs études ont montré le rôle des **métallothionéines** dans la détoxication et la régulation intracellulaire des métaux (Roesijadi et al. 1997; Isani et al.

2000 ; Sato et Kondoh, 2002). **Le clonage de gènes MTs** impliquées dans le mécanisme adaptatif des cellules dans la protection contre une toxicité causée par les métaux lourds, constitue une première étape dans le développement des marqueurs moléculaires (Tanguy et al. 2001). Dans ce travail, le **clonage de deux séquences partielles d'ADNc codant pour la MT et la détermination de leurs séquences protéiques correspondantes chez *C. glaucum* et *R. decussatus* ont été réalisés pour la première fois**. En effet, aucune séquence d'ADNc codant pour la MT chez les deux espèces étudiées n'a été publiée. En comparant les séquences protéiques obtenues avec d'autres séquences MT de mollusques, on a remarqué la présence d'une grande similarité avec une richesse en Cys, absence des acides aminés aromatiques , la présence de motif spécifique de mollusques Cys-X-Cys-X-X-X-Cys-Thr-Gly-X-X-X-Cys-X-Cys-X(n)-Cys-X-Cys-Lys décrit par Binz et Kagi (1999) caractérisant la première classe et la deuxième famille des MTs des mollusques (Fig III. 8) et une teneur assez importante en glycine. En effet, les MTs des mollusques sont aussi caractérisées par la présence d'un nombre important de glycine (≈15% chez les moules) (Dallinger et al. 1993 ; Simes et al. 2003). Néanmoins, le nombre de résidus de lysine déterminé chez Rd MT et Cg MT (8,33%) est moins important que celui des MTs de *M. lusoria* (11,84%) (Chang et al. 2007) et *L. elliptica* (11%) (Park et al. 2007) et plus important que celui des MTs des moules (6,8%) (Park et al. 2007). Pan et ses collaborateurs (1994) ont montré qu'une substitution de 3 résidus de lysine par du glutamate au niveau du motif CK des MTs a pour conséquence de modifier la capacité des MTs à se lier aux métaux. Ces résultats montrent que les résidus de lysine n'ont pas un rôle crucial au niveau du maintien de la structure des MTs mais ils peuvent jouer un rôle au niveau de la stabilité de la liaison entre la MT et les métaux.

Au niveau des séquences protéiques de MT de *R. decussatus* et *C. glaucum*, l'absence de motif Cys-Cys a été notée. Chez les mammifères la MT est constituée de 11 résidus de Cys organisés en Cys-X-Cys et Cys-Cys formant le domaine α, alors que le domaine β est constitué par 9 résidus de Cys organisés en Cys-X-Cys uniquement (Kagi et Kojima, 1987). En se basant sur le nombre de cystéine, on peut suggérer que les domaines α et β sont présents chez Rd MT et Cg MT. Cependant, l'absence de motif Cys-Cys peut avoir des effets sur la capacité des MTs à détoxiquer les métaux bivalents dans les organismes (Tanguy et al. 2001).

Les séquences 3' non codantes de RdMT et CgMT ont été caractérisées pour la première fois dans cette étude. Elles possèdent une longueur de 261 pb. Ces séquences sont plus longues que celles observées chez d'autres bivalves tels que *C. virginica* (139 pb) (Fuentes et al. 1994), *C. gigas* (118-139 pb) (Tanguy et al. 2001) et *M. edulis* (104-123 pb) (Barsyte et al. 1999). Cependant, une séquence de 572 pb a été observée chez *Dreissena polymorpha* (Engelken et Hildebrandt, 1999). Chez les mammifères, les poissons et les huîtres, la longueur de ces séquences varie entre 110 et 140 pb (Griffith et al. 1983; Karin et Richards, 1982; Unger et al. 1991). Ces variations en taille pourraient jouer un rôle dans la régulation des MTs dans la mesure où la région 3' non codante intervient dans la stabilité des ARNm et dans la polyadénylation (Roesijadi, 1994).

La quantification des niveaux des ARNm codant pour la MT représente une technique nettement plus sensible que celles utilisées pour mettre en évidence l'augmentation de la protéine correspondante puisqu'elle permet de détecter des réponses au niveau cellulaire. Pour cela il faut disposer d'une sonde nucléique (Cosson et Amiard, 1998). Dans cette étude, l'ADNc MT de *R. decusstaus* a été utilisé comme sonde pour réaliser une hybridation des ARN totaux de quatre tissus (branchies, manteau, pied et muscle adducteur) de *R. decussatus* et *C. glaucum* contaminés. Les résultats ont montré que les niveaux d'ARN les plus élevés ont été détectés au niveau des branchies suivies par le manteau. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Lemoine et ses collaborateurs (2000) qui ont montré que les niveaux d'ARN sont plus importants au niveau des branchies par rapport au manteau et la glande digestive chez *M. edulis*. Des résultats similaires ont été obtenus par Denis et ses collaborateurs (2002) sur des Mytilidae hydrothermaux. En effet, les métaux de la phase dissoute sont plus facilement absorbés par les surfaces directement en contact avec le milieu extérieur telles que les branchies et le manteau (Roesijadi et al. 1988 ; Roesijadi, 1994) mais d'une manière générale, les quantités de métaux sont plus élevées dans les branchies qui représentent l'un des organes essentiels d'accumulation des métaux (Smaoui-Damak et al. 2004). Le manteau impliqué dans la synthèse de la coquille, tient un rôle moins important dans l'assimilation des métaux (Mouneyrac et al. 1998).

Chez *Crassostrea gigas*, Tanguy et ses collaborateurs (2001) ont montré une augmentation des niveaux d'ARN MT uniquement au niveau des branchies des huîtres contaminées par le cadmium. Cette induction du gène MT n'a pas été observée au niveau du manteau et de la glande digestive des animaux contaminés et au niveau des tissus des

organismes témoins. Ces résultats montrent que l'expression du gène MT dépend aussi bien de tissus que de la présence des métaux dans le milieu (Tanguy et al. 2001). L'induction du gène MT par le Cd a été déterminée chez plusieurs espèces telles que *M. galloprovincialis* (Dondero et al. 2005), *C. virginica* (Unger et Roesijadi, 1993), *R. decussatus* (ce travail) etc. Chez les modioles hydrothermales l'induction de gène MT par les métaux n'a pas été observée (Hardivillier et al. 2006).

En conclusion, nous avons déterminé au cours de ce travail deux séquences d'ADNc codant pour la MT au niveau des branchies de *R. decussatus* et *C. glaucum*. Bien que ces deux séquences soient partielles, leur longueur est suffisante pour qu'elles soient utilisées comme sonde pour la quantification des ARNm codant pour la MT. Cette étude est considérée comme la première à montrer que l'expression du gène MT est tissu-dépendante chez les deux espèces étudiées et que la présence du cadmium induit la transcription du gène MT chez *R. decussatus*. Si on admet que l'induction de la transcription des gènes codant pour les MTs est suivie d'une augmentation de la synthèse de la protéine, on peut dire que le cadmium induit fortement la production des MTs qui peuvent être utilisées par conséquent comme biomarqueur d'une contamination par le cadmium.




Chapitre IV

Différenciation génétique entre espèces et populations du genre Cerastoderma

Article : Rim Ladhar-Chaabouni, *Yann Hardivillier, Benoit chenais, Amel Hamza-Chaffai et Françoise Denis (2009) Pilot study for genetic differentiation between two phenotypes of the Mediterranean population of C. glaucum and genetic discrimination between this population and others of C. glaucum and C. edule outside the Mediterranean. Marine Ecology. En révision.*

A. Introduction

C. edule vit dans les eaux peu profondes de la partie nord-est de l'Océan Atlantique (Hummel et al. 1994) alors que *C. glaucum* vit dans des écosystèmes variés, en général à faible salinité**,** le long de la mer rouge le long du littoral atlantique, de la mer baltique, de la méditerranée, de la mer rouge, de la mer noire et de la mer caspienne ainsi que dans les lagunes adjacentes (Hummel et al. 1994). Cette variété d'habitats influence fortement la morphologie des coques *C. glaucum* (Brock, 1987). Pour cette raison, l'identification de ces deux espèces sur la base de critères morphologiques est très délicate et il est nécessaire de déterminer de nouveaux critères de caractérisation pour simplifier l'identification des espèces. Dans ce travail, l'étude comparée des populations de *C. glaucum* et *C. edule* est réalisée par des marqueurs moléculaires tels que les séquences de 28S, d'ITS1 et de COI. Ces marqueurs moléculaires ont permis de déterminer les niveaux de divergence génétique entre les deux espèces, entre les différentes populations au sein de chacune des deux espèces et même à l'intérieur de la population. Le polymorphisme nucléotidique des séquences d'ITS1 et de COI nous a permis d'utiliser ces séquences pour estimer la différenciation génétique entre deux phénotypes d'une population de *C. glaucum* Méditerranéenne. En effet, lors de la dissection des échantillons collectés en Tunisie nous avons remarqué la présence de deux phénotypes : les *C. glaucum* à pied jaune et d'autres à pied orangé. Au cours de cette étude nous avons cherché à établir la présence ou l'absence de divergences génétiques entre ces deux phénotypes.

(a) **(b)**



Figure IV.1. Photographie de *C. glaucum* à pied jaune (a) et à pied orangé (b)

B. Matériels et méthodes

1. Collection des échantillons

Les échantillons de *C. glaucum* ont été prélevés sur le littoral méditerranéen (Tunisie), atlantique (Bretagne) et de la mer du Nord (Hollande). Les *C. edule* ont été collectés de l'Atlantique (Bretagne) et de la Mer du Nord (Hollande) (Fig IV.2).

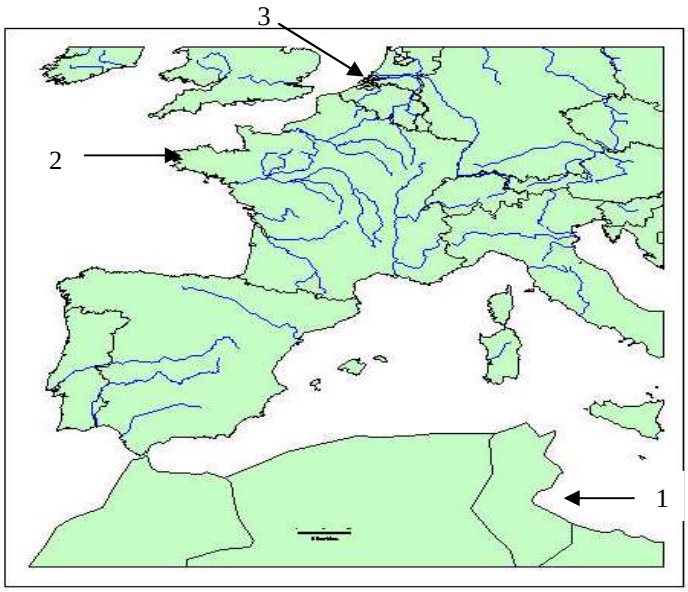


Figure IV.2. Sites d'échantillonnage de *C. glaucum* et *C. edule* (1: Méditerranée, 2: Atlantique, 3: Mer du Nord).

2. Dissection des échantillons

Les animaux ont été disséqués pour prélever les pieds qui ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN. Au cours de cette dissection une différence de couleur a été observée au niveau des pieds de la coque méditerranéenne : 2 phénotypes ont pu être distingués : *C. glaucum* à pied jaune et C. glaucum à pied orangé. Cette différenciation n'a pas été observée chez les *Cerastoderma* prélevées en Atlantique et en Mer du Nord.

3. Extraction de l'ADN génomique

La technique d'extraction utilisée est celle basée sur le CTAB (Winnepenninckx et al. 1993). A 10 mg de tissus broyé dans 600 µl de la solution d'extraction (Tris HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 1.4 M, CTAB 2%, βmercaptoethanol 0.2%), ajouter 20 µl de protéinase K (10 mg/ml). Laisser 30 min à 60°C. Ajouter 600 µl de chloroforme/alcool isoamylique (24/1), agiter 2 min, centrifuger 10 mn à 15000 g et récupérer la phase aqueuse. Ajouter 30 µl d'acétate de sodium 3M et 1.3 ml d'éthanol absolu. Agiter 2min et centrifuger 10 mn à 15000 g. Laver le culot 2 fois avec l'éthanol

70%, le sécher et le reprendre dans 20 µl d'eau ultra pure. L'ADN récupéré est purifié et quantifié par dosage spectrophotométrique à 260 et 280 nm. L'intégrité de l'ADN génomique extrait est contrôlée sur gel d'électrophorèse.

4. PCR

Les PCR ont été réalisées suivant le protocole du Kit puReTaq Ready-To-Go PCR beads (Amersham). 100 ng d'ADN matrice ont été utilisés. Les étapes d'amplification sont constituées d'une dénaturation de 1 min à 94°C, d'une hybridation de 1 min à une température variable suivant les amorces utilisées et d'une élongation de 1 min à 72°C. Quarante cycles d'amplification sont effectués par PCR.

Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	T° d'hybridation
Amorces spécifiques du gène ITS1 (Denis et al. soumise)		
ITS1a :	cacaccgcccgtcgctacta	52°C
ITS1b :	tcgaccacgagccgagtgat	52°C
Amorces spécifiques du gène COI (Folmer et al. 1994)		
COI a :	ggtcaacaaatcataaagatattgg	50°C
COI b :	taaacttcagggtgaccaaaaaatca	50°C
Amorces spécifiques du gène ribosomique 28S (Hardivillier, 2005)		
28Sa :	aacatgtgcgcgagtcatg	57°C
28Sb :	ctttcgcccctatacccaag	57°C

Tableau IV.1. Liste des oligonucléotides et des températures d'hybridation utilisés lors des réactions de PCR.

5. Electrophorèse

La quantité d'ADN obtenue (produits de PCR) est déposée sur un gel d'électrophorèse. Les électrophorèses sont réalisées sur un gel d'agarose (1 %) en présence d'un tampon de migration TAE 1X (4,84 g Tris ; 1,14 ml acide acétique ; 2 ml EDTA 0,5M) et de bromure d'éthidium (BET) qui est un intercalant de l'ADN et permet la visualisation de celui-ci sous rayonnement Ultra Violet (UV). L'ADN migre dans le gel d'agarose de la cathode vers l'anode (les acides nucléiques étant chargés négativement dans la gamme de pH utilisée). Un courant d'environ 100 volts est appliqué aux bornes de la cuve. A l'issue de la migration, l'ADN est visualisé sous U.V et photographié à l'aide

d'une caméra Polaroïd MP4. La taille du fragment est déterminée par comparaison avec le marqueur de taille « phage l/ EcoRI/HindIII» ® (QBiogen) qui a migré sur le même gel.

6. Extraction de l'ADN du gel d'agarose (Voir Chapitre III)

7. Séquençage automatique (voir chapitre III)

8. Traitement des données

Ces traitements ont été réalisés suivant différentes étapes :

- Alignement multiple des séquences sélectionnées par le logiciel Clustal W, version1.8 (Thompson et al. 1994) afin de déterminer les zones de polymorphisme.
- Alignement multiple des séquences étudiées par le logiciel ClustalX (Thompson et al. 1997) afin de générer un arbre consensus par le programme PHYLIP (Phylogeny Inference Package) (Felsenstein, 2001). La méthode de reconstruction appliquée est la méthode des proches voisins (Neighbor-Joining). Cette méthode consiste à regrouper les séquences les plus similaires entre elles, ce regroupement se faisant avec comme contrainte de minimiser la longueur totale de l'arbre. La méthode Neighbor-joining donnera toujours un seul arbre phylogénétique pour une matrice de distance donnée (Saitou et Nei, 1987). Les distances génétiques sont déterminées par la méthode de Kimura (1980).
- Evaluation statistique de l'arbre : on évalue le support des branches par la méthode de tests de robustesse tel que le test de rééchantillonnage au hasard avec remise (le test de bootstrap).
- Alignement multiple des séquences amplifiées par le logiciel Fluxus DNA Alignement 1.0.1.0 (Fluxus Technology Ltd. Allemagne) afin de construire les réseaux de relation entre les séquences par le logiciel Median joining Network 4.5.0.0 (Bandelt et al. 1999).

9. Analyses statistiques

Ces analyses ont été réalisées avec le programme Arlequin 3.1 (Excoffier, 2005). Afin de déterminer le nombre de sites nucléotidiques montrant de la variation dans un échantillon de séquences d'individus de la même population ou de populations différentes, le nombre moyen de sites polymorphes entre paires de séquences et la moyenne non corrigée des différences des séquences prises 2 à 2 ont été déterminés. La présence ou l'absence de différence significative entre le nombre moyen de sites polymorphes entre paires de séquences a été établie par le test de Student en utilisant le programme Excel. Le

degré de dissemblance génétique entre les populations a été également évalué grâce aux distances génétiques.

La structure génétique populationnelle a été déterminée par une analyse de variance moléculaire (AMOVA). Cette analyse a été effectuée à différents niveaux hiérarchiques : entre 2 groupes (correspondant aux 2 espèces), entre populations au sein de chacun de ces 2 groupes, et enfin au sein de chacune des populations.

Un test de Mantel (Mantel, 1967) a été effectué pour déterminer une association possible entre les matrices de distances génétiques déterminées à partir des séquences ITS1 et COI.

C. Résultats

1. Alignement des séquences 28S

Des séquences de 28S ayant une longueur de 1069 pb pour *C. glaucum et* 1065 pb pour *C. edule* ont été amplifiées et déposées dans la banque génomique (Tableau IV. 9). Ces séquences sont identiques à 89,1% et sont riches en G+C (62,58% et 62,21% respectivement) (Fig. IV. 3). Au niveau de ces séquences 50 sites variables ont été observés. Les séquences de 28S de *Cerastoderma* spp. et celles isolées chez d'autres bivalves (disponibles dans les banques de données nucléotidiques) ont été utilisées dans une comparaison phylétique. Un arbre a été établi en utilisant la méthode de Neighbor-joining. On a obtenu une topologie caractérisée par la présence de plusieurs groupes séparés par des nœuds robustes. Un premier groupe inclut les 28S des ostreidaes, un second rassemble les 28S des Mytilidaes, un troisième comprend les 28S des cardiidaes et un quatrième inclut les 28 S des veneridaes (Fig IV. 4). La distance génétique entre les différentes espèces étudiées est présentée dans le tableau IV. 2. Cette distance est de 0,033 entre *C. glaucum* et *C. edule* et possède une moyenne de $0,39 \pm 0,12$ entre le genre *Cerastoderma* et les autres genres de la famille des cardiidaes.

```
Cg              AACATGTGCGCGAGTCATGCTAACGAGGATTTTCCACAAGAAACGGCGAGTGAAGCAGGA
Ce              AACATGTGCGCGAGTCATGCTAACGAGGATT--CCACAAGAAACGGCGAGTGAAGCAGGA
                ******************************  **************************

Cg              AATAGCCCAGCACGGATCCCCTCTGCGGGCTCGCGTGAGCGGGAA--GTGGTGTTAGGAG
Ce              AATAGCCCAGCACGGATCCCCTCTGCGGGCTCGCGTGAGCGGGAAAAGTGGTGTTAGGAG
                *******************************************  *************

Cg              GCGGGCGCTGGTTCGCGGTCCTCGGTGCC-AGGTCCTCGTGATCGTGGCC-TTCGCCCCG
Ce              GCG--CGCTGGTTCGCGGTC-TCGGTGCCCAGGTCCTCGTGATCGTGGCCCTTCGCCCCG
                ***  *************** ******** ******************** *********

Cg              TCGAGGCTGTAAGGCCCTTCGTGGCACCGCACTCCGACGCCGCCAGAAACTCCCGGAGTC
Ce              TCGAGGGTGTAAGGCCCTTCGTGGCACCGCACTCCGACGCCGCCAGAAACTCCCGGAGTC
                ****** **************************************************
```

```
Cg              GGGTTGCTTGGATCGCAGCCCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAGCCTAAATACCGGA
Ce              GGGTTGCTTGGATCGCAGCCCAAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAGGCTAAATACCGGA
                ********************************************* ************

Cg              CACGAGCAAGTGAAGAATTCACGAACTCGCGGGTAACGGCGGGAGTA-CTATGACTCTCT
Ce              CACGAA-GCGTGAGAACTTCACGAA-TCTCGGGAAACGGCGGGAGTAACTATGACTCTCG
                *****    ****  * ******** ** **** ************* ***********

Cg              TAAGGTAGCCAAATGCCTCGTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGATT
Ce              TAAGGTAGCCAAATGCCTCGTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGATT
                ************************************************************

Cg              CCCACTGTCCCTATCTACTATCTAGCGAAACCACAGGCAAGGGAACGGGCTTGCCATTCA
Ce              CCCACTGTCGCTATCTACTATCTAGCGAAACCACAGGCAAGGGAACGGGCTTGCCATTCA
                ********* ************************************************

Cg              AA-CAGCGGGGAAAGAAGACCCCTGTTGAGCAAGGGCCCTTCTGGCGCTGCGAGGCGTGC
Ce              ATTCAGCGGGGAAAGAAGACCG-TATTGAACA-GGGCCCTTCTGGCGCTGCGAGGCGTGC
                *  ******************  * **** ** **************************

Cg              GGGTGCACTTGCTCCGGTT----CGAGGGCCACGACCGGTTCAATTCGCAGGCAGTCTGG
Ce              GGGTGCACTTGCTCCGGTTTTGTCGAGGGCCACGACCGGTTCC-TTCGCAGGCAGTCTGG
                ******************    ******************  ****************

Cg              AGTCGGGGCGGTTTGGCGTCGCTGCCGGGTGCCCGTCCTCGTGACCCGCTCGCGGAGGCG
Ce              AGTCGGGGCGGTTTGGCGTCGCTGCCGGGTGG--GTCCTCGTGACCCGCTCGCGGAGGCG
                ******************************   *************************

Cg              CGCCGCTTCGGTCGGACACTCGTCTGGGGACCGAGGACGCGTATGGCCGGTGTGTCGGGA
Ce              CGCCGCTTCGGTCGGACACTCGTCTGGGGACCGAGGACGCGTATGGCCGGTGTGTCGGGA
                ************************************************************

Cg              CGCGGGCGTTCTCGTCCGGAGCTCGTGGTGTTGGGGTCGGCTCTCGTGGTCGGCTCCTCG
Ce              CGCGGGCGTTCTCGTCCGGAGCTCGTGGTGTTGGGGTCGGCTCTCGTGGTCGGCTCCTCG
                ************************************************************

Cg              CCGTAACAGCGACACTCCGGCGAGCTCTTGCCCCGTGCCGGCGCGCCGTCAGAGTGTCGG
Ce              CCGTAACAGCGG-ACTCCGGCGAGCTCTTGCCCCGTGCCGGCGCGCCGTCAGAGTGTCGG
                ***********  *********************************************

Cg              TGGCGGATCAGGTCGGTACTCCACCCCACCCGTCCCGAGAAACACGGACCAAGGGAGTCC
Ce              TGGCGGATCAGGTCGGTACTCCACCCGACCCGTCTTTTGAAACACGGACCAAGGGAGTCC
                ************************* *******    **********************

Cg              AGCATGTGCGCGAGTCGACGGGATTTCACGAAACCCCACGGCGAAATGAAAGTGAAG-CC
Ce              AGCATGTGCGCGAGTCGACGGGATTTCACGAAACCCCACGGCGAAATGAAAGTGAAGGCC
                ************************************************************ **

Cg              GCCTACGGTTGGCCTAGGCAGGATCCCTTTCCCCGCGGGGGAGGGGCGCACTGCCGGCCC
Ce              GCCTACGGTTGGCCTAGGCAGGATCCCTTTCCCCGCGGGGGAGGGGCGCACTGCCGGCCC
                ************************************************************

Cg              GTCTCGATCGCTTCTGACGGCGAGGCGGAGCAAGAGCGCACACGCTGGGACCCGAACGAT
Ce              GTCTCGATCGCTTCTGACGGCGAGGCGGAGCAAGAGCGCACACGCTGGGACCCGAAAGAT
                ************************************************************ ***

Cg              GGTGAACTATGCAATGAGGCAGGACGAAGTCAGGGGA
Ce              GGTGAACTATGCC-TGAG-CAGGACGAAGTCAGGGGA
                ************  **** ******************
```

Figure IV.3. Alignement des séquences de 28S de *C. glaucum* (Cg) et de *C. edule* (Ce)

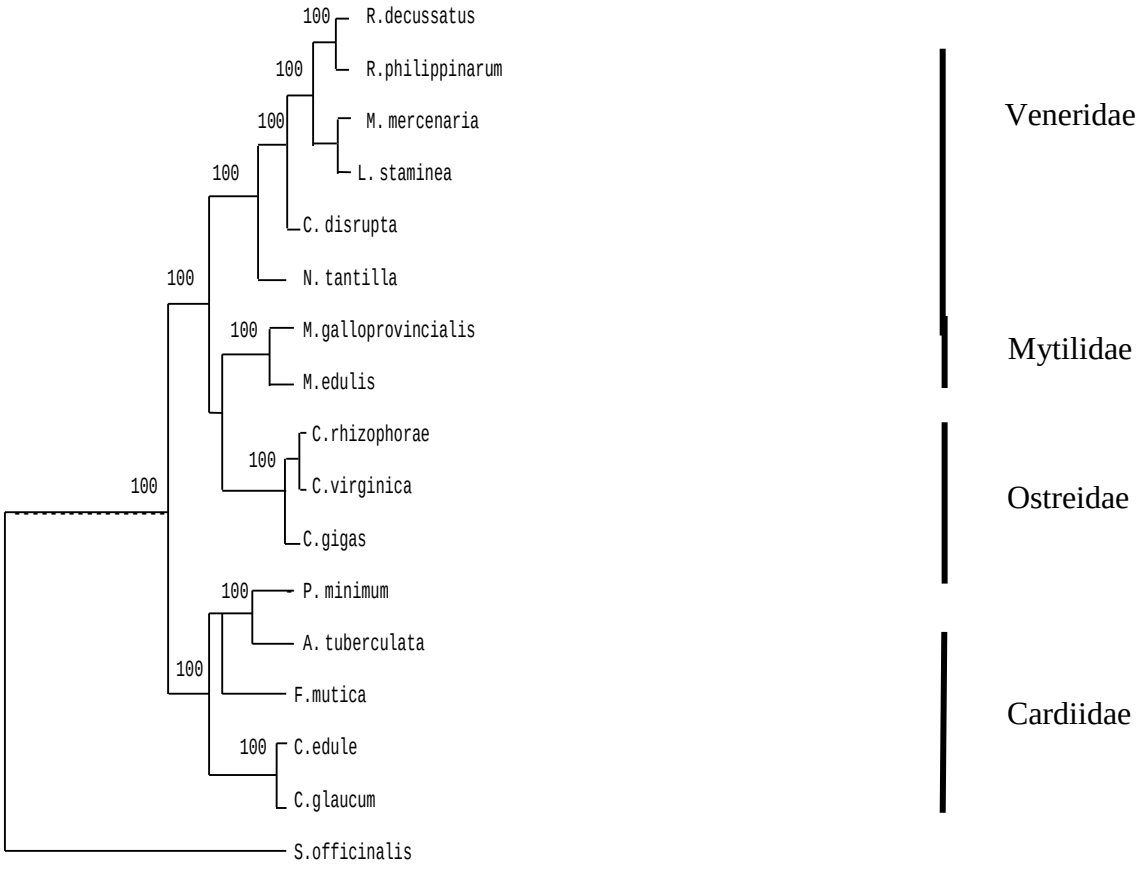


Figure IV.4. Arbre phylogénétique basé sur les séquences de 28S isolées chez *C. glaucum*, *C. edule* et chez d'autres bivalves. Numéros d'accession: [*Crassostrea virginica*: Z29549 ; *Crassostrea gigas*: AB105362; *Crassostrea rhizophorae*: Z29547; *Mytilus galloprovincialis*: AB105357; *Mytilus edulis*: Z29550; *Acanthocardia tuberculata*: AM779696*; Parvicardium minimum*: DQ279966; *Fulvia mutica*: AB105363 ; *Ruditapes philippinarum*:AM779742; *Ruditapes decussates*: DQ184781; *Leukoma staminea*: AM779744; *Nutricola tantilla*: AM779743; *Callista disrupta*: AM779741; *Mercenaria mercenaria*: AM779740]. *Sepia officinalis* (AY557560) est choisi comme groupe externe. Les valeurs qui caractérisent les nœuds représentent les résultats des tests de bootstrap effectués sur 100 réplicas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
C glaucum	0,000																
C.edule	0,033	0,000															
A. tuberculata	0,294	0,247	0,000														
P. minimum	0,399	0,332	0,188	0,000													
F.mutica	0,555	0,509	0,299	0,247	0,000												
C.virginica	0,778	0,762	0,535	0,522	0,542	0,000											
C. rhizophorae	0,790	0,774	0,539	0,529	0,540	0,007	0,000										
M.edulis	0,718	0,695	0,487	0,484	0,566	0,285	0,290	0,000									
C.gigas	0,798	0,751	0,512	0,508	0,446	0,092	0,092	0,359	0,000								
M.galloprovincialis	0,731	0,665	0,489	0,459	0,472	0,321	0,321	0,134	0,269	0,000							
L.staminea	0,646	0,535	0,386	0,405	0,440	0,379	0,385	0,326	0,380	0,321	0,000						
M.mercenaria	0,644	0,534	0,390	0,391	0,452	0,367	0,376	0,318	0,362	0,303	0,034	0,000					
R.philippinarum	0,624	0,517	0,370	0,385	0,449	0,369	0,378	0,302	0,375	0,289	0,048	0,035	0,000				
R.decussatus	0,650	0,539	0,374	0,383	0,452	0,369	0,379	0,319	0,373	0,295	0,061	0,045	0,036	0,000			
C.disrupta	0,654	0,543	0,392	0,407	0,479	0,395	0,403	0,336	0,416	0,350	0,073	0,056	0,061	0,081	0,000		
N.tantilla	0,656	0,566	0,412	0,421	0,532	0,419	0,428	0,352	0,440	0,392	0,136	0,128	0,125	0,148	0,117	0,000	
S.officinalis	1,321	0,987	1,048	0,971	1,379	1,623	1,609	1,581	1,277	1,308	0,914	0,928	0,929	0,973	0,916	0,986	0,000

Tableau IV.2. Distances génétiques (Kimura 2P) déterminées par les séquences de 28S entre les espèces étudiées et d'autres espèces dont les séquences de 28S sont disponibles dans les banques génomiques.

2. Alignement des séquences ITS1

Les séquences d'ITS1 de 47 individus (29 *C. glaucum* et 18 *C. edule*) ont été amplifiées par PCR, séquencées et déposées dans la banque génomique (Tableau IV.9). L'alignement des séquences ITS1 est présenté dans la figure IV. 5. Ces séquences possèdent une longueur comprise entre 347 pb et 350 pb dont la composition en G+C est de 57,65% pour les *C. glaucum* et une longueur qui varie de 344 pb à 349 pb dont la composition en G+C est de 54,95% pour les *C. edule*. Les séquences d'ITS1 de *C. glaucum* ont permis de décrire 18 haplotypes avec 128 sites variables contenant 93 sites informatifs. Celles de *C. edule*, ont permis de décrire 9 haplotypes avec 102 sites variables contenant 82 sites informatifs. Les substitutions nucléotidiques comprennent 38 transitions et 81 transversions pour *C. glaucum* et 29 transitions et 71 transversions pour *C. edule*.

```
CH1(2)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGAAACCTGCCGATGGGATCATTACCGAAAAACG
CH2(1)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGAAACCTGCCGATGGGATCATTACCGAAAAACG
CH3(2)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TGGGTGAAAACTGCCGATGGGCTCATTACCGAAAAACG
CH4(2)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGAAA-CTGACGATCGGATCATTACCGAAAAAGG
J1 (1)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TGGGTGAAACCTGCGGATGGGATCATTACCGCAAAACG
J2 (1)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TGGGTGAAACCTGCGGATGGGATCATTACCGCAAAACG
O1 (1)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGAAACCTGCGGATGGGATCATTACCGCAAAACG
O2 (1)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGAAACCTGCGGATGGGATCATTACCGCAAAACG
J3 (3)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TGGGTGAAACCTGCGGATGGGATCATTACCGCAAAACG
J4 (2)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TGGGTGAGACATGCGGATGGGATCATTACCGCAATACG
J5 (1)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TGGGTGAGACATGCGGATGGGATCATTACCGCAATACG
O3 (3)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGAAACCTGCGGAAGGGATCATTACCGCAATACG
O4 (2)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGAAACCTGCGGAAGGGATCATTACCGCAATACG
J6 (1)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TGGGTGAGATGTGCGGATGGGATCATTACCGCAATACG
EB1(1)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGAAACCTGCGGATGGGATCATTACCGC--ATTG
EB2(2)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGAAACCTGCGGATGGGATCATTACCGC--ATTG
EB3(1)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGAAACCTGCGGATGGGATCATTATCCG--ATTG
EH1(2)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGTGACCTGCGGATGGGATCATTACCGCCAATTG
EH2(1)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGTGACCTGCGGATGGGATCATTACGGGCAATTG
EH3(2)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGTGACCTGCGGATGGGATCATTACCG-CAATTG
EH4(2)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGTGACCTGCGGATGGGATCATTACCGC--ATCG
EH5(2)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGTGACCTGCGGATGGGATCATTACCGC--ATCG
EH6(1)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGTGACCTGCGGATGGGATCATTACCGC--ATCG
CH5(3)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGAAA-CTGCGGATGGGATCATTCCCGGCTAACG
CH6(2)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGAAA-CTGCGGATGGGATCATTCCCGGCTAACG
CB1(3)              AAGTCCTAACACGGTGTCCGCGTAGGTGAAA--TGCGGATGGGATCATTACCGCAAAACG
CB2(2)              AAGTCCTAACACGGTGTCCG--TAGGTGTGAAATGCGGATGGGATCATTACCGCAAAACG
                    ********************  * ****  *  **  **  *  *****         *

CH1                 AGTGGAATGCTCG---CCATACTTACTGCCGCTCATCTATTCTCGTACTAACCTCGACGT
CH2                 AGTGGAATGCTCG---CCATACTTACTGCCGCTCATCTATTCTCGTACTAACCTCGACGT
CH3                 GGGGGAATGGTCG---CCATACTTACTGCCCCTCATCTATTCTCGTAATAACCTCGACGT
CH4                 AGTGTAATGCTCG---TCATACTTACTGCCGCTCATCTATTCTCGTACTAACCTCGACGG
J1                  AGTGTAATGCTCG---CCATACTTACTGCCGCTCATCTATTCTCGTACTAACCTCTACGT
J2                  AGTGAAATGCTCG---CCATACTTACTGCCGCTCATCTATTCTCGTACTAACCTCTACGT
O1                  AGTGTAATGCTCG---CCATACTTACTGCCGCTCATCTATTCTCGTACTAACCTCTCCGT
O2                  AGTGTAATGCTCG---CCATACTTACTGCCGCTCATCTATTCTCGTACTAACCTCGACGT
J3                  AGTGTAATGCTCG---CCATACTTACTGCCGCTCATCTATTCTCGTACTAACCTCGACGT
J4                  AGTGTAATGCTCG---CCATACTTACTGCCCCTCATCTATTCTCATACTAACCTCGACGT
J5                  AGTGTAATGCTCG---CCATACTTACTGCCCCTCATCTATTCTCATACTAACCTCGACGT
O3                  AGTGTAATGCTCG---CCATACTTACTGCCGCTCATCTATTCTCATACTAACCTCGACGT
O4                  AGTGTAATGCTCG---CCATACTTACTGCCGCTCATCTATTCTCATACTAACCTCGACGT
J6                  AGTGTAATGCTCG---CCATACTTACTGCCCCTCATCTATTCTCATACTAACCTCGACGT
EB1                 AGAGTAA-ACTTAAAACTTTACTTACTGCCGCTCATTTATACCTATACCAACCTCGACGT
EB2                 AGAGTAA-ACTTAAAACTTTACTTACTGCCGCTCATTTATACCTATACCAACCTCGACGT
EB3                 AGAGTAA-ACTAAAAACTTTACTTACTCCCGCTCATTTATACCTATACCAACCTCGACGT
EH1                 AG--TAA-AATTAATACTTTACTTACTGCCGCTCATTTATACCTATACCAACCTCGACGT
EH2                 AG--TAA-AATTAATACTTTACTTACTGCCGCTCATTTATACCTATACCAACCTCGACGT
EH3                 AG--TAA-AATTAATACTTTACTTACTGCCGCTCATTTATACCTATACCAACCTCGACGT
EH4                 AGAGTAA-ACTTAAAACTTTACTTACTGCCGCTCATTTATACCTATACCTACCTCGACGT
```

```
EH5                 AGAGTAA-ACTTAAAACTTTACTTACTGCCGCTCATTTATACCTATACCTACCTCGACGT
EH6                 AGAGTAA-ACTTAAAACTTTACTTACTGCCGCTCATTTATACCTATACCAACCTCGACGT
CH5                 AGTGTAATGCTCG---CCATACTTACTGCCGCTCATCTATTCTCGTACTAACCTCGACGT
CH6                 AGTGTAATGCTCG---CCATACTTACTGCCGCTCATCTATTCTCGTACTAACCTCGACGT
CB1                 AGTGT---GCTCGAAACCATACTTACTGCCGCTCATCTATTCTCGTACT---CTCGACGT
CB2                 AGTGT---GCTCGAAACCATACCTACTGCCGCTCATCTATTCTCGTACT---CTCGACGT
                     *        *        *** **** ** ***** *** *          ***  **

CH1                 CCGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATTACCCTGACCCGGTTCGGTCGTCCCCGTGTTT
CH2                 CCGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATTACCCTGACCCGGTTCGGTCGTCCCCGTGTTT
CH3                 CCGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATTACCCTGACCCGGTTCGGTCGTCCCCGTGTTT
CH4                 CGGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATTACCCTGACCGGGTTCGGTCGTCCCCGTGTTT
J1                  CCGCGCGGGTGGCCGGCCCGCGGGCGATTCCCCCCACCCGGTTGGGTCGGCGCCGTGTTT
J2                  CCGCGCGGGTGGCCGGCCCGCGGGCGATTCCCCCCACCCGGTTGGGTCGGCGCCGTGTTT
O1                  CCGCCCGGGTGGGCGGCCCGCGGGCGATTCCCCCCACCCGGTTGGGTCGGCCCCCTGTTT
O2                  CCGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATTACCCCGACCCGGTTGGGTCGTCGCCGTGTTT
J3                  CCGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATTACCCTGACCCGGTTCGGTCGTCGCCGTGTTT
J4                  CCGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATTACCCCGACCCGGTTGGGTCGTCGCCGTGTTT
J5                  CCGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATTACCCCGACCCGGTTGGGTCGTCGCCGTGTTT
O3                  CCGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATTACCCTGGCCCGGTTGGGTCGTCGCCGTGTTT
O4                  CCGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATTACCCTGGCCCGGTTGGGTCGTCGCCGTGTTT
J6                  CCGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATTACCCCGACCCGGTTGGGTCGTCGCCGTGTTT
EB1                 CCGCGCGGGTGGCCAACGCGTGGACGATAACCCTGACCCGGTGTGTGCGTCTAG-CGACA
EB2                 CCGCGCGGGTGGCCAACGCGTGGACGATAACCCTGACCCGGTGTGTGCGTCTAG-CGACA
EB3                 CCGCGCGGGTGGCCAACGCGTGGACGA-AACCCTGACCCGGTGTGTGCGTCTAG-CGACA
EH1                 CCGCGCGG-TGGCCAACGCGTGGACGAAAACCCTGACCCGGTGTGTGCGTCTAGGCGACA
EH2                 CCGCGCGG-TGGCCAACGCGTGGACGAAAACCCTGACCCGGTGTGTGCGTCTAGGCGACA
EH3                 CCGCGCGG-TGGCCAACGCGTGGACGAAAACCCTGACCCGGTGTGTGCGTCTAGGCGACA
EH4                 CCGCGCGG-TGGCCAACGCGTGGACGAAAACCCTGACCCGGTGTGTGCGTCTAGGCGACA
EH5                 CCGCGCGG-TGGCCAACGCGTGGACGAAAACCCTGACCCGGTGTGTGCGTCTAGGCGACA
EH6                 CCGCGCGG-TGGCCAACGCGTGGACGAAAACCCTGACCCGGTGTGTGCGTCTAGGCGACA
CH5                 CCGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATTACCCTGACCCGGTTCGGTCGTCGCCGTGTTT
CH6                 CCGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATTACCCTGACCCGGTTCGGTCGTCGCCGTGTTT
CB1                 CCGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATAACCCTGACCCGGTTCGGTCGTCGCCGTGTTT
CB2                 CCGCGCGGGTGGCCAACGCGCGGGCGATAACCCTGACCCGGTTCGGTCGTCGCCGTGTTT
                    * ** *** *** *  * ** ** **    *     ** * *  *  ** *     *

CH1                 TTACCACG---GGGGCGACCTGCGACAAAACACACCGTTGCCATCGCCTGCGTGCGGCGA
CH2                 TTACCACG---GGGGCGACCTGCGACAAAACACACCGTTGGCATCGCCTGCGTGCGGCGA
CH3                 TTACCACG---GGGGCAACCTGCGACAAAACACACCGTTGCCATCGCCTGCGTGCGGCGA
CH4                 CCACCACG---GGGGCAACCTGCGACAATTCACACCGTTGCC-TCGCCTGCGTGCGGCGA
J1                  T-ATTACG---GGGGCGACCTGAGATAAAACATACCGTTGCCATCGCCCTCGTGCGGCGA
J2                  T-ATTACG---GGGGCGACCTGAGATAAAACATACCGTTGCCATCGCCCTCGTGCGGCGA
O1                  T-ATTATT---TGGGCGGCGTGCCATAAAACACACTGCTGCCATCTCCCTCGTGGGGCGC
O2                  T-ACCATT---GGGGCGACCTGCCAAAAAACACCCCGTTTCCATCTCCTTCGTGGGGCGA
J3                  T-ATCACG---GGGGCGACCTGCGACAAAACACACCGTTGCCATCGCCTGCGTGCGGCGA
J4                  T-ATCACG---GGGGCGACCTGCGACAAAACACACCGTTGCCATCGCCTGCGTGCGGCAA
J5                  T-ATCACG---GGGGCGACCTGCGACAAAACACACCGTTGCCATCGCCTGCGTGCGGCAA
O3                  T-ATCACG---GGGGCGACCTGCAACAAAACACACCGTTGCCATCGCCTGCGTGCGGCAA
O4                  T-ATCACG---GGGGCGACCTGCAACAAAACACACCGTTGCCATCGCCTGCGTGCGGCAA
J6                  CCATCACG---GGGGCGACCTGCGACAAAACACACCGTTGCCATCGCCTGCGTGCGGCAA
EB1                 AA--CACT--TGGAA-GACCTGA--AAAACGAAACGGCTTCTAGC---TGCTTGCGGCGA
EB2                 AA--CACAAATGGAA-GACCTGA--CAAACGAAACGGCTTCCATCGCCTGCTTGCGGCGA
EB3                 AA--CACT--TGGACCGACCTGACAAAAACGAAACGGCTTCCATCGCCTGCTTGCGGCGA
EH1                 AAACCACT--TGGAA-CACATGCGAAAAACGAAACGGCTTCCATCGCCTGCTTGCGGCGA
EH2                 AAACCACT--TGGAA-CTCATGCGAAAAACGAAACGGCTTCCATCGCCAGCTTGCGGCGA
EH3                 AAACCACT--TGGAA-CACATGCGAAAAACGAAACGGCTTCCATCGCCTGCTTGCGGCGA
EH4                 AAACCACT--TGGAA-CACATGCGAAAAACGAAGCGGCTTCCAGCGCCTGCTTGCGGCGA
EH5                 AAACCACT--TGGAA-CACATGCGAAAAACGAAGCGGCTTCCAGCGCCTGCTTGCGGCGA
EH6                 AAACCACT--TGGAA-CACATGCGAAAAACGAAACGGCTTCCATCGCCTGCTTGCGGCGA
CH5                 TTACCACG---GGGGCGACCTGCGACAAAACACACCGTTGCCATCGCCTGCGTGCGGCGA
CH6                 TTACCACG---GGGGCGACCTGCGACAAAACACACCGTTGCCATCGCCTGCGTGCGGCGA
CB1                 TTACCCGG---GGGGCGACCTGCGACAAAACACACCGTTGCCATCGCCTGCGTGCGGCGA
CB2                 TTACCCGG---GGGGCGACCTGCGACAAAACACACCGTTGCCATCGCCTGCGTGCGGCGA
                               *     * **    **   *  * * *     *     * ** ***

CH1                 GGCTCCGGGGCGGATTGGAGGTCCTTCCCCAGAGTGGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
CH2                 GGCTCCGCGGCGGATTGGAGGTCCTTCCCCAGAGTGGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
CH3                 GGCTCCGGGGCGGATTGGAGGTCCTTCCCCAGAGTGGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
CH4                 GGCTCCGAGGCGGATTGGAGGTCCTTCCCCAGAGAGGCAACCAGAAAAACGGG--GGAAC
J1                  GGCTACGGTGCGGAGTGGAGGTCCTTCCCCTCAGCGGAAACCAAAAAAACAAA--GGAAC
J2                  GGCTACGGTGCGGAGTGGAGGTCCTTCCCCTCAGCGGAAACCAAAAAAACAAA--GGAAC
O1                  GGCTCCGGGCCGGGTTGGGAGGCATTCCCCTCCCCGGAAACCAAACAAAAAAA--GGAAC
O2                  GGGTTCCGGGGGGATTGGGGGTCCTTCCCCTAACCGGAAACCAAAAAAACAAA--GGAAC
J3                  GGCTCCGGGGCGGATTGGAGGTCCTTCCCCAGAGTGGAAACCAAAAAAACAAA--GGAAC
J4                  GGCTCCGGGGCGGATTGGAGGTCCTTCCCCAAAGTGGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
J5                  GGCTCCGGGGCGGATTGGAGGTCCTTCCCCAAAGTGGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
O3                  GGCTCCGGGGCGGATTGGAGGTCCTTCCCCAAAGTGGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
```

```
O4                  GGCTCCGGGGCGGATTGGAGGTCCTTCCCCAAAGTGGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
J6                  GGCTCCGGGGCGGATTGGAGGTCCTTCCCCAAAGTGGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
EB1                 GGCTCCGGGGCGGATTAGACGTTTCCCCCCAGAGTTGAAACCAGAAAAACAAACAGGAAC
EB2                 GGCTCCGGGGCGGATTAGACGTTTCCCCCCAGAGTTGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
EB3                 GGCTCCGGGGCGGATTAGACGTTTCCCCCCAGAGTTGAAACCAGAAACCCAAA--GGAAC
EH1                 GGCTCCGGGGCGGATTAGACGTTTCCCCCCAGAGTTGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
EH2                 GGCTCCCGGGCGGATTAGACGTTTCCCCCCAGAGTTGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
EH3                 GGCTCCGGGGCGGATTAGACGTTTCCCCCCAGAGTTGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
EH4                 GGCTCCGGGGCGGATGATACGTTACCCCCCAGAGTTGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
EH5                 GGCTCCGGGGCGGATGATACGTTACCCCCCAGAGTTGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
EH6                 GGCTCCGGGGCGGATTAGTCGTTTCCCCCCAGAGTTGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
CH5                 GGCTCCGGGGCGGATTGGAGGTCCTTCCCCAGAGTGGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
CH6                 GGCTCCGGGGCGGATTGGAGGTCCTTCCCCAGAGTGGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
CB1                 GGCTCCGGGGCGGATTGGAGGTCCTTCCCCAGAGTGGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
CB2                 GGCTCCGGGGCGGATCCT-GGTCCTTCCCCAGACTGGAAACCAGAAAAACAAA--GGAAC
                    ** * *     **       *     ****      * ***** * *        *****

CH1                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
CH2                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
CH3                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
CH4                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
J1                  ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
J2                  ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
O1                  ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
O2                  ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
J3                  ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
J4                  ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
J5                  ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
O3                  ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
O4                  ACCCTGAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
J6                  ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
EB1                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
EB2                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
EB3                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
EH1                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
EH2                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
EH3                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
EH4                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGA
EH5                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGA
EH6                 ACCCTCAACAAACACACACACGAATTCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
CH5                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
CH6                 ACCCTGAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
CB1                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
CB2                 ACCCTCAACAAACACACACACGAAATCGTACTGTGTGTGGGGGGATGACTAGGTTATGGT
                    ***** ***************** **********************************
```

Figure IV.5. Alignement des séquences d'ITS1. Les fréquences des séquences sont entre parenthèses. O : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie) à pied orangé, J : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie) à pied jaune CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande) et EB : *C. edule* atlantique (Bretagne).

Afin d'étudier l'homogénéité ou la diversité génétique au niveau intrapopulationnel, cinq populations ont été définies (*C. glaucum* méditerranéenne, *C. glaucum* atlanatique, *C. glaucum* de la Mer du Nord, *C. edule* atlantique et *C. edule* de la Mer du Nord) et le nombre moyen de sites polymorphes des séquences prises 2 à 2 a été déterminé. Les valeurs obtenues varient de 6,60 ± 3,75 à 9,52 ± 3,46 (tableau IV. 3).

Population	CH	T	CB	EH	EB
le nombre moyen de sites polymorphes des séquences prises 2 à 2	9,52±3,46	9,28±3,59	6,60±3,75	9,49±4,76	8,16±3,13

Tableau IV.3. Nombre moyen de sites polymorphes des séquences d'ITS1 prises 2 à 2 des différentes populations étudiées : T : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie), CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande) et EB : *C. edule* atlantique (Bretagne).

Au niveau interpopulationnel, la moyenne non corrigée des différences des séquences prises 2 à 2 a été déterminée. Ces valeurs ont une moyenne de 34,80 ±4,88 en intraspécifique chez *C. glaucum* et est de 57,60 chez *C. edule*. En interspécifique cette moyenne est de 82,43± 11,47 (Tableau IV. 4). Les différences génétiques interpopulationnelles ont été également déterminées par le calcul des distances génétiques. Ces distances déterminées en intraspécifique ont une moyenne de 0,43±0,096 pour *C. glaucum* et est de 0,53 pour *C. edule*. En interspécifique, ces distances ont une moyenne de 0,67± 0,066 (Tableau IV. 5).

	T	CB	EH	EB
CH	29,55	35,67	72,51	94,17
T		39,20	73,06	91,37
CB			70,50	93,00
EH				57,60

Tableau IV.4. La moyenne non corrigée des différences des séquences ITS1 prises 2 à 2 des différentes populations : T : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie), CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande) et EB : *C. edule* atlantique (Bretagne).

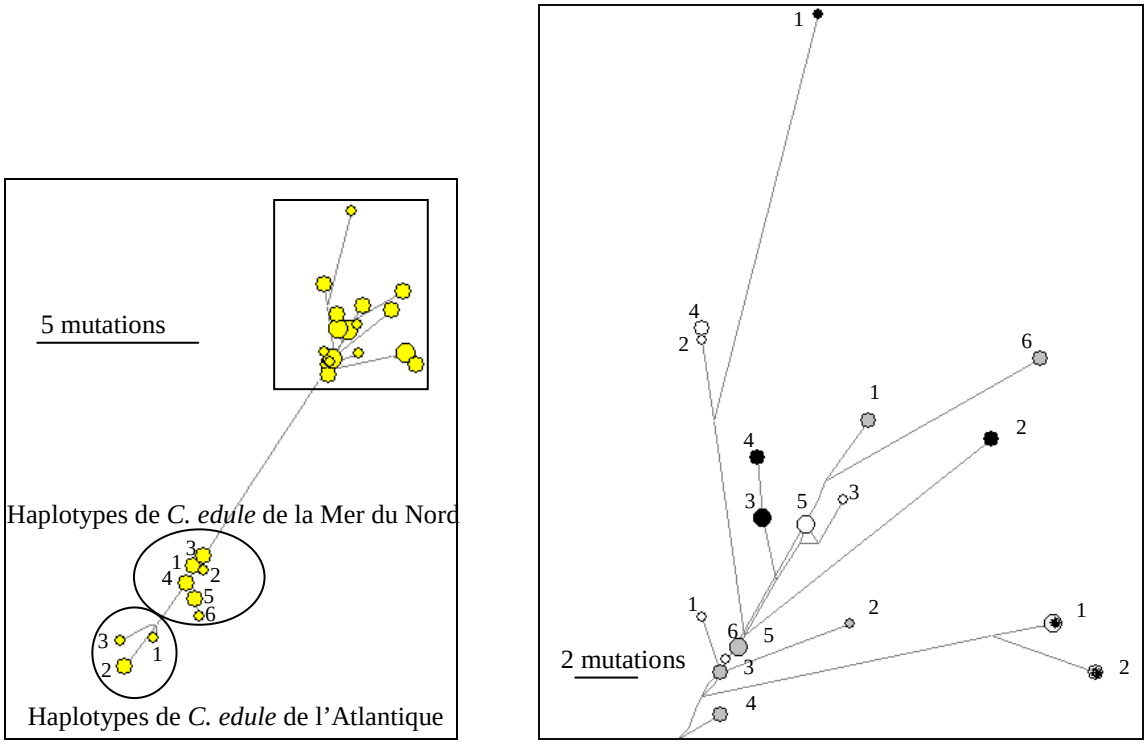
	CH	T	CB	EH	EB
CH	0				
T	0,33	0			
CB	0,50	0,47	0		
EH	0,70	0,67	0,78	0	
EB	0,63	0,60	0,64	0,53	0

Tableau IV.5. Distance génétique déterminée par la méthode de Kimura 2P entre les différentes populations étudiées : T : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie), CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande) et EB : *C. edule* atlantique (Bretagne).

Afin de déterminer l'origine de la variabilité génétique, un test d'AMOVA a été réalisé en regroupant les populations selon leur appartenance spécifique. Il a permis de confirmer que la variabilité interpopulationnelle s'explique pour 50,85% par la variabilité

interspécifique. Le reste de la variabilité est expliqué de façon quasi équivalente par des variabilités interpopulationnelles (25,07%) et intrapopulationnelles (24,09%).

Pour répondre à la question posée par la présence de 2 phénotypes dans la population méditerranéenne, nous avons analysé les séquences obtenues par ces 2 groupes en les considérant comme génétiquement indépendants. En comparant les nombres moyens de sites polymorphes déterminés pour la population méditerranéenne de *C. glaucum* (9,28± 3,59) et ceux déterminés pour les 2 phénotypes (4,12 ±2,28 *C. glaucum* à pied jaune ; 4,60±2,68 *C. glaucum* à pied orangé), une différence significative a été observée ($p < 0,05$). Le regroupement des séquences suivant le phénotype semble être supporté génétiquement. Ce résultat est confirmé par l'étude AMOVA qui explique 36,09% de variation est associée à la variabilité intrapopulationnelle et ce en divisant les populations de *C. glaucum* en 2 groupes : premier groupe contenant les *C. glaucum* méditerranéennes et un second groupe contenant les *C. glaucum* atlantiques et de la Mer du Nord. Cette ségrégation des séquences obtenues à partir des échantillons méditerranéennes n'a pas été révélée par le réseau de relation entre les séquences construit à partir du programme Median Joining Network (Fig IV. 6).



C. glaucum méditerranéenne à pied jaune

C. glaucum méditerranéenne à pied orangé

C. glaucum de la Mer du Nord

C. glaucum de l'Atlantique

Figure IV.6. Réseau de relation entre les séquences d'ITS1 montrant les relations entre les différents haplotypes de *C. glaucum* et de *C. edule* (les valeurs numériques correspndents aux numéros d'haplotypes présentés dans le tableau IV.9)

3. Alignement des séquences de COI

Afin de confirmer ou infirmer les résultats obtenus à partir de l'information d'ITS1, une deuxième analyse a été effectuée en étudiant l'information obtenue à partir du gène COI. L'alignement des séquences COI est présenté dans la figure IV. 7. Ces séquences, déposées dans la banque génomique (Tableau IV. 9), possèdent une longueur comprise entre 525 pb et 615 pb avec 273 sites variables dont 184 sont informatifs pour *C. glaucum* et une longueur de 501 pb avec 95 sites variables dont 63 sont informatifs pour *C. edule*. La composition en G+C des séquences COI de *C. glaucum* et de *C. edule* est 43,54% et 45,16%, respectivement. Les 43 séquences de COI de *C. glaucum* ont permis de décrire 17 haplotypes contenant 190 transitions et 148 transversions. Les 9 séquences de COI de *C. edule* ont permis de décrire 4 haplotypes contenant 91 transitions et 64 transversions.

```
O1(4)          ---GGGCCTTGTTTA--GAAATTAT-AGGGCGGACTG-AG---CTTTCCCGCCCTTCTTC
O2(1)          ---GGACCATGTCTG--GAAATTAT-TGGGCGAACGG-AG---CTATCGCGGCCATCATC
O3(3)          ---GGGCCATGTCTG--GAAATTAT-AGGACGAACGG-AG---CTGTCACGACCATCATC
O4(1)          ---GGGCCGTGTCTG--GAAATTAT-TGGGCGAACAG-AG---CTATCGCGACCGTCATC
O5(1)          ---GGACCATGTCTA--GAAATTAT-AGGACGGACTG-AG---CTGTCACGGCCTTCGTC
EH1(3)         ----------------CGTATTAT-AGTACGTACCG-AG---CTCTCACGGCC-TCTCC
EH2(2)         ----------------CGAATTAT-AGTGCGGACTG-AG---CTTTCCCGCCC-TCTTC
EH3(3)         ----------------CGGATTAT-AGTCCGCACAG-AG---CTATCGCGTCC-GCTAC
EH4(1)         ----------------CGCATTAT-AGTTCGAACGG-AG---CTGTCTCGACC-CCTGC
J1(5)          ---GGAGCACATCTATCAGAGCTAT-TTTGTGGACAGCAGTCACTAGTACGACT-ACTAG
J2(2)          ---GGGGCGCATCTATCGGAACTAT-TTTGTGGACAACAGTCGCTAGTCCGACT-ACTAG
J3(1)          ---GGGGCACATCTTTCAGAATTAT-TTTGCGGACAGCAGTCTCTCGTCCGTCT-TCTTG
CB1(3)         ---GAGGGACCTCTTTTAGAATTATTAGTGCGGACTG-AG---CTTTCCCGCCCCTCTTC
CB2(3)         GAGGGACCACTTCTA---GAACTGCTAGTTCGAACTGAA----CTATTACGGCCCCCGTC
CB3(2)         GAGGGGCCACTGCTT---GAACTGCTAGTGCGAACAG-AA---CTGTCACGGCCCCTATC
CB4(4)         GAGGGGCCGCTACTG---GAACTTCTTGTACGGACAG-AA---CTGTTGCGACCCCCTTC
CB5(3)         GAGGGACCACTGCTG---GAACTACTGGTACGTACGG-AA---CTATCCCGACCCCTATC
CH1(2)         ---GGAGCCCATTTTTCGTATCTAT-TTTGGGGACAGAAGCCGCCAGCTCGACT-CTTTG
CH2(3)         ---GGTGCTCATTTTTCTTATCTGT-TTTGGGGTCAGAAGCCACCGGCACG-CCTATTTG
CH3(2)         ---GGCGCGCATTTTTCCTATCTGT-TTTGGGGCCAGAAGCCCCCTGCGCGGCT-GTTTG
CH4(3)         ---GGGGCACATTTTTCATATTTAT-TTTGGGGGCAGAAGCCTCCCGCCCGTCT-TTTTG
                                        *        *  *   *    *     ** *

O1             ATCATTGCATAATCATGGGCTATATAATCTTATCATCACAAGGCATGCTTTAATTATAAA
O2             GTCACTGCATAATCATGGGCTATATAATCTAATCATCACACGGCATGCACTAATTATAAA
O3             ATCGCTACATAATCATGGGCTATATAATCTTATCATCACGCGACATGCGCTGATTATAAA
O4             GTCGCTACATAATCATGGACTATATAATCTGATCATCACACGACATGCACTAATTATAAA
O5             ATCACTGCATAATCATGGACTGTATAATCTAATCATCACACGGCATGCACTGATTATAAA
EH1            ATC--TCCATAATCATGGTCTTTATAATCTGATCATCACGCGACATGCTCTAATTATAA-
EH2            ATC--TGCATAATCATGGGCTATATAATCTTATCATCACACGGCATGCTCTAATTATAA-
EH3            ACC--TACATAATCATGGACTGTATAACCTAATCATCACCCGCCATGCTCTCATTATAA-
EH4            ATC--TTCATAATCATGGCCTCTACAATCTCATCATCACTCGGCACGCTCTGATTATAA-
J1             ATT--TTCATAATCATGGGCTATATAATCTAATTATTACACGACATGCACTGATCATAAT
J2             ATT--TTCATAATCATGGACTATATAATCTGATTATTACGCGACATGCACTAATCATAAT
J3             ACT--TTCATAATCATGGGCTATACAATCTTATTATTACAAGACACGCTTTGATCATAAT
CB1            ATCATTGCATAATCATGGGCTATATAATCTTATCATCACAAGGCATGCTTTAATTATAA-
CB2            AACACTTCACAATCACGGGCTATATAATCTAATCATCACACGACATGCCCTAATTATAAT
CB3            AATCCTCCATAATCACGGACTGTATAATCTAATCATCACCCGACATGCACTAATTATAA-
CB4            GACACTACATAATCATGGACTATATAATCTGATCATCACGCGGCATGCCCTGATTATAAT
CB5            GATGCTGCATAATCATGGCCTGTATAATCTGATCATCACTCGGCATGCACTGATTATAA-
CH1            ATT--TTCTGAATCATGGACAATCGAACCTAATTATTCCTCGACCTCCACTCATCATAA-
CH2            ACT--TTCTAAACCACGGTCAATCCAATCTCATTATTCCGCGGCCACCCCTAATCATAAT
CH3            ATT--TTCTGAATCACGGCCAATCTAATCTGATTATTCCCCGGCCGCCGCTTATCATAAT
CH4            ACT--TTTTAAACCATGGGCAATCAAACCTTATTATTCCAAGACCCCCTTTGATCATAAT
                    *    ** ** ** *  *  ** ** ** **  *  * *   *  * ** ****
```

```
O1              TTTTCTTTTATGGTCATGCCGGGTTATGATAGGAGGGTTTGGTAACTGGTTGGTACCTTT
O2              TTTTCTACTGTGGTCATGCCGGGTTATGATAGGAGGGTTTGGTAACTGGTTGGTACCTTT
O3              TTTTCTGCTGTGGTCGTGTCGGGTAATGATAGGGGGATTTGGGAATTGGCTGGTGCCGCT
O4              TTTTCTGCTATGGTCGTGTCGAGTGATGATAGGGGGATTTGGAAACTGGCTAGTGCCACT
O5              TTTTCTACTGTGGTCATGCCGAGTTATGATAGGAGGGTTTGGAAACTGGCTAGTACCGCT
EH1             TTTTTT-TCATAGTTATGCCT-GTTATGATAGGTGGATTTGGAAACTGGCTTGTTCCCCT
EH2             TTTTCT-TTATAGTGATGCCG-GTTATGATAGGAGGGTTTGGTAATTGGCTGGTGCCTCT
EH3             TTTTCT-TTATAGTAATGCCA-GTTATGATAGGGGGCTTTGGCAATTGGCTCGTCCCACT
EH4             TTTTCT-TTATAGTCATGCCG-GTTATGATAGGCGGTTTTGGGAACTGGCTAGTGCCGCT
J1              TTTTTT--TATGGTGATGCCA-GTGATTATGGGAGGGTTTGGAAATTGGGTGAGACCGCT
J2              TTTTTT--TATGGTAATGCCA-GTGATTATGGGAGGATTTGGGAATTGGGTGAGACCGCT
J3              TTTTTT--TATGGTGATGCCA-GTGATAATGGGTGGTTTTGGTAATTGGGTGAGTCCGTT
CB1             TTTTCT-TTATAGTGATGCCG-GTTATGATAGGAGGGTTTGGTAACTGGTTGGTACCTTT
CB2             ATTTTT--TATAGTAATGCCA-GTAATGATAGGAGGATTTGGAAATTGGCTAGTACCACT
CB3             TATTCT-TTATAGTGATGCCA-GTGATGATAGGGGGGTTTGGAAACTGGCTTGTACCTCT
CB4             TTTTTT--TATAGTGATGCCA-GTTATGATAGGGGGATTTGGGAATTGGCTGGTGCCGCT
CB5             TATTCT-TTATAGTAATGCCG-GTAATGATAGGAGGGTTTGGGAACTGGCTTGTGCCACT
CH1             TTTTCT-TCATGGGTATCCCT-GTAATAAAGGGCGGATTTGGAAATTGGGTAAGCCCACT
CH2             TTTTTT--TATGGGAATCCCA-GTGATAAAGGGAGGTTTCGGGAACTGGGTTAGACCTCT
CH3             TTTTTT--CATGGGCATCCCC-GTTATAAAGGGTGGCTTCGGCAATTGGGTCAGGCCCCT
CH4             TTTTTT--TATGGGGATCCCC-GTCATAAAGGGGGGGTTTGGTAATTGGGTGAGTCCGTT
                  ** *    * *   *  *  ** ** *  ** ** ** ** ** *** *    **  *

O1              AATACTAATAGT-CCCTGACATACATTTTCCCCGTTTAAATAATATAAGATTTTGGTTGG
O2              AATACTAATAGT-CCCTGACATACATTTTCCCCGTTTAAATAATATAAGATTTTGGTTGG
O3              GATACTGATAGT-CCCAGACATACATTTTCCCCGTCTAAATAATATACGGTTTTGGCTAG
O4              GATACTGATAGT-CCCTGATATACATTTTCCCCGACTAAATAATATACGGTTTTGGCTGG
O5              AATACTAATAGT-CCCTGACATACATTTTCCCCGTCTAAATAATATACGATTTTGGCTAG
EH1             TATACTCATAGT-ACCCGATATACACTTTCCACGGCTAAACAACATACGATTCTGGTTTG
EH2             AATACTAATAGT-CCCTGATATACATTTTCCCCGACTAAATAATATACGATTTTGGTTTG
EH3             GATACTGATAGT-TCCAGACATACATTTTCCTCGACTCAATAATATACGGTTCTGGTTTG
EH4             AATACTTATAGT-GCCGGATATACATTTTCCGCGGCTGAATAACATACGGTTTTGGTTTG
J1              AATACTGATGGTACCACGAAAAACATTTTCATCA-CTGAATAATATACGATTTTGGTTTG
J2              AATACTAATGGTACCCCGAAAAACGTTTTCATCA-CTGAATAATATACGGTTTTGGTTTG
J3              AATATTGATGGTACCCCGAAAAACATTTTCCTC-CTTGAACAATATAAGATTTTGGTTTG
CB1             AATACTAATAGT-CCCTGACATACATTTTCCCCGTTTAAATAATATAAGATTTTGGTTCG
CB2             AATACTTATAGT-ACCAGATATACATTTTCCCCGACTGAATAATATACGATTTTGGTTTG
CB3             GATACTAATAGT-TCCTGACATACATTTTCCACGCCTAAATAATATACGATTTTGGTTTG
CB4             AATACTTATAGT-GCCAGATATACATTTTCCTCGTCTGAATAATATACGGTTTTGGTTTG
CB5             GATACTGATAGT-CCCGGACATACATTTTCCGCGGCTGAATAATATACGGTTTTGGTTCG
CH1             AATACTCATGGGGCCGCGGAAAAC-TTTTCCTTCACTAAACAATATACGGTTCTGTTTTG
CH2             GATACTAATGGGCCCACGTAAAACGTTCCCATC-TCTTAATAATATACGTTTTTGCTTTG
CH3             GATACTTATGGGTCCTCGCAAAACCTTTCCGTC-CCTCAATAATATACGCTTTTGTTTTG
CH4             AATATTGATGGGACCCCGAAAAACATTTCCCTCG-TTGAACAATATAAGATTTTGTTTTG
                 *** * ** *   *  *  * **  *  *      * ** ** *** * ** **  * *

O1              TTCCAAATGCTCTTATTTTACTAGCGTTTTCCGGCTTTGTGGAAGGGGGGGTATGGCCCT
O2              TTCCAAATGCTCTTATTTTACTAGCGTTTTCCGGCTTTGTGGAAGGGGGGGTATGGCCCT
O3              TACCGAATGCACTAATTCTGCTGGCGTTTTCCGGCTTTGTGGAAGGAGGGGTGTGGCCCT
O4              TGCCAAATGCACTGATTCTACTAGCATTTTCCGGCTTTGTAGAAGGAGGGGTATGGCCCT
O5              TTCCAAATGCACTAATTCTACTGGCATTTTCCGGCTTTGTAGAAGGGGGGGTATGGCCCT
EH1             TGCCGAACGCTCTTATTCTGCTAGCCTTTTCTGGTTTCGTCGAAGGGGGGGTA-GGCGCA
EH2             TACCAAATGCACTAATTCTACTAGCGTTTTCGGGCTTTGTCGAAGGGGGGGTA-GGCGCA
EH3             TTCCAAATGCGCTCATTCTTCTAGCATTCTCAGGGTTTGTCGAAGGAGGCGTC-GGAGCA
EH4             TCCCGAATGCCCTGATTCTTCTAGCGTTCTCCGGATTTGTCGAAGGCGGAGTG-GGGGCT
J1              TTCCAAATGCACTAATCCTGCTAGCATTTTCAGGATTTGTAGAAGGGGGGGTATGGGGAT
J2              TTCCGAATGCACTAATCCTACTAGCATTTTCAGGGTTTGTAGAAGGGGGGGTATGGGGGT
J3              TTCCAAATGCTCTAATCCTGTTAGCATTTTCTGGATTCGTAGAAGGTGGTGTTTGGGGCT
CB1             TTCCAAATGCTCTTATTTTACTAGCGTTTTCCGGCTTTGTGGAAGGGGGGGTA-GGCGCT
CB2             TACCAAATGCACTAATTCTGCTGGCATTTTCCGGATTTGTAGAAGGAGGAGTA-GGAGCA
CB3             TCCCTAATGCGCTCATTCTACTAGCCTTTTCAGGATTTGTCGAAGGAGGAGTT-GGTGCT
CB4             TGCCGAATGCGCTGATTCTCCTTGCTTTTTCTGGCTTTGTGGAAGGCGGTGTG-GGGGCC
CB5             TTCCGAATGCGCTTATTCTTCTCGCGTTTTCGGGGTTTGTAGAAGGGGGCGTC-GGAGCG
CH1             TACCTAATGCGCTGATCCTACTGGCGTTTTCAGGTTTCGTTGAAGGCGGAGTCTGGGGAT
CH2             TCCCCAACGCACTAATCCTCCTAGCCTTCTCGGGGTTTGTGGAAGGAGGCGTATGGGGTT
CH3             TGCCGAACGCGCTGATCCTGCTGGCGTTCTCGGGGTTCGTCGAAGGGGGGGTGTGGGGGT
CH4             TTCCAAATGCTCTAATCCTGTTAGCATTTTCTGGATTCGTAGAAGGTGGTGTTTGGGGCT
                * ** ** ** ** **  *  * ** ** ** ** ** ** ***** ** **  **

O1              GGTTGAACCATTTACCCCCCCCTCACTTCAAT-GAATTTTTGGGTGACCCGTCCATGGAT
O2              GGTTGAACCATTTACCCCCCCCTCACTTCAAT-GAATTTTTGGGTGACCCGTCCATGGAT
O3              GGCTAAATCATCTGCCGCCGCCACACTTCAAT-GAATTTCTGGGGGATCCATCGATGGAT
O4              GGCTGAACCATCTGCCCCCACCGCATTTTAAT-GAATTTCTGGGAGATCCATCAATGGAT
O5              GGCTGAATCATCTACCACCCCCTCATTTTAAT-GAATTTCTAGGAGACCCGTCAATGGAT
EH1             GG---TACTATTTATCCCCCACTCACCTCTATTGAATTCCTCGGAGACCCATCCATGGAT
EH2             GG---AACCATTTACCCACCACTCACATCAATTGAATTTCTGGGTGACCCGTCAATGGAT
EH3             GG---GACGATTTATCCACCATTAACATCCATTGAATTTCTAGGAGATCCATCGATGGAT
```

```
EH4             GGC---ACAATTTACCCGCCGCTGACGTCGATTGAATTCCTTGGCGATCCTTCAATGGAT
J1              GGCTGAATTATCTACCACCACTACATTTTGAT-GCATTTCTGGGGGATCCGTCAATAGAT
J2              GGCTGAATTATCTACCACCGCTACATTTTGAT-GCATTTCTGGGGGATCCATCAATAGAT
J3              GGTTGAACTATTTACCCCCCCTTCACTTCGAT-GCATTCTTGGGGGACCCTTCAATAGAC
CB1             GGTTCAACCATTTACCCCCCCCTCACTTCAATTGAATTTTTGGGTGACCCGTCCATGGAT
CB2             GGGTCTACTATTTATCCTCCGCTTACATCAATTGAATTTCTCGGTGACCCGTCGATGGAT
CB3             GGCTCGACTATTTATCCACCACTAACATCAATTGAATTTCTAGGCGATCCATCAATGGAT
CB4             GGATCCACAATTTATCCCCCGCTCACGTCGATTGAATTTCTGGGAGACCCATCAATGGAC
CB5             GGATCAACGATTTACCCGCCACTGACGTCGATTGAATTTCTAGGGGATCCATCAATGGAT
CH1             GGCTCAACTACCTGTCGCCACTACATTTYGAT-GAATTCCTAGGCGGACCTTCGATAGAT
CH2             GGCTAAATTATCTTTCACCTCTTCACTTYGAT-GAATTTCTTGGTGGGCCGTCCATAGAC
CH3             GGCTAAATTATCTCTCACCGCTGCATTTYGAT-GAATTTCTCGGAGGACCGTCTATAGAT
CH4             GGTTGAACTATTTATCCCCCCTTCACTTCGAT-GAATTCTTGGGGGGCCCTTCAATAGAC
                **    *  *  *  *  *     *  *  ** * ***  * ** *  ** ** ** **

O1              TTGGCTATTTTTGCCTTACATTTAGGGGGAATTTCTTTTATTGCGGCCAGGCTAAACTTT
O2              TTGGCTATTTTTGCCTTACATTTAGGGGGAATTTCTTTTATTGCGGCCAGGCTAAACTTT
O3              CTAGCTATTTTTGCACTGCATCTGGGAGGAATTTCGTTTATTGCAGCACGACTGAATTTT
O4              CTAGCAATTTTTGCGCTACATCTAGGAGGAATTTCATTTATTGCGGCACGACTAAATTTT
O5              CTGGCGATTTTTGCACTGCATCTGGGAGGGATTTCATTTATTGCAGCCCGGCTAAATTTT
EH1             CTGGCGATTTTTGCACTTCACCTTGGGGGCATTTCCTCGATTGCAGCTCGACTTAACTTT
EH2             CTGGCAATTTTTGCCCTACATCTAGGAGGTATTTCATCAATTGCGGCCCGGCTAAATTTT
EH3             CTAGCTATTTTCGCTCTGCATCTGGGCGGAATTTCGTCGATTGCTGCACGCCTGAATTTT
EH4             CTAGCCATTTTCGCGCTCCATCTCGGTGGGATTTCTTCAATTGCCGCGCGGCTCAATTTT
J1              CTGGCAATTTTTGCGCTACATCTAGGGGGAATCTCGTTTATTGCAGCAAGACTGAATTTT
J2              CTGGCAATTTTTGCGCTACATCTGGGGGGAATCTCGTTTATTGCAGCAAGACTGAATTTT
J3              TTGGCTATTTTTGCGCTACACCTAGGGGGAATCTCTTTTATTGCAGCAAGTCTGAATTTC
CB1             TTGGCTATTTTTGCCTTACATTTAGGGGGAATTTCTTTTATTGCGGCCAGGCTAAACTTT
CB2             CTAGCTATTTTTGCGCTACATCTAGGGGGGATTTCATTTATTGCAGCACGGCTAAACTTT
CB3             CTAGCGATTTTTGCTCTCCATCTTGGGGGGATTTCGTTTATTGCAGCCCGTCTTAATTTT
CB4             CTGGCAATTTTTGCCCTGCATCTGGGGGGTATTTCATTTATTGCGGCGCGACTGAACTTT
CB5             CTGGCCATTTTTGCACTGCATCTCGGGGGAATTTCGTTTATTGCGGCTCGCCTGAATTTT
CH1             CTTGCAATTTTTGCTCTGCACCTAGGGGGTATCTCATTCATTGCTGCTAGCCTAAACTTT
CH2             CTAGCCATTTTCGCACTACATCTGGGAGGAATCTCCTTTATTGCGGCCAGACTGAATTTC
CH3             CTCGCGATTTTTGCCCTGCATCTAGGAGGCATCTCGTTTATTGCCGCGAGGCTAAATTTT
CH4             TTGGCTATTTTTGCGCTACACCTAGGGGGGATCTCTTTTATTGCAGCAAGTCTGAATTTC
                 * ** ***** **  * **  * ** ** ** ** *  ***** **  * ** ** **

O1              TTTTCAACCGCTATCAACATACGCCAAAGGCAGCGGAGGGTTCACAAAAACCCTATACTA
O2              TTTTCAACCGCTATCAACATACGCCAAAGGCAGCGGAGGGTTCACAAAAACCCTATACTA
O3              TTTTCGACAGCGATCAACATACGCCAACGACAGCGACGGGTTCACAAAAACCCTATACTA
O4              TTTTCGACAGCAATCAATATACGCCAACGGCAGCGACGAGTTCACAAAAACCCTATACTA
O5              TTTTCAACCGCAATCAATATACGCCAACGACAGCGGCGAGTTCACAAAAACCCTATACTA
EH1             TGTTCGACTGCCATCAATATACGCCAACGGCAGCGGTGGGTTCATAAAATACCTATACTA
EH2             TGTTCAACCGCAATCAATATACGCCAACGGCAGCGGTGGGTTCATAAAATACCTATACTA
EH3             TGCTCGACTGCGATCAATATACGCCAACGGCAGCGGTGGGTTCATAAAATACCTATACTA
EH4             TGCTCAACCGCTATCAATATACGCCAACGGCAGCGGTGGGTTCATAAAATACCTATACTA
J1              TGTTCGACGGCAATTAATATGCGACAGCGACAACGACGGGTGCATAAAATTCCAATACTA
J2              TGTTCGACGGCAATTAATATGCGACAGCGACAACGACGGGTGCATAAAATTCCAATACTA
J3              TGTTCGACTGCTATTAATATGCGACAGAGACAACGAAGGGTGCACAAAATTCCAATATTA
CB1             TGTTCAACTGCTATCAACATACGCCAAAGGCAGCGGAGGGTTCACAAAATCCCTATACTA
CB2             TGTTCAACTGCTATCAACATACGCCAAAGGCAGCGGAGGGTTCACAAAATCCCTATACTA
CB3             TGTTCAACTGCTATCAACATACGCCAAAGGCAGCGGAGGGTTCACAAAATCCCTATACTA
CB4             TGTTCAACTGCTATCAACATACGCCAAAGGCAGCGGAGGGTTCACAAAATCCCTATACTA
CB5             TGTTCAACTGCTATCAACATACGCCAAAGGCAGCGGAGGGTTCACAAAATCCCTATACTA
CH1             TGTTCGACTGCTATTAATATGCGACAGAGACAAAGAAGGGTGCACAAAAATCCCATATTA
CH2             TGTTCGACTGCTATTAATATGCGACAGAGACAAAGAAGGGTGCACAAAAATCCCATATTA
CH3             TGTTCGACTGCTATTAATATGCGACAGAGACAAAGAAGGGTGCACAAAAATCCCATATTA
CH4             TGTTCGACTGCTATTAATATGCGACAGAGACAAAGAAGGGTGCACAAAAATCCCATATTA
                *  ** ** ** ** ** ** ** **  * **  *  * ** ** ****  ** *** **

O1              CCTATTTCTTTAGCTATTACAGCCCTACTATTGATTATCGCGATGCCGGTGCTGGCTGGT
O2              CCTATTTCTTTAGCTATTACAGCCCTACTATTGATTATCGCGATGCCGGTGCTGGCTGGT
O3              CCTATTTCTTTAGCTATTACAGCCCTACTATTGATTATCGCGATGCCGGTGCTGGCTGGT
O4              CCTATTTCTTTAGCTATTACAGCCCTACTATTGATTATCGCGATGCCGGTGCTGGCTGGT
O5              CCTATTTCTTTAGCTATTACAGCCCTACTATTGATTATCGCGATGCCGGTGCTGGCTGGT
EH1             CCAATTTCACTAGCAATTACAGCCCTACTACTGATTATCGCAATGCCGGTGCTG------
EH2             CCAATTTCACTAGCAATTACAGCCCTACTACTGATTATCGCAATGCCGGTGCTG------
EH3             CCAATTTCACTAGCAATTACAGCCCTACTACTGATTATCGCAATGCCGGTGCTG------
EH4             CCAATTTCACTAGCAATTACAGCCCTACTACTGATTATCGCAATGCCGGTGCTG------
J1              CCAATTTCACTAGCGATTACAGCACTACTACTGATTATTGCAATGCCGGTGCTGGC----
J2              CCAATTTCACTAGCGATTACAGCACTACTACTGATTATTGCAATGCCGGTGCTGGC----
J3              CCAATTTCCCTAGCGATTACAGCTCTTTTATTGATTATTGCTATGCCGGTTCTGGC----
CB1             CCTATTTCTTTAGCTATTACAGCCCTACTATTGATTATCGCGATGCCGGTGCTGGCTGGT
CB2             CCTATTTCTTTAGCTATTACAGCCCTACTATTGATTATCGCGATGCCGGTGCTGGCTGGT
CB3             CCTATTTCTTTAGCTATTACAGCCCTACTATTGATTATCGCGATGCCGGTGCTGGCTGGT
CB4             CCTATTTCTTTAGCTATTACAGCCCTACTATTGATTATCGCGATGCCGGTGCTGGCTGGT
CB5             CCTATTTCTTTAGCTATTACAGCCCTACTATTGATTATCGCGATGCCGGTGCTGGCTGGT
```

```
CH1             CCAATTTCCCTAGCGATTACAGCTCTTTTATTGATTATTGCTATGCCGGTTCTGGCG---
CH2             CCAATTTCCCTAGCGATTACAGCTCTTTTATTGATTATTGCTATGCCGGTTCTGGCG---
CH3             CCAATTTCCCTAGCGATTACAGCTCTTTTATTGATTATTGCTATGCCGGTTCTGGCG---
CH4             CCAATTTCCCTAGCGATTACAGCTCTTTTATTGATTATTGCTATGCCGGTTCTGGCG---
                ** *****  **** ******** **  ** ******* ** ******** ***

O1              GCGCTTACTATACTCCTTTTAGATCGTAATTTTGCTACAAGATTCTTT------------
O2              GCGCTTACTATACTCCTTTTAGATCGTAATTTTGCTACAAGATTCTTT------------
O3              GCGCTTACTATACTCCTTTTAGATCGTAATTTTGCTACAAGATTCTTT------------
O4              GCGCTTACTATACTCCTTTTAGATCGTAATTTTGCTACAAGATTCTTT------------
O5              GCGCTTACTATACTCCTTTTAGATCGTAATTTTGCTACAAGATTCTTT------------
EH1             ------------------------------------------------------------
EH2             ------------------------------------------------------------
EH3             ------------------------------------------------------------
EH4             ------------------------------------------------------------
J1              ------------------------------------------------------------
J2              ------------------------------------------------------------
J3              ------------------------------------------------------------
CB1             GCGCTTACTATACTCCTTTTAGATCGTAATTTTGCTACAAGATTCTTTGATCCCGTTGGT
CB2             GCGCTTACTATACTCCTTTTAGATCGTAATTTTGCTACAAGATTCTTTGATCCCGTTGGT
CB3             GCGCTTACTATACTCCTTTTAGATCGTAATTTTGCTACAAGATTCTTTGATCCCGTTGGT
CB4             GCGCTTACTATACTCCTTTTAGATCGTAATTTTGCTACAAGATTCTTTGATCCCGTTGGT
CB5             GCGCTTACTATACTCCTTTTAGATCGTAATTTTGCTACAAGATTCTTTGATCCCGTTGGT
CH1             ------------------------------------------------------------
CH2             ------------------------------------------------------------
CH3             ------------------------------------------------------------
CH4             ------------------------------------------------------------


O1              ---------------------------
O2              ---------------------------
O3              ---------------------------
O4              ---------------------------
O5              ---------------------------
EH1             ---------------------------
EH2             ---------------------------
EH3             ---------------------------
EH4             ---------------------------
J1              ---------------------------
J2              ---------------------------
J3              ---------------------------
CB1             GTAGACCCCATCCCATTCACATTTTCC
CB2             GTAGACCCCATCCCATTCACATTTTCC
CB3             GTAGACCCCATCCCATTCACATTTTCC
CB4             GTAGACCCCATCCCATTCACATTTTCC
CB5             GTAGACCCCATCCCATTCACATTTTCC
CH1             ---------------------------
CH2             ---------------------------
CH3             ---------------------------
CH4             ---------------------------
```

Figure IV.7. Alignement des séquences de COI. Les fréquences de séquences sont entre parenthèses. O : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie) à pied orangè, J : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie) à pied jaune CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande).

Afin d'établir une différenciation génétique au niveau intrapopulationnel, Quatre populations ont été définies (*C. glaucum* méditerranéenne, *C. glaucum* atlantique, *C. glaucum* de la Mer du Nord et *C. edule* de la Mer du Nord) et le nombre moyen de sites polymorphes des séquences prises 2 à 2 a été déterminé. Cette valeur varie de 6 ± 3,12 à 15,34± 6,37 (tableau IV. 6).

Population	T	CB	CH	EH
le nombre moyen de sites polymorphes des séquences prises 2 à 2	15,34±6,37	9,42±4,61	9,87±3,81	6±3,12

Tableau IV.6. Nombre moyen de sites polymorphes des séquences de COI prises 2 à 2 des différentes populations étudiées. T : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie), CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande).

Au niveau interpopulationnel, la moyenne non corrigée des différences des séquences prises 2 à 2 a été déterminée (tableau IV. 7). Une moyenne de 108,59 ±18,08 en intraspécifique et de 115,76± 17,11 en interspécifique a été observée. Les distances génétiques déterminées en intraspécifique ont une moyenne de 0,57± 0,12 pour *C. glaucum*. En interspécifique, ces distances ont une moyenne de 0,68 ± 0,14 (tableau IV. 8) Afin d'établir l'origine des variations génétiques, un test d'AMOVA a été réalisé en regroupant les populations selon leur appartenance spécifique. Il a permis de confirmer que la variabilité interpopulationnelle s'explique pour 50,23% par la variabilité interspécifique.

	T	CH	EH
CB	112,53	124,24	132,97
T		88,17	115,57
CH			98,75

Tableau IV.7. Moyenne non corrigée des différences des séquences COI prises 2 à 2 des différentes populations : T : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie), CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande).

	CB	T	CH	EH
CB	0			
T	0,63	0		
CH	0,67	0,44	0	
EH	0,84	0,64	0,56	0

Tableau IV.8. Distance génétique déterminée par la méthode Kimura 2P entre les populations étudiées. T : *C. glaucum* méditerranéenne (Tunisie), CB : *C. glaucum* atlantique (Bretagne), CH : *C. glaucum* de la Mer du Nord (Hollande), EH : *C. edule* de la Mer du Nord (Hollande).

En ce qui concerne les 2 phénotypes dans la population méditerranéenne, nous avons analysé les séquences obtenues par ces 2 groupes en les considérant comme

génétiquement indépendants. En comparant les nombres moyens de sites polymorphes déterminés pour la population entière de *C. glaucum* méditerranéenne (15,34±6,37) et ceux déterminés pour les 2 phénotypes (4,49 ±2,41 pour les *C. glaucum* à pied orangé ; 4,18±2,77 pour les *C. glaucum* à pied jaune), une différence significative a été observée ($p < 0.05$). Ce qui reflète une ségrégation génétique des deux phénotypes de la population méditerranéenne de *C. glaucum*. Ce résultat est confirmé par l'étude AMOVA qui explique 40,36% de variation est associée à la variabilité intrapopulationnelle et ce en divisant les populations de *C. glaucum* en 2 groupes : premier groupe contenant les *C. glaucum* méditerranéennes et un second groupe renfermant les *C. glaucum* atlantiques et de la Mer du Nord et par le réseau de relation entre les séquences (Fig. IV. 8) qui montre une séparation entre les haplotypes déterminés à partir des séquences COI de *C. glaucum* à pied jaune et à pied orangé.

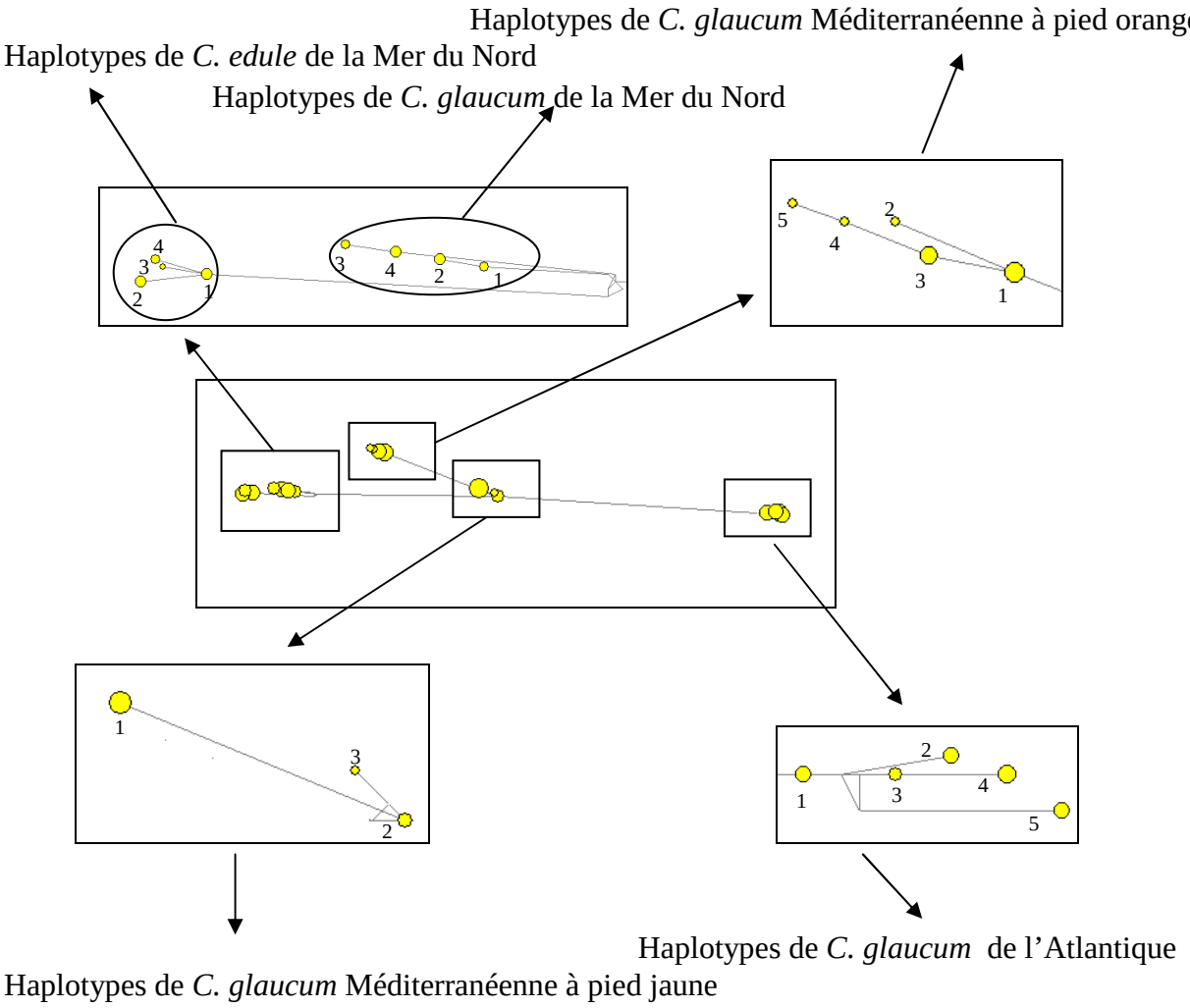


Figure IV.8. Réseau de relation entre les séquences de COI montrant les relations entre les différents haplotypes de *C. glaucum* et de *C. edule* (les valeurs numériques correspndents aux numéros d'haplotypes présentés dans le tableau IV.9)

Afin de comparer les distances génétiques obtenues par les 2 marqueurs étudiés, un test de Mantel entre les matrices de distances génétiques déterminées à partir des séquences ITS1 et COI a été réalisé. Le coefficient de corrélation obtenu est faible (r = 0,38, p = 0,07) ce qui traduit l'absence d'une relation significative entre les variations génétiques observées par ITS1 et celles observées par COI.

Espèce	Localisation	Numéro d'accession à GenBank		
		ITS1	**COI**	**28S**
C. glaucum	Méditerrannée (pied jaune)	(1)FJ179512 (2)FJ179513 (3)FJ179514 (4)FJ179515 (5)FJ179516 (6)FJ179517	(1)FJ179502 (2)FJ179503 (3)FJ179504	FJ179537
	(pied orangé)	(1)FJ179518 (2)FJ179519 (3)FJ179520 (4)FJ179521	(1)FJ179505 (2)FJ179506 (3)FJ179507 (4)FJ179508 (5)FJ179488	
	Atlantique	(1)FJ179522 (2)FJ179523	(1)FJ179489 (2)FJ179490 (3)FJ179491 (4)FJ179492 (5)FJ179493	
	La mer du nord	(1)FJ179524 (2)FJ179525 (3)FJ179526 (4)FJ179527 (5)FJ179528 (6)FJ179529	(1)FJ179494 (2)FJ179495 (3)FJ179496 (4)FJ179497	
C. edule	Atlantique	(1)FJ179530 (2)FJ179531 (3)FJ179532		FJ179536
	La mer du nord	(1)FJ179533 (2)FJ179534 (3)FJ179535 (4)FJ179509 (5)FJ179510 (5)FJ179511	(1)FJ179498 (2)FJ179499 (3)FJ179500 (4)FJ179501	

Tableau IV.9. Liste des numéros d'accession à GenBank des séquences de 28S, COI et ITS1 amplifiées, entre parenthèse les numéros des haplotypes.

D. Discussion

La différenciation entre *C. glaucum* et *C.edule* a longtemps été le sujet de discussions en raison de leur proximité morphologique. En 1978, Brock a utilisé le rapport entre la longueur du ligament et la largeur de la coquille comme critère de ségrégation des

deux espèces. Ce même auteur s'est aussi basé sur des critères biochimiques déterminés par l'électrophorèse des malate déhydrogenases et des tetrazolium oxydases (Brock, 1987). Bien que le polymorphisme enzymatique ait été largement utilisé pour fournir des marqueurs permettant l'identification des espèces, sa neutralité face à certains effets environnementaux (notamment la température) a été plusieurs fois contestée (Somero, 1995 ; Jollivet et al. 1995). L'hétérogénéité de l'habitat a aussi été reconnue comme ayant des effets diversifiants sur certains polymorphismes enzymatiques (Mitton et Grant, 1984 ; Hilbish et Koehn, 1985). De plus, son faible taux d'évolution fait que ce marqueur ne permet donc pas de quantifier finement les diversités existantes entre les populations. De ce fait, l'analyse moléculaire devrait être une piste d'étude intéressante pour résoudre la problématique de ségrégation entre *C. glaucum* et *C. edule*. Dans ce travail, des outils moléculaires ont été utilisés. Ces outils moléculaires correspondant aux séquences de 28S, ITS1 et COI nous ont permis d'établir les variabilités génétiques aussi bien entre les deux espèces qu'entre les différentes populations voir à l'intérieur de chaque population. La distance génétique entre *C. glaucum* et *C. edule* déterminée par les séquences de 28S est faible (0,033). Cette distance est du même ordre de grandeur que celles obtenues pour d'autres espèces appartenant au même genre telles que *R. decussatus* et *R. philipinarum* (0,036) et plus faible que celles entre *C. virginica* et *C. rhizophorae* (0,077) et entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis* (0,134). En se basant sur les séquences ribosomaux 16S, une distance génétique de 0,089 a été établie par Schneider et Foighil (1999) entre *C. glaucum* et *C. edule*. Cette distance est plus importante que celle obtenue par les séquences de 28S (0,033). De même, une diversité génétique plus importante a été déterminée par les séquences 16S (pourcentage de divergence des séquences prises 2 à 2: 36,9 %) par rapport aux séquences 28S (pourcentage de divergence des séquences prises 2 à 2: 14,1 %) au niveau du genre *Gammarus* (Hou et al. 2007). Ce résultat peut être expliqué par le fait que la vitesse d'évolution de l'ADN mitochondrial est plus rapide (5 à 10 fois) que celle de l'ADN nucléaire (Wilson et al. 1985).

Au delà de l'espèce les gènes ribosomaux 28S permettent d'établir des relations génétiques au niveau générique et même supragénérique (Park et Foighil, 2000) puisqu'ils sont ubiquistes et homogènes dans tous les types de cellules ainsi qu'en raison de la constance de leur structure (Woese, 1987). Dans ce travail, une moyenne de distances génétiques de 0,39± 0,12 a été établie entre le genre *Cerastoderma* et d'autres genres de la famille des cardiidaes. Cette moyenne est plus importante que celle obtenue entre le genre *Ruditapes* et d'autres genres de la famille des veneridaes (0,076 ± 0,039) (Tableau IV.2).

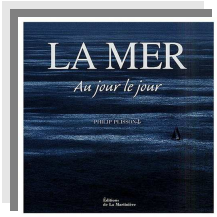
Les séquences d'ITS1 amplifiées, ont une teneur de 57,65% en G+C chez *C. glaucum* et de 54,95% chez *C. edule*. Cette teneur est plus importante que celle décrite chez les moules (35%) par Insua et ses collaborateurs (2003). Ce qui traduit la grande variabilité au niveau de la composition nucléotidique des séquences ITS1. Par exemple chez certaines espèces de crustacés (Pelliccia et al. 1998) et de poissons (Sajdak et al. 1998; Sola et al. 2003), les séquences d'ITS1 sont riches en A+T (73% et >57%, respectivement) par contre chez les mammifères (Suzuki et al. 1994) ces régions sont riches en G+C (>60%). La teneur en G+C des séquences de COI de *C. glaucum* et *C. edule* déterminée dans ce travail (43,54% et 45,16 %, respectivement) est plus importante que celle obtenue chez les moules *M. edulis* (37.40%) (Riginos et Henzler, 2008) et *M. galloprovincialis* (35.50%) (Zardi et al. 2007).

Les résultats obtenus par l'étude des séquences d'ITS1 ont montré que la variabilité génétique au niveau intrapopulationnelle de *C. glaucum* (la moyenne de nombre moyen de sites polymorphes des séquences prises 2 à 2 : 8,47 ± 1,62) est similaire à celle obtenue pour *C. edule* (la moyenne de nombre moyen de sites polymorphes des séquences prises 2 à 2 : 8,82 ± 0,94). Cependant les séquences de COI ont montré que cette variabilité est plus importante chez les populations de *C. glaucum* (la moyenne de nombre moyen de sites polymorphes des séquences prises 2 à 2 : 11,54 ± 3,29 que celle obtenue pour la population de *C. edule* (nombre moyen de sites polymorphes des séquences prises 2 à 2 : 6 ± 3,12). Ce dernier résultat est en accord avec celui obtenu par Freire et ses collaborateurs (2005) qui ont montré la présence d'une variabilité génétique intrapopulationnelle chez *C. glaucum* qui est plus importante que celle observée chez *C. edule*. Cette variabilité a été déterminée grâce à l'alignement des séquences de l'ADN ribosomique 5S. Néanmoins, les résultats obtenus par l'électrophorèse d'isoenzymes ont montré une variabilité génétique intrapopulationnelle plus importante chez *C. edule* que chez *C. glaucum* (Hummel et al. 1994). La présence de cette différence accentue l'importance de l'utilisation de l'ADN comme marqueur génétique en raison de sa grande stabilité par rapport aux protéines (Freire et al. 2005).

Au niveau interpopulationnel, les séquences d'ITS1 ont montré une variabilité entre les populations de *C. edule* plus importante que celle entre les populations de *C. glaucum*. Ces résultats, comme c'est le cas en intrapopulationnel, ne rejoignent pas ceux obtenus par Hummel et ses collaborateurs (1994) qui ont montré une variabilité génétique plus intense entre les populations de *C. glaucum* qu'entre celles de *C. edule*. Hualkasin et ses collaborateurs (2003) ont utilisé l'intron du gène amylase afin d'étudier la divergence

génétique entre différentes populations de *Penaeus merguiensis* les résultats ont montré la présence de différence entre les populations du golfe de Thailande alors que cette différence n'a pas été détectée au niveau des populations de la mer d'andaman. Pour cette raison, Wanna et ses collaborateurs (2006) ont mentionné qu'il est préférable d'utiliser un marqueur plus variable tel que l'ITS1 pour déterminer la variabilité génétique entre les populations de *Penaeus merguiensis*. Ce qui traduit l'importance de l'utilisation de ce marqueur au niveau interpopulationnel.

Compte tenu de la variabilité génétique observée chez la population de *C. glaucum* méditerranéenne, une ségrégation des séquences d'ITS1 et de COI sur la base phénotypique a été réalisée. Les résultats obtenus ont montré qu'il s'agit de deux groupes génétiquement indépendants. Ce résultat pertinent a permis de définir deux sous populations de *C. glaucum* méditerranéenne en se basant sur des données phénotypiques et génotypiques. Aucune étude n'a été réalisée afin d'établir une différenciation génétique entre des individus de bivalves phénotypiquement différents et qui appartiennent à la même population. Cette étude apporte une nouvelle information concernant la population de *C. glaucum* méditerranéenne dont il faut tenir compte pour de futures études.



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion Générale et Perspectives

La surveillance de la qualité des écosystèmes repose en grande partie sur l'évaluation de l'impact écotoxicologique des polluants grâce à des méthodes simples et fiables, spécifiquement adaptées à l'étude des effets des xénobiotiques sur les organismes vivants. Dans ce contexte, les biomarqueurs apparaissent comme des outils modernes permettant d'évaluer les effets d'expositions à un ou des xénobiotiques sur les populations dans leurs habitats. Cette étude est considérée comme la première qui vise à la fois à étudier les effets d'une exposition *in situ* de *C. glaucum* au cadmium et à déterminer la répartition spatiale de ce métal et de ses effets dans le site Zarb El Ain exposé aux différents rejets anthropiques et industriels. Ainsi, des échantillons de *C. glaucum* ont été collectés suivant une grille de prélèvement afin de pouvoir visualiser la répartition spatiale de cadmium et d'évaluer l'impact écotoxicologique de cette exposition. Cette évaluation est réalisée à travers les mesures des concentrations en cadmium dans la totalité des tissus mous (*in toto*), les teneurs en métallothionéines et en malonedialdéhyde dans la glande digestive ainsi que les mesures de l'activité de l'acétylcholinéstérase au niveau des branchies de *C. glaucum.* Les principaux résultats obtenus montrent que le site Zarb El Ain est largement contaminé par le cadmium et que cette contamination n'est pas stagnante mais elle migre principalement vers le sud par les courants de direction nord-sud. Les variations des teneurs en biomarqueurs étudiés reflètent l'état alarmant de cet écosystème. Pour survivre dans de telles conditions, on a pu démontrer que les palourdes *R. decussatus* et les coques *C. glaucum* ont développé un système adaptatif particulier qui est «le système métallothionéine » et ce en clonant l'ADNc codant pour la MT chez les deux espèces étudiées. Cependant, avant d'entamer cette étude moléculaire il a été nécessaire de déterminer les conditions optimales d'induction du gène MT chez *C. glaucum* qui représente contrairement à *R. decussatus* une espèce très peu étudiée. Pour cette raison on a exposé les animaux à des concentrations différentes de $CdCl_2$ (50, 75, 100 et 150 µg/l) durant 5, 10, 15 et 20 jours. Durant cette expérience un suivi des variations des teneurs en MTs, MDA et protéines ainsi que le test de stress on stress ont été réalisés. Les résultats ont montré que les concentrations maximales en MTs ont été observées après une exposition à 150 µg $CdCl_2$/l durant 10 jours et à 50 µg $CdCl_2$/l durant 15 jours. En se basant sur les variations des teneurs en MDA et en protéines ainsi que les résultats du test stress on stress, il s'est avéré que la contamination par 150 µg $CdCl_2$/l durant 10 jours a causé des perturbations métaboliques assez importantes chez la coque *C. glaucum*. Par contre l'exposition à 50 µg $CdCl_2$/l durant 15 jours a montré une induction maximale de

synthèse des MTs sans pour autant trop stresser l'animal. Ces résultats nous ont servi pour réaliser notre troisième chapitre dont le but était de cloner les ADNc codant pour la métallothionéine chez *C. glaucum* et *R. decussatus* afin de pouvoir les utiliser comme sonde pour étudier l'induction du gène MT au niveau des tissus des animaux contaminés et témoins. Deux séquences d'ADNc MT ont été clonées. Elles ne diffèrent que par quelques bases qui conduisent à des substitutions au sein des séquences protéiques. La position des résidus de cystéines qui sont impliqués dans la fixation des ions métalliques dans les protéines traduites est conservée entre ces deux espèces. Afin d'estimer le niveau de transcription des gènes MT dans les branchies, manteau, muscle adducteur et pied, une sonde dérivée de l'ADNc MT de *R. decussatus* a été utilisée. Une sonde d'ADNc de gène dont le niveau d'expression est considéré comme stable et dont la réponse est non dépendante aux expositions métalliques (18S), a été utilisée pour normaliser l'expression des gènes de MT. Les résultats ont prouvé l'induction des gènes MT par le cadmium au niveau des branchies de *C. glaucum* et *R. decussatus* et ont montré que le niveau d'ARNm de MT le plus important a été noté au niveau des branchies des animaux contaminés.

Lors de la dissection de nos échantillons nous avons remarqué la présence de deux phénotypes chez *C. glaucum* : des *C. glaucum* à pied jaune et d'autres à pied orangé. Cette différence morphologique a été évoquée pour la première fois dans cette étude. Pour répondre à la question : est ce que cette différence phénotypique est due à une divergence génétique ou pas ? et pour soulever la problématique de ségrégation entre C. *glaucum* et *C. edule* qui a été largement provoquée, une étude génétique a été réalisée. Pour cela des outils moléculaires tels que les séquences de 28S, d'ITS1 et de COI ont été utilisés. L'analyse des séquences de 28S de *C. glaucum* et de *C. edule* a montré la présence d'une divergence génétique ce qui justifie leurs appartenance à deux espèces différentes. Cependant cette divergence est relativement faible en la comparant à celle observée entre d'autres espèces appartenant au même genre telles que *M. edulis* et *M. galloprovincialis* ce qui montre qu'il s'agit bien de deux espèces différentes mais qui sont génétiquement proches. L'analyse des séquences d'ITS1 et de COI a permis d'étudier les divergences génétiques intra et interpopulationnelles de *C. glaucum* et *C. edule* et a surtout montré la présence de deux groupes génétiquement différents au sein de la population tunisienne de *C. glaucum*.

Les principaux apports originaux de cette thèse se récapitulent dans les points suivants :

- L'étude de la répartition spatiale du cadmium dans une zone exposée à la pollution et l'évaluation de l'impact écotoxicologique de cette contamination sur un organisme bioindicateur.
- L'éstimation des conditions optimales d'induction de synthèse des métallothionéines.
- Le Clonage et la caractérisation de deux séquences partielles d'ADNc codant pour la métallothionéine chez *C. glaucum* et *R. decussatus*.
- L'utilisation d'un ADNc comme sonde pour quantifier l'expression du gène MT au niveau de différents tissus des animaux contaminés et au niveau des branchies des palourdes contaminées et témoins.
- La différenciation génétique entre deux phénotypes de *C. glaucum.*
- La segrégation génétique inter et intrapopulationnelle de *C. glaucum* et *C. edule*.

En perspectives, nous envisageons de :

- Approfondir notre étude génétique en utilisant d'autres outils moléculaires.
- Etablir une différenciation génétique entre différentes populations de *R. decussatus* et *R. philippinarum*.
- Nous intéresser à la contamination environnementale par d'autres métaux présents dans les effluents industriels.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Adriano D.C. 1986.Trace elements in the environment. *New York, Springer Verlag*. pp 155.

Akima H. 1970. A New Method of Interpolation and Smooth Curve Fitting Based on Local Procedures. *J.A.C.M*. 17: 589-602.

Amiard-Triquet C, Berthet B, Metayer C, Amiard J.C. 1986. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, copper, and zinc in the mussel Mytilus edulis. II Experimental study. *Mar. Biol*. 92 : 7-13.

Amiard J.C, Amiard-Triquet C, Ballan-Dufrançais C, Berthet B, Jeantet A.Y, Martoja R, Truchet M .1989. Study of the bioaccumulation at the molecular, cellular and organism levels of lead and copper transferred to the oyster *Crassostrea gigas* thunberg directly from water or via food. *Polish. Academy of Sciences*. 34: 521-529.

Amiard J.C, Cosson R.P. 1997. Les métallothionéines. In Lagadic L, Caquet T, Amiard J.C, Ramade F (eds), biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. *Masson, Paris*. 53-66.

Amiard J.-C, Bacheley H, Barillé, A.-L, Barillé, L, Geffard A, Himery N. 2004. Temporal changes in nickel and vanadium concentrations and in condition index and metallothionein levels in three species of molluscs following the Erika oil spill. *Aquat. Living Resour*. 17:281–288.

Amiard J.C, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow P.S .2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol*. 76: 160-202.

Andrews G.K. 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem. Pharmacol*. 59: 95-104.

Arnaud H, Georges P. 2000. Ressources génétiques et phylogéographie des huîtres creuses Crassostrea gigas et Crassostrea angulata : variabilité, différenciation et adaptation des populations naturelles et introduites = Genetic resources and phylogeography of two cupped oysters Crassostrea gigas and Crassostrea angulata : variability, differentiation and adaptation of wild and introduced populations. *INIST-CNRS*, Cote INIST : T 136636.

Azri C, Serbaji M.M, Medhioub K. 1999. Pollution de l'air par les rejets d'une fonderie de plomb. *TSM-l'eau*. 22-26.

Azri C, Maalej A, Medhioub K. 2000. Etude de la variabilité des constituants de l'aérosol dans la ville de Sfax. *Poll. Atm*. 165: 121-129.

B

Bandelt H-J, Forster P, Röhl A.1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol*. 16:37-48

Banerjee D, Onosaka S, Cherian M.G. 1982. Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus cytoplasm of rat liver and kidney. *Toxicol*. 24. 80-95.

Bargelloni L, Scudiero R, Parisi E, Carginale V, Capasso C, Patarnello T. 1999. Metallothioneins in antarctic fish: evidence for independent duplication and gene conversion. *Mol. Biol. Evol*. 16: 885– 897.

Barka S, Pavillon J.F, Amiard J.C. 2001. Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the copepod *Trigriopus brevicornis*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 128: 479-493.

Barsyte D, White K.N, Lovejoy D. A .1999. Cloning and characterization of metallothionein cDNAs in the mussel *Mytilus edulis* L. digestive gland. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 122: 287-296.

Baudrimont M, Andrès S, Metivaud J, Lapaquellerie Y, Ribeyre F, Maillet N, Latouche C, Boudou A .1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France) : II. Metallothionein response to metal exposure. *Environ. Toxicol. Chem*. 18: 2472-2477.

Beati L, Caceres A.G, Lee J.A, Munstermann L.E. 2004. Systematic relationships among *Lutzomyia* and flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *Inter. J. Parasit*. 34: 225-234.

Bebianno MJ, Langston WJ. 1991. Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Mar. Biol*. 108: 91-96.

Bebianno MJ, Langston WJ. 1992. Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis. Comp. Biochem. Physiol. C*. 103:79-85.

Bebianno M.J, Nott J.A, Langston W.J. 1993. Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussatus* : the role of metallothioneins. *Aquat. Toxicol*. 27: 315- 334.

Bebianno MJ, Machado L. 1997. Concentrations of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the South Portuguese Coast. *Mar. Pollut. Bull*. 34: 666 –671.

Bebianno M.J, Serafim M.A. 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *Sci.Total. Environ*. 214: 123-131.

Bebianno M.J, Langston W.J. 1999. Metallothionein induction in mussels exposed to a metal mixture. In: Klaassen C (ed.), Metallothioniein IV. *Birkhauser Verlag, Basel*. pp. 187–194.

Bebianno M.J, Serafim M.A. 2003. Variation of metal and metallothionein concentrations in a natural population of *Ruditapes decussatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 44: 53-66.

Bebianno M.J, Géret F, Hoarau P, Serafim M.A, Coelho M.R, Gnassia-Barelli M, Roméo M. 2004. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. *Biomarkers*. 9: 305-330.

Bebianno M.J, Company R, Serafim A, Camus L, Cosson R.P, Fiala-Médoni A .2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol*. 75: 354 -373.

Ben Haj S. 1992. Contribution à l'étude biogéologique des palourdes (*Ruditapes*). *Thèse de Doctorat. Université de Nantes*. pp 331.

Binz P.A, Kagi J.H.R. 1999. Metallothionein: molecular evolution and classification. In: Klaassen, C (eds), Metallothionein, vol. IV. *Birkhauser, Basel*. pp. 7-13.

Bocquené G, Galgani F. 1998. Biological effect of contaminants: Cholinesterases inhibition
by organophosphate and carbamate compounds ICES Tech. *Mar. Environ. Sci*. 22: 1-13.

Bocquené G, Galgani F, Walker C.H. 1997. Les cholinesterases, biomarqueurs de neurotoxicité. In: Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux. *Masson, Paris*. pp. 209-/240.

Bonham K, Zafarullah M, Gedamu L. 1987. The rainbow trout metallothioneins: molecular cloning characterization of two distinct cDNA sequences. *DNA*. 6 : 519–528.

Bonnefont-Rousselot D. 1994. Irradiation des membranes cellulaires. *J Chim Phys*. 91: 968-983.

Bonneris E, Perceval O, Masson S, Hare L, Campbell P.G.C. 2005. Sub-cellular partitioning of Cd, Cu and Zn in tissues of indigenous unionid bivalves living along a metal exposure gradient and links to metal-induced effects. *Environ. Pollu*. 135: 195-208.

Bordin G, Cordeiro Raposo F, McCourt J, Rodriguez A.R. 1994. Identification de métalloprotéines du type métallothionéine chez un mollusque marin bivalve. *C.R. Acad. Sci. Paris*. 317: 1057–1064.

Bordin G, McCourt J, Cordeiro Raposo F, Rodriguez A.R. 1997. Metallothionein-like metalloproteins in the baltic clam *Macoma balthica*: seasonal variations and induction upon metal exposure. *Mar. Biol*. 129: 453–463.

Bouquegneau J.M, Gilles R. 1979. Osmoregulation and pollution of the aquatic medium. In metabolism and osmoregulation in animals. *Gilles R. Ed, John Wiley and sons, New York*.pp 563.

Bradai M.N. 2000. Diversité du peuplement ichtyque et contribution à la connaissance des sparidés du golfe de Gabès. *Thèse de Doctorat. Universté de Sfax*. pp 600.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of quantities of protein using the principale of protein-drye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-254.

Braun W, Vasak M, Robbins A.H, Stout C.D, Wagner G, Kagi, J.H.R, Wüthrich K. 1992. Comparison of the NMR solution structure and the x-ray crystal structure of rat metallothionein. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 21:10124-10128.

Bray J.T, Webb L.A, Reilly F.J. 1983. Multielement analysis of metal-binding proteins in cytosol fractions. *Sci. Total. Environ*. 28: 367–374.

Breathnach R, Chambon P. 1981. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem*. 50: 349-383.

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 criteria for the separation of *Cardium glaucum* (Bruguiére) from *cardium edule* (L.). *Ophelia*. 17: 207-214.

Brock V. 1987. Genetic relations between the bivalves *Cardium* (*Cerastoderma*) *edule*, *Cardium lamarcki* and *Cardium glaucum*, studied by means of crossed immunoelectrophoresis. *Mar. Biol*. 93: 493-498.

Bryan S.E, Hidalgo H.A. 1976. Nuclear 115 cadmium: uptake and disappearance correlated with cadmium –binding protein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 68: 858-865.

C

Cadoret J.P, Debon R, Cornudella L, Lardans V, Morvan A, Roch P, Boulo V. 1999. Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized actin gene from the oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Letters*. 460: 81-5.

Carpenè E, Crisetig G, Cortesi P, Serrazanetti G. 1979. Immobilizzazione del cadmio e variazioni dello zinco in *Mytilus galloprovincialis*. Bol. *Soc. Ital. Biol. Speriment.* 55 : 1217–1223.

Carpenè E, Cortesi P, Crisetig G, Serrazanetti G.P. 1980. Cadmium-binding proteins from the mantle of *Mytilus edulis* (L.) after exposure to cadmium. *Thal. Jugosl*. 16 : 317–323.

Carpenè E, George SG .1981. Absorption of cadmium by gills of *Mytilus edulis* (L.). *Molecular Physiology*. 1: 23–34.

Carpenè E, Cattani O, Hakim G, Serrazanetti G.P. 1983. Metallothionein from foot and posterior adductor muscle of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 74 : 331–336.

Carter A.D, Felber B.K, Walling M.J, Jubier M.F, Schmidt C.J, Hamer D.H. 1984. Duplicated heavy metal control sequences of the mouse metallothionein-I gene. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 81:7392-7396.

Cesari, P. et Pellizzato, M. 1990. Biology of *Tapes Philippinarum* In: *Tapes Philippinarum*: Biologia e Sperimentazione. *Regione Veneto, Ente di Sviluppo Agricolo, Venice*. pp 299.

Chang Y.T, Jong K.J, Liao B.K, Wu S.M. 2007. Cloning and expression of metallothionein cDNA in the hard clam (Meretrix lusoria) upon cadmium exposure. *Aquaculture*. 262 : 504-513.

Chaudhary A. K, Reddy G.R, Blair I.A, Marnett L.J. 1996. Characterization of an N6-oxopropenyl-2'-deoxyadenosine adduct in malondialdehyde-modified DNA using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis*.17: 1167-70.

Chen, H. J, Chung F.L. 1996. Epoxidation of trans-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol*. 9: 306-12.

Cherian M.G, Nordberg M. 1983. Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicol*. 28: 1-15.

Choi H.J, Ji J, Chung K.H, Ahn I.Y. 2007. Cadmium bioaccumulation and detoxification in the gill and digestive gland of the Antarctic bivalve Laternula elliptica. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 145 : 227–235.

Chouba L, Zamouri-Langar N, El Abed A. 1998. Le réseau de surveillance des contaminants nocifs : les métaux lourds dans la chair de la clovisse. *Actes des Acquis de Recherche Agronomique et Vétérinaire, IRESA N°5*.

Christy N.T, Costa M. 1984. In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV. Disposition of metals in cells: interactions with membranes, glutathione, metallothionein, and DNA. *Biol. Trace Elem. Res.* 6: 139–158.

Chu K. H, Tong J, Chan T.Y. 1999. Mitochondrial cytochrome oxidase I sequence divergence in some Chinese species of *Charybdis* (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Biochem. System. Ecol*. 27: 461-468.

Cleveland P, Hickman J, Larry S.R, Allan L. 1995. The mollusks (Bivalvia) In: Ober W.C, Gavrison M.D, Gavrison C, (Ed). Integrated principales of zoology. *WCB Brown Publ*. 429-436.

Cosson R.P. 1992. Les métallothionéines. *Anal. Mag*. 20 :50-53.

Cosson R.P, Amiard J.C. 1998. Utilisation des métallothionéines comme biomarqueurs d'exposition aux métaux. In Lagadic L, Caquet T, Amiard J.C, Ramade F. 1998. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Lavoisier. Paris*. 77-109.

Cossu C, Doyotte A, Jacquin M.C, Babut M, Exinger A, Vasseur P. 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, Unio tumidus, asbiomark ers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38: 122–131.

CRDA (Commissariat Régionale de Développement Agricole). 2002. Réseau National de surveillance des zones de production et de commercialisation des mollusques bivalves. Bilan de la campagne 2001-2002.

Curtis D. K, Choudhuri S, McKim J.M, Lehman-McKeeman J.L.D, Kershaw W.C. 1994. *In Vitro* and *In Vivo* studies on the degradation of metallothionein. *Environ. Health. Perspect*. 102 : 141-146.

D

Dallinger R, Berger B, Hunziker P.E, Birchler N, Hauer C.R, Kagi J.H. 1993. Purification and primary structure of snail metallothionein. Similarity of the N-terminal sequence with histones H4 and H2A. *Euro. J. Biochem*. 216: 739-746.

Darmoul B. 1979. Recherches sur la population du golfe de Gabès par les rejets d'industries chimiques. Etude expérimentale de la toxicité du phosphogypse. *Thèse de Doctorat. Université de Tunis*. pp 135.

Darmoul B, Vitiello P.1980. Recherches expérimentales sur la toxicité aiguë des rejets de phosphogypse sur quelques organismes benthiques marins. *Bull. Ins. Natn. Scient. Tech. Océanog. Pêche Salammbô*. 7: 63-89.

Denis F, Vachoux C, Gauvry L, Leignel V, Salin C, Hardivillier Y, Cosson R and Laulier M. 2002. Characterization and expression of a *Bathymodiolus* sp. metallothionein gene. *Cah. Biol. Mar*. 43 : 329-332.

Depledge M.H. 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In Fossi M.C and Leonzio C (ed). Nondestructive biomarkers in vertebrates. *Lewis Publishers, Boca Raton*. pp 261-285.

Dianzani M.U, Ugazio G. 1978. Lipid peroxydation. In Biochemical mechanisms of liver injury . *Salter T.F Ed. Academic press. London*. pp 669.

Di Giulio RT, Benson WH, Sanders BM, Van Veld PA. 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. In: Rand G (Ed), Fundamentals of aquatic toxicology, effects, environmental fate, and risk assessment. *Taylor&Francis, London*. pp 523-561.

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

Donnini F, Dinelli E, Sangiorgi F, Fabbri E. 2007. A biological and geochemical approach to assess the environmental quality. *Environ. Int*. 33: 919–28.

Duquesne S.J, Coll J.C. 1995. Metal accumulation in the clam *Tridacna crocea* under natural and experimental conditions. *Aquat.Toxicol*. 32: 239–253.

E

Ellman G.L, Courtney K.D, Andreas V, Featherstone R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochem. Pharmacol*. 7: 88-95.

Engelken J, Hildebrandt A. 1999. cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Biochem. Cell Biol*. 77: 237-241.

Evtushenko Z.S, Belcheva N.N, Lukyanova O.N. 1986. Cadmium accumulation in organs of the scallop Mizuhopecten yessonensis. *Comp. Biochem. Physiol*. 83: 377-382.

Excoffier L. G, Laval H, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolu. Bioinfo. Online*. 1:47-50.

F

Fabisiak J.P, Pearce L.L, Borisenko G, Tyurina Y, Tyurin V.A, Razzak J, Lazo J.S, Pitt B.R, Kagan V.E. 1999. Bifunctional anti/ prooxidant potential of metallothionein : redox signaling of copper binding and release. *Antiox.Redox. Sign*. 1: 349-364.

Favier A. 2003. Le stress oxydant : Intérêt conceptionnel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. pp 108-115.

Felsenstein J .2001. PHYLIP-Phylogeny Inference Package (version 3.6). *Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, USA.*

Fernando L.P, Andrews G.K. 1989. Cloning and expression of an avian metallothionein-encoding gene. *Gene*. 81: 177-183.

Fischier W, Schneider M, Bouchot M.L. 1987. Fiches d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Vol. 1. *Végétaux et invertébrés*. pp 760. Rome, FAO.

Flatau G.N, Gauthier M.J. 1983. Accumulation du cadmium par *Mytilus edulis* en presence de souches bactériennes sensibles ou résistantes à ce metal. *Can. J. Microbiol*. 29: 210-217.

Folmer, O. Black, M. Hoeh, W.R. Lutz, R.A. Vrijenhoek, R. C. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech*. 3 : 294-299.

Fowler B.A, Engel D.W, Brouwer M. 1986. Purification and characterization studies of cadmium-binding proteins from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Environ. Health. Perspect*. 65: 63–69.
Fowler BA, Hildebrand CE, Kojima Y, Webb M .1987. Nomenclature of metallothionein. *Experientia Suppl*. 52:19-22.

Franc A. 1960. Classe des bivalves. In : Grassé P.P, (Ed). Traité de zoologie. Anatomie, systématique. Tome V. *Fascicule II. Paris : Masson*. pp 1845-2133.

Frankenne F, Noel-Lambot F, Disteche A. 1980. Isolation and characterization of metallothioneins from cadmium-loaded mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 66: 179–182.

Frazier J.M, George S.G. 1983. Cadmium kinetics in oysters: a comparative study of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Mar. Biol*. 76: 55–61.

Frazier J.M. 1986. Cadmium-binding Proteins in the Mussel, *Mytilus edulis*. *Environ. Health*. Perspect. 65: 39–43.

Freire R, Insua A, Méndez J. 2005. *Cerastoderma glaucum* 5S ribosomal DNA: characterization of the repeat unit, divergence with respect to *Cerastoderma edule*, and PCR–RFLPs for the identification of both cockles. *Genome*. 48:427-442.

Fuentes ME, Unger M.E, Roesijadi G. 1994. Individual variability in the 3’ untranslated region of metallothionein mRNAs in a natural population of the mollusc *Crassostrea virginica. Mol. Mar. Biol. Biotech*. 3: 141-148.

Funes V, Alhama J, Navas J.I, López-Barea J, Peinado J. 2005. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environ. Pollut*. 139: 214-23.

Furey W.F, Robbins A.H, Clancy L.L, Winger D.R, Wang B.C, Stout C.D. 1987. Crystal structure of Cd, Zn metallothionein. *Science*. 231: 704-710.

G

Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard J.-C, Mouneyrac C. 2001. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters *Crassostrea gigas* from a clean and a metal-rich sites. *Biomarkers*. 6 : 91–107.

Geffard A, Geffard O, His E, Amiard J.C. 2002. Relationship between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated
estuarine sediment elutriate. *Mar. Ecol. Progr. Ser*. 233: 131–142.

Geffard A, Geffard O, His E, Budzinski H. 2003. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Mar. Pollut. Bull*. 46: 481–490.

George S.G. 1972. Subcellular accumulation and detoxication of metals in aquatic animals. In physiological mechanisms of marine pollutant toxicity. Vernberg W.B, Calabrese A, Thurberg F.P, Vernberg F.J Ed. *Academic press New York*.

George S.G, Carpenè E, Coombs T.L, Overnell J, Youngson A. 1979. Characterization of cadmium-binding proteins from mussels, *Mytilus edulis* (L.), exposed to cadmium. *Biochem. Biophys. Acta*. 580: 225–233.

George S.G, Pirie B.J.S. 1979. The occurrence of cadmium in sub-cellular particles in the kidney of the marine mussel, *Mytilus edulis*, exposed to cadmium. *Biochem. Biophys. Acta*. 580: 234–244.

George SG. 1980. Correlation of metal accumulation in mussels with the mechanism of uptake, metabolism and detoxication: a review. *Thalassia Jugoslavica*. 16:347–365.

George S.G, Pirie B.J.S, Calabrese A, Nelson D.A. 1986. Biochemical and ultrastructural observations of long-term silver accumulation in the mussel, *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res*. 18: 255–265.

George SG. 1990. Biochemical and Cytological Assessments of Metal Toxicity in Marine Animals. In Heavy Metals in the Marine Environment. *Furness, R.W. and P.S.Rainbow (eds)*. pp 123-142.

Gérard K, Bierne N, Borsa P, Chenuil A, Féral J.P. 2008. Pleistocene separation of mitochondrial lineages of Mytilus spp. Mussels from Northern and Southern Hemispheres and strong genetic differentiation among southern populations. *Mol. Phylo.Evol.* 49 (2008) 84–91.

Géret F, Cosson R.P. 2002. Induction of specific isoforms of metallothionein in mussel tissues after exposure to cadmium or mercury. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 42: 36-42.

Géret F, Jouan A, Turpin V, Bebianno M.J, Cosson R.P. 2002 (a). Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living. Res.* 15: 61–66.

Géret F, Serafim A, Barreira L, Bebianno M.J. 2002(b). Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Biomarkers*. 7: 242 –256.

Giguère A, Couillard Y, Campbell P.G.C, Perceval O, Hare L, Pinel-Alloul B, Pellerin J. 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol*. 64: 185-200.

Glaumann H, Ballard F.J. 1987. Lysosomes: Their role in protein breakdown. *Academic press, London*.

Griffith B. B, Walters R.A, Enger M. D, Hildebrand C. E, Griffith J. K. 1983. cDNA cloning and nucleotide sequence comparison of Chinese hamster metallothionein-I and II mRNAs. *Nucleic. Acids. Res.* 11 : 901-910

Guelorget O, Perthuisot J.P. 1984. Indicateurs biologiques et diagnose écologique dans le domaine paralique. *Bull. Ecol*. 15 : 67-76.

Gutteridge J. M, Halliwell B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems: *Trends Biochem Sci*. 15: 129-35.

H

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. Free radicals in biology and medicine. *Oxford university press Inc, New York.*

Hamer D.H. 1986. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem*. 55: 913-951.

Hamilton S.J, Merle, P.M. 1986. Metallothionein in fish: review of its importance in assessing stress from metal contaminants. *Trans. Am. Fish. Soc*. 115: 596-609.

Hamza A. 2003. Le statut du phytoplancton dans le golfe de Gabès. *Thèse de doctorat. Université de Sfax*. pp 297.

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

Hamza-Chaffai A, Roméo M, El Abed A. 1996. Heavy metals in different fishes from the middle eastern of Tunisia. *Bull.Environ.Contam. Toxicol*. 56: 766-773.

Hamza-Chaffai A, Roméo M, Gnassia-Barelli M, El Abed A. 1998. Effects of copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 61: 397- 404.

Hamza-Chaffai A, Amiard J.C, Cosson R.P. 1999. Relationship between metallothioneins and metals in a natural population of clam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast : a non-linear model using box-cox transformation. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 123: 153-163.

Hamza-Chaffai A, Amiard J.C, 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. C*. 127: 185-197.

Hamza-Chaffai A, Pellerin J, Amiard J.C. 2003. Health assessment of marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) from the gulf of Gabès (Tunisia). *Environ. Inter*. 28: 609–617.

Hardivillier Y. 2005. Caractérisation et expression des gènes de métallothionéines chez deux modioles hydrothermales : *Bathymodiolus thermophilus* et *Bathymodiolus azoricus. Thèse de doctorat de l'université du Maine, France*. pp113.

Hardivillier Y, Denis F, Demattei MV, Bustamante P, Laulier M, Cosson R. 2006. Metal influence on metallothionein synthesis in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 143(3):321-32.

Harris E.D. 1992. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB Journal.* 6: 2675-2683.

Harris D.J, Crandall K.A. 2000. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda : Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Mol. Biol. Evol*. 17: 284-291.

Harrison F.L, Lam J.R, Berger R. 1983. Sublethal responses of *Mytilus edulis* to increased dissolved copper. In: Klaassen C (ed.), Metallothioniein IV. *Birkhauser Verlag, Basel*. pp 141–158.

Harrison M. K, Crespi B.J. 1999. Phylogenetics of Cancer Crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Mol. Phylo. Evol*. 12: 186-199.

He X, kan H, Cai L, Ma Q. 2008. Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardio*. In press.

Hilbish T.J, Koehn R.K. 1985**.** Dominance in physiological phenotypes and fitness at an enzyme locus. *Science*. 229: 52-54.

Hou Z, Fu J, Li S. 2007. A molecular phylogeny of the genus *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda) based on mitochondrial and nuclear gene sequences. *Mol. Phylo. Evol*. 45: 596-611.

Huggett R.J, Kimerle R.A, Mehrle P.M, Bergam H.L (eds). 1992. Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. *SETAC Special Publication Series, Lewis Publishers, Boca Raton*.

Hualkasin W, Sirimontaporn P, Chotigeat W, Querci J, Phongdara A. 2003. Molecular phylogenetic analysis of white prawns species and the existence of two clades in Penaeus merguiensis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 296: 1 –11.

Hummel H, Wolowick M, Boggrds R.H. 1994. Genetic variability and relationships for populations of *Cerastoderma edule* and of the *C. glaucum* complex. *Netherlands. J. Sea. Res*. 33: 81-89.

I

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

Imai, H., J.-H. Cheng, K. Hamasaki et K.-I. Numachi. 2004. Identification of four mud crab species (genus *Scylla*) using ITS-1 and 16S rDNA markers. *Aquat. Living. Res*. 17: 31-34.
Imber B.E, Thompson J.A.J, Ward S. 1987. Metal-binding protein in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: assessment of the protein as a biochemical environment indicator. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 38: 707–714.

Insua A, López-Piñón M.J, 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

Irato P, Santovito G, Cassini A, Piccinni E, Albergoni V. 2003. Metal accumulation and binding protein induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequivalvis* and *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 44: 476–484.

Isani G, Serra R, Cattani O, Cortesi P, Carpenè E. 1997. Adenylate energy charge and metallothionein as stress indices in *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium and anoxia. *J. Mar. Biol. Ass. UK*. 77: 1187–1197.

Isani G, Andreani G, Kindt M, Carpenè E. 2000. Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cell. Mol. Biol*. 46:311–30.

Ishiguro T, Kitajima K, Chiba M, Fujisawa R, Ichikawa F, Kondo K, Takehana H. 1982. Studies on Cd-binding protein in short-necked clam. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*. 48 :793–798.

J

Jacob S.T, Ghshal K, Sheridan J.F. 1998. Induction of metallothionein by stress and its molecular mechanisms. *Gene expression*. 7: 301-310.

Jeantet A.Y. Ballan-Dufrançais C, Anglo A. 1997. Pollution par les métaux et atteintes cytologiques chez les bivalves marins. In Lagadic L, Caquet T, Amiard J.C, Ramade F (ed). Biomarqueurs en ecotoxicologie: Aspects fondamentaux. *Paris Masson*. pp 315-350.

Jennings JR .1979. The effect of cadmium and lead on the growth of two species of marine
phytoplankton with particular reference to the development of tolerance. *J. Plankton. Res*. 1:121.

Jiang L.J, Maret W, Vallee B.L. 1998. The ATP-metallothionein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 9146-9149.

Johansson C, Cain D.J, Luoma S.N. 1986. Variability in the fractionation of Cu, Ag, and Zn among cytosolic proteins in the bivalve *Macoma balthica*. *Mar. Ecol. Progr. Ser*. 28: 87–97.

Jollivet D, Desbruyères D, Ladrat C, Laubier L. 1995. Evidence for differences in the allozyme thermostability of deep-sea hydrothermal vent polychaetes (Alvinellidae): a possible selection by habitat. *Mar. Ecol. Prog. Ser*. 123: 125–136.

K

Kagi J.H.R, Vallee B.L. 1960. Metallothionein: a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem*. 235: 3460-3465.

Kagi J.H.R, Kojima Y. 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Expe. suppl*. 52: 25-61.

Karin M, Richards R.I. 1982. Human metallothionein genes--primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. *Nature*. 5886:797-802.

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.

Kijewski T, Wijsman J.W.M , Hummel H, Wenne R. 2009. Genetic composition of cultured and wild mussels Mytilus from The Netherlands and transfers from Ireland and Great Britain. *Aquaculture*. 287: 292–296

Kille P, Stephens P.E, Kay, J. 1991. Elucidation of cDNA sequences for metallothioneins from rainbow trout, stone loach and pike liver using the polymerase chain reaction. *Biochem. Biophys. Acta*. 23: 407–410.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol*. 16: 111–120.

Kojima Y, Berger C, Vallee BL, Kagi JHR. 1976. Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-1B. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 10: 3413-3417.

Kojima *Y*, Kagi J.H.R. 1978. Metallothionein. *Trends. Biochem. Sci*. 3: 90-93.

Kopecka J, Rybakovas A, Barsiene J, Pempkowiak J. 2004. AChE levels in mussels and fish collected off Lithuania and Poland (southern Baltic). *Oceanologia*. 46 : 405–418.

Krezoki S, Laib J, Onana P, Hartmann T, Chen P, Shaw C.F, Petering D.H. 1988. Presense of Zn, Cu-binding protein in liver of freshwater fishes in the absence of elevated exogenous metal: relevance to toxic metal exposure. *Mar. Environ. Res*. 24:147-150.

Krinsky NI. 1992. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 200: 248-254.

L

Ladhar-Chaabouni R, Gargouri R, Hamza-Chaffai A. 2007. Effect of cadmium on some biomarkers in the clam *Ruditapes decussatus* : Metallothionein quantification by using two techniques. *Inter.J. Environ. Pollu*. 30: 593-601.

Lafontaine Y, de Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan H.M. 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymer pha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol*. 50: 51–71.

Lagadic L, Caquet T, Amiard J.C, Ramade F. 1997. Biomarqueurs en écotoxicilogie : aspects fondamentaux. *Masson. Paris*. pp 417.

Lagadic L, Caquet T, Amiard J.C, Ramade F. 1998. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Lavoisier. Paris*. pp 320.

Langston WJ, Bebianno M.J, Zhou M. 1989. A comparison of metal-binding proteins and cadmium metabolism in the marine molluscs *Littorina littorea* (Gastropoda), *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* (Bivalvia). *Mar. Environ. Res*. 28: 195-200.

Langston W.J, Bebianno MJ, Burt GR. 1998. Metal handling strategies in molluscs. In Langston WJ, Bebianno MJ (Ed). Metal metabolism in aquatic environments. *London: Chapman and Hall*. pp 219-283.

Lau P.S, Wong, H. L. 2003. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Mar. Pollu. Bull*. 46: 1563-1572.

Lecoeur S, Videmann B, Berny 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 J.C, Bourdineaud J.P. 2005. Impact of cadmium contamination and oxygen levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Aquat. Toxicol*. 74: 242–253.

Lemoine S, Bigot Y, Sellos D, Cosson R.P, Laulier M .2000. Metallothionein Isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia): complementary DNA characterization and quantification of expression in different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper. *J. Mar. Biotech*. 2: 195–203.

M

Machreki-Ajmi. 2002. Effet d'une contamination par les métaux traces toxiques sur le mollusque bivalve Cerastoderma glaucum issu de la région de Sfax : Etude *in situ* et *in vivo*. DEA. *Faculté des sciences de Sfax*. pp76.

Machreki-Ajimi M, Hamza-Chaffai A. 2006. Accumulation of cadmium and lead in *Cerastoderma glaucum* originating from the Gulf of Gabès,Tunisia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 76: 529-537.

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.

Mackay EA, Overnell J, Dunbar B, Davidson I, Hunziker PE, Kagi JHR; Fothergill JE. 1993. Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*. *Euro. J. Biochem*. 218:183-194.

Maître-Allain T. 1983. Croissance de deux espèces de palourdes dans l'étang de Thau (Herault, France) en fonction des facteurs hydrologiques. *Rapp. Comm. Intern de la Mer Med*. 28 : 165-166.

Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Can. Res*. 27: 209–220.

Maret W, Vallee, B. L. 1998. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 95: 3478-3482.

Margoshes M, Vallee B.L. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc*. 79: 4813-4820.

Marie V, Baudrimont M, Boudou A. 2006. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (Corbicula fluminea and Dreissena polymorpha) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere*. 65 : 609–617

Masters B.A, Kelly E.J, Quaife C.J, Brinster R.L, Palmiter R.D. 1994. Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 584-588.

Matozzo V, Tomei A, Marin M.G. 2005. Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam Tapes philippinarum from the Lagoon of Venice. *Mar. Pollut. Bull*. 50: 1686–1693.

Mbikay M, Maiti I.B, Thirion J.P. 1981. Cloning and sequencing of cDNA for mouse liver metallothionein-I. *Biochem .Biophys. Res. Commun*. 103: 825– 832.

McCarthy J.F, Shugart L.R. 1990. Biomarkers of environmental contamination. *Lewis Publishers, Boca Raton*.

Michalska A.E, Choo K.H. 1993. Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 8088-8092.

Mitton J.B, Grant M.C. 1984. Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Ann. Rev. Syst. Ecol*. 15:479–499

Moore M.N, Viarengo A. 1987. Lysosomal membrane fragility and catabolism of cytosolic proteins: evidence for a direct relationship. *Experientia*. 43: 320-329.

Mora P, Michel X, Narbonne J.-F. 1999. Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 7: 253–260.

Mouneyrac C, Amiard J.C, Amiard-Triquet C. 1998. Effect of natural factor (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *(Crassostrea gigas)* from a polluted estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser*. 162: 125-135.

Mouneyrac C, Geffard A, Amiard J.C, Amiard-Triquet C. 2000. Metallothionein-like proteins in *Macoma balthica*: effects of metal exposure and natural factors. *Can. J. Fish. Aquat. Sci*. 57: 34–42.

Mouneyrac C, Amiard-Triquet C, Amiard J.C, Rainbow P.S. 2001. Comparison of metallothionein concentrations and tissue distribution of trace metals in crabs (*Pachygrapsus marmoratus*) from a metal-rich estuary, in and out of the reproduction season. *Comp. Biochem. Physiol*. 129: 193-209.

Mourgaud Y, Martinez E, Geffard A, Andral B, Stanisiere J.Y, Amiard J.C. 2002. Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. *Biomarkers*. 7: 479–490.

Munger K, Germann U.A, Lerch K. 1985. Isolation and structural organization of the Neurospora crassa copper metallothionein gene. *EMBO J*. 4: 2665-2668.

N

Najimi S, Bouhaimi A, Daubèze M, Zekhnini A, Pellerin J, Narbonne J.F, Moukrim A. 1997. Use of acetylcholinestérase in *(Perna perna)* and *(Mytilus galloprovincialis)* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Marocco). *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 58 : 901-908.

Ng T.Y.-T, Wang, W.-X. 2004. Detoxification and effects of Ag, Cd, and Zn pre-exposure on metal uptake kinetics in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Mar. Ecol. Progr. Ser*. 268: 161–172.

Nikula R, Väinolä R. 2003. Phylogeography of *Cerastoderma glaucum* (Bivalvia: Cardiidae) across Europe: a major break in the eastern Mediterranean. *Mar. biol*. 143: 339–350.

Nolan C.V, Duke E.J. 1983. Cadmium-binding proteins in *Mytilus edulis*: relation to mode of administration and significance in tissue retention of cadmium. *Chemosphere*. 12: 65–74.

Nordberg M, Nuottaniemi I, Cherian M.G, Nordberg G.F, Kjell-strom T, Garvey J.S. 1986. Characterization studies on the cadmium-binding proteins from two species of NewZealand oysters. Environ. *Health Perspect.* 65: 57–62.

Nygren A, Sundberg P. 2003. Phylogeny and evolution of reproductive modes in Autolytinae (Syllidae, Annelida). *Mol. Phylogenet. Evol*. 29:235–249

O

Olafson R.W, Sim R.G. 1979. An electrochemical approach to quantitation and characterization of metallothioneins. *Anal. Biochem*. 100: 343-351.

Otvos J.D, Liu X, Li H, Shen G, Basti M. 1993. Dynamic Aspects of Metallothionein Structure, Metallothionein III. *Biological Roles and Medical Implications*. 57: 220-227.

P

Palmiter R.D, Findley S.D, Whitemore T.E, Durnam D.M. 1992. MT-III, a brain specific member of the metallothionein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 6333-6337.

Palmiter R.D. 1994. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 91:1219-1223.

Pan P.K, Hou F.Y, Cody C.E, Huang P.C. 1994. Substitution of glutamic acids for the conserved lysines in the alpha domain aVects metal binding in both the alpha and beta domains of mammalian metallothionein. *Biochem. Biophys. Res. Commu*. 202 : 621-628.

Park J.K, Foighil D.O. 2000. Sphaeriid and Corbiculid clams represent separate heterodont bivalve radiations into freshwater environment. *Mol. Phylo. Evol*. 14: 75-88.

Park H, Ahn I.Y, Choi H.J, Pyo S.H, Lee H.E. 2007. Cloning, expression and characterization of metallothionein from the Antarctic clam *Laternula elliptica. Prot. Express. Purif*. 52 : 82–88

Pavicic J, Raspor B, Marticic D. 1993. Quantitative determinationof metallothionein-like proteins in mussels. Methodological approach and field evaluation. *Mar. Biol*. 115: 435–444.

Pavicic J, Skreblin M, Krebar I, Tusek-Zidaric M, Stegnar P. 1994 a. Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations. I. Toxic effects of Cd, Zn and Hg in relation to the metallothionein level. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 107: 249–257.

Pavicic J, Smodis B, Skreblin M, Krebar I, Stegnar P. 1994b. Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations. II. Stage specific fluctuations in sensitivity toward Zn and Cd and their bioaccumulation into veliger larvae. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 109 : 37–46.

Peakall D.B .1992. Animal biomarkers as pollution indicators. *London: Chapman Prog. Ser*. 162: 125-135.

Pelliccia F, Barzotti R, Volpi E.V, Bucciarelli E, Rocchi A. 1998. Nucleotide sequence and chromosomal mapping of the 5S rDNA repeat of the crustacean *Proaxellus coxalis*. *Genome*. 41: 129–133.

Phillips D. J. H. 1976. The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. *Mar. Biol*. 38: 59–69.

Piscator M. 1964. On cadmium in normal human kidneys with a report on the isolation of metallothionein from cadmium exposed rabbit livers. *Nord Hyg Tidskr*. 45:76-82.

R

Rainbow P.S. 1993. The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. In Dallinger R, Rainbow P.S (eds). Ecotoxicology of metals in invertebrates. *Lewis publishers, Boca Raton*. pp 3-24.

Rasmussen E. 1973. Isefjord fauna : mollusca : lamellibranchia. *Ophelia*. 11: 290-495.

Ray S. 1986. Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Experientia.* 50 : 65-75.

Ridlington J.W, Fowler B.A. 1977. Isolation and partial characterization of an inductible cadmium-binding protein from American oyster. *The Pharmacol*. 19: 180-185.

Ridlington J.W, Fowler B.A. 1979. Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from the american oyster (*Crassostrea virginica*). *Chem. Biol. Interact*. 25: 127–138.

Riek R, Prêcheur B, Wang Y, Mackay E.A, Wider G, Guntert P, Liu A, Kagi J.H.R, Wuthrich K. 1999. NMR structure of sea Urchin (strongylocentrotus purpuratus) metallothionein MTA. *J. Mol. Biol*. 291: 417-428.

Riginos,C. and Henzler,C.M. 2008. Patterns of mtDNA diversity in North Atlantic populations of mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol*. In press

Ringwood A.H, Brouwer M. 1993. Expression of constitutive and metal-inductible metallothioneins in oyster embryos (*Crassostrea virginica*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 106: 523–529.

Ringwood A.H, Brouwer M. 1995. Patterns of metallothionein expression in oyster embryos. *Mar. Environ. Res*. 39: 101–105.

Roesijadi G, Drum A.S, Thomas J.M, Fellingham G.W. 1982 a. Enhanced mercury tolerance in marine mussels and relationship to low weight, mercury-binding proteins. *Mar. Pollut. Bull*. 13 : 250–253.

Roesijadi G, Calabrese A, Nelson D.A. 1982b. Mercury-binding proteins of *Mytilus edulis*. In: Vernberg, W.B., Calabrese, A., Thurberg, F.P., Vernberg, F.J. (Eds.), Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity. *Academic Press, New York*. pp.75–87.

Roesijadi G. 1986. Mercury-binding proteins from the marine mussel, *Mytilus edulis*. Environ. *Health. Perspect*. 65: 45–48.

Roesijadi G, Fellingham G.W. 1987. Influence of Cu, Cd and Zn pre-exposure on Hg toxicity in the mussel *Mytilus edulis*. *Can. J. Fish. Aquatic Sci*. 44: 680–684.

Roesijadi G, Unger M.E, Morris J.E. 1988. Immunochemical quantification of metallothionein of a marine mollusc. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 1257–1263.

Roesijadi G, Klerks P. 1989. A kinetic analysis of Cd-binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. *J. Exper. Zool*. 251: 1-12.

Roesijadi G. 1992. Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol*. 22: 81–114.

Roesijadi G. 1994. Metallothionein induction as a mesure of response to metal exposure in aquatic animals. *Envron. Health. Perspect*. 102: 91-96.

Roesijadi G. 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 113:117-123.

Roesijadi G, Brubacher L, Unger M.E, Anderson R.S. 1997. Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen intermediates in molluscan hemocytes exposed to Cd in vitro. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 118: 171-176.

Roméo M, Gnassia-Barelli M. 1995. Metal distribution in different tissues and in subcellular fractions of mediterranean clam *Ruditapes decussatus* treated with cadmium, copper or zinc. *Comp. Biochem. Physiol. C* .111: 457-463.

Romero-Isart N, Vasak M. 2002. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J. Inorg. Biochem*. 88 :388-396.

S

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

Sajdak S.L, Reed K.M, Phillips R.B. 1998. Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. *J. Mol. Evol*. 46: 680–688.

Sato M, Kondoh, M. 2002. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku. J. Exp. Med.* 196: 9–22

Schneider J.A, Foighil D.O. 1999. Phylogeny of giant clams (cardiidae: Tridacninae) based on partial mitochondrial 16S rDNA gene sequences. *Mol. Phylo. Evol*. 13: 59-66.

Serafim M.A, Bebianno M.J. 2001. Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: sex and seasonal effects. *Environ. Toxicol. Chem*. 20 : 544-552

Serbaji M.M. 1991. Contribution à l'étude de l'impact des rejets industriels et urbains sur l'environnement marin de la région de Sfax- essais de traitements. DEA. *Université de Tunis II (Tunisia).*

Serbaji M.M. 2000. Utilisation d'un SIG multi-sources pour la compréhension et la gestion intégrée de l'écosystème côtier de la région de Sfax (Tunisie). Doctorat de spécialité. *Université de Tunis II, Tunisie*.

Serfling E, Lübbe A, Dorsch-Häsler K, Schaffner W. 1985. Metal-dependent SV40 viruses containing inducible enhancers from the upstream region of metallothionein genes. *The EMBO Journal*. 4:3851-3859.

Sergent O, Griffon B, Cillard P, Cillard J. 2000. Alcool et stress oxydatif. *Pathol biol*. 49: 689-695.

Serra R, Carpenè E, Marcantonio A.C, Isani G. 1995. Cadmium accumulation and Cd-binding proteins in the bivalve *Scapharca inaequivalis*. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 111: 165–174.

Serra R, Isani G, Tramontano G, Carpenè E. 1999. Seasonal dependence of cadmium accumulation and Cd-binding proteins in *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 123: 165–174.

Sies H (eds). 1991. Oxidative stress: introduction. In Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Academic Press, London*. pp. xv-xxii.

Simes D.C, Bebianno M.J, Moura J.J. 2003. Isolation and characterisation of metallothionein from the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Toxicol*. 63: 307-318.

Smaoui-Damak W, Hamza-Chaffai A, Berthet B, Amiard J.C. 2003. Preliminary study of the clam *Ruditapes decussatus* exposed *in situ* to metal contamination and originating from the Gulf of Gabès, Tunisia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 71: 961-970.

Smaoui-Damak W, Hamza Chaffai A, Bebianno M.J, Amiard J.C .2004. Variation of metallothioneins in gills of the clam *(Ruditapes decassatus)* from the Gulf of Gabès, (Tunisia). *Comp. Biochem. Physiol.C*. 139: 181-188.

Sobral P, Widdows J. 2000. Effects of increasing current velocity, turbidity and particle-size selection on the feeding activity and scope for growth of *Ruditapes decussatus* from Ria Formosa, southern Portugal. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 245: 111-125.

Sola L, Rossi A.R, Annesi F, Gornung E. 2003. Cytogenetic studies in *Sparus auratus* (Pisces, Perciformes): molecular organization of the 5S rDNA and chromosomal mapping of the 5S and 45S ribosomal genes and of telomeric repeats. *Hereditas*. 139: 232–236.

Somero G.N. 1995. Proteins and temperature. *Annual Review of Physiology*. 57:43-68.

Steinebach O.M, Wolterbeek B.T. 1992. Metallothionein biodegradation in rat hepatoma cells: a compartmental analysis aided ^{35}S-radiotracer study. *Bioch. Biophy. Acta*. 1116:155-165.

Stohs J. S, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. 2000. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Patho. Oncol*. 19: 201-213.

Stuart G.W, Searle P.F, Chen H.Y, Brinster R.L, Palmiter R.D. 1984. A 12-base-pair DNA motif that is repeated several times in metallothionein gene promoters confers metal regulation to a heterologous gene. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of Americ*a. 81:7318-7322.

Stuart G.W, Searle P.F, Palmiter R.D. 1985. Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. *Nature*. 6040:828-831.

Suhy D.A, Simon K.D, Linzer D.I, O'Halloran T.V. 1999. Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. *J. Biol. Chem*. 274: 9183-9192.

Sunderman F.W, Marzouk A, Hopfer S.M, Zaharia O, Reid M. C. 1985. Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. *Ann. Clin. Lab. Sci*. 15: 229-236.

Suzuki A, Thies R, Yamaji N, Song J, Wozney J. 1994. A truncated BMP receptor affects dorsal-ventral patterning in the early Xenopus embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:10255-10259.

T

Talbot V, Magee R.J. 1978. Naturally-occurring heavy metal binding proteins in invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 7: 78–81.

Tang B, Zhou K, Song D, Yang G, Dai A. 2003. Molecular systematics of the Asian mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea: Brachyura). *Mol. Phylo. Evol*. 29: 309-316.

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* (Cg MT1). *Aquat. Toxicol*. 55: 35-47.

Thiele D.J, Walling M.J, Hamer D.H. 1986. Mammalian metallothionein is functional in yeast. *Science*. 231: 854-856.

Thompson J.D, Higgins D.G, Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of
progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionsspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22:4673- 4680.

Thompson J.D, GibsonT.J, Plewnia F, Jeanmougin F, HigginsD.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 24:4876-4882.

Trang BQ. 2006. Analyse de l'évolution phylétique de crustacés décapodes et de l'évolution moléculaire des éléments mobiles de la famille mariner présents chez ces organismes. *Thèse de doctorat de l'université du Maine, France*. pp 198.

Trigui-El Menif N. 1995. La palourde *Ruditapes decussatus* des côtes tunisiennes : biométrie, reproduction et impact de l'environnement sur la bioaccumulation en métaux traces. *Thèse de 3ème cycle. Université de TunisII*. pp 261.

U

Unger M.E, Chen T.T, Murphy C.M, Vestling M.M, Fenselau C, Roesijadi G. 1991. Primary structure of molluscan metallothionein deduced from PCR-amlplified cDNA and mass spectrometry of purified proteins. *Biochem. Biophys. Acta*. 1074: 371–377.

Unger M.E, Roesijadi G. 1993. Increase in metallothionein mRNA accumulation during Cd challenge in oysters preexposed to Cd. *Aquat. Toxicol*. 34: 185-193.

V

Veldhuisen-Tsoerken M. B, Holwerda D.A, Zandee D. I. 1991. Anoxic survival time and metabolic parameters as stress indices in sea mussels exposed to cadmium or polychlorinated biphenyls. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 20: 259-265.

Viarengo A, Pertica M, Mancinelli G, Zanicchi G, Orunesu M. 1980. Rapid induction of copper-binding proteins in the gills of metal exposed mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 67: 215–218.

Viarengo A, Zanicchi G, Moore M.N, Orunesu M. 1981. Accumulation and detoxication of copper by the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam: A study of the subcellular distribution in the digestive gland cells. *Aquat. Toxicol*. 4:147-157.

Viarengo A, Pertica M, Mancinelli G, Palmero S, Orunesu M. 1982. Effects of Cu^{++} on nuclear RNA polymerase activities in mussel digestive gland. *Mar. Biol. Lett*. 3: 345-353.

Viarengo A, Pertica M, Mancinelli G, Palmero S, Zanicchi G, Bouquegneau J.M, Orunesu M. 1984. Biochemical characterization of copper-thioneins isolated from the tissues of mussels exposed to the metal. *Mol. Physiol*. 5: 41–52.

Viarengo A, Palmero S, Zannicchi G, Capelli R, Vaissiere R, Arunesu M. 1985. Role of metallothionein in Cu and Cd accumulation and elimination in the gill and digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* Lam . *Mar. Environ. Res*. 16: 23-36.

Viarengo A. 1989. Heavy metals in marine invertebrates : mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci*. 1: 295-317.

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

Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Mancinelli G, Accomando R, Smaal A.C, 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.

Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbari R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res*. 44: 69-84.

Viarengo A, Burlando B, Cavaletto M, marchi B, Ponzano E, Blasco J. 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus edulis*. *Am. J. Physiol*. 277: 1612-1619.

W

Wanna W, Chotigeat W, Phongdara A. 2006. Sequence variations of the first ribosomal internal transcribed spacer of Penaeus species in Thailand. *J. expe. Mar. Biol. Ecol*. 331: 64-73.

Wilson A. C, Cann R.L, Carr S.M, George M, Gyllenstein U.B, Helm-Bychowsi K.M, Higuchi R.G, Palumbi S.R, Prager E.M, Sage R.D, Stoneling M .1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. linnean society*. 26: 375-400.

Woese C. R. 1987. Macroevolution in the microscopic world. In Patterson C (eds) Molecules and morphology in evolution: Conflict or compromise?. *Cambridge, England, Cambridge Univ. Press***.** pp 176-202.

Wood A.R, Apte S, MacAvoy E.S, Gardner J.P.A. 2007. A molecular phylogeny of the marine mussel genus Perna (Bivalvia: Mytilidae) based on nuclear (ITS1 &2) and mitochondrial (COI) DNA sequences. *Mol. Phylo.Evol*. 44: 685-698.

Z

Zardi G.I, McQuaid C.D, Teske P.R, Barker N.P. 2007.Unexpected genetic structure of mussel populations in South Africa: indigenous *Perna perna* and invasive *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser*. 337: 135-144.

Zhang, L.-B. et M. P. Simmons. 2006. Phylogeny and Delimitation of the Celastrales Inferred from Nuclear and Plastid Genes. *System. Botany*. 31: 122-137.

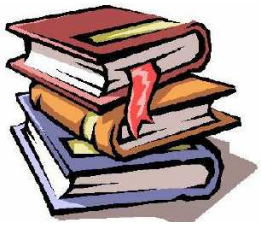
Zairi M, Rouis M.J. 1999. Impacts environnementaux du stockage du phosphogypse à Sfax (Tunisie). *Bull. Lab. Ponts Chaussées*. 219 : 29– 40.

Zhu Z, DeRose E. F, Mullen G. P, Petering D. H, Shaw C. F. III. 1994. Sequential proton resonance assignments and metal cluster toplogy of lobster metallothionein-1. *Biochem.* 33: 8858-8865.

Zielinski S, Portner H.O. 2000. Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age?. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 125: 147-160.

Zouari S. 1985. Contribution à l'étude systèmatique des lamellibranches des côtes tunisiennes. DEA. *Faculté des sciences de Tunis*. pp 245.

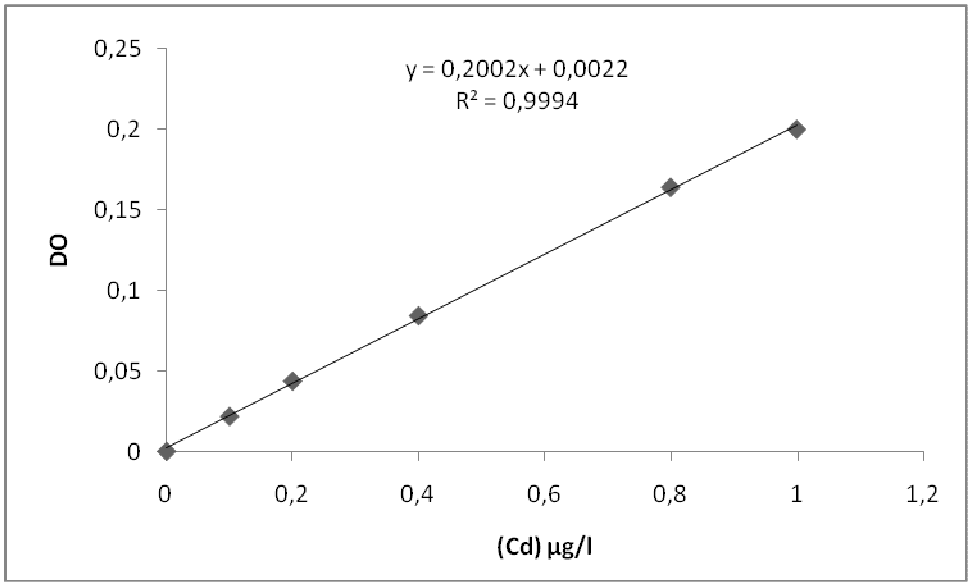
.



ANNEXES

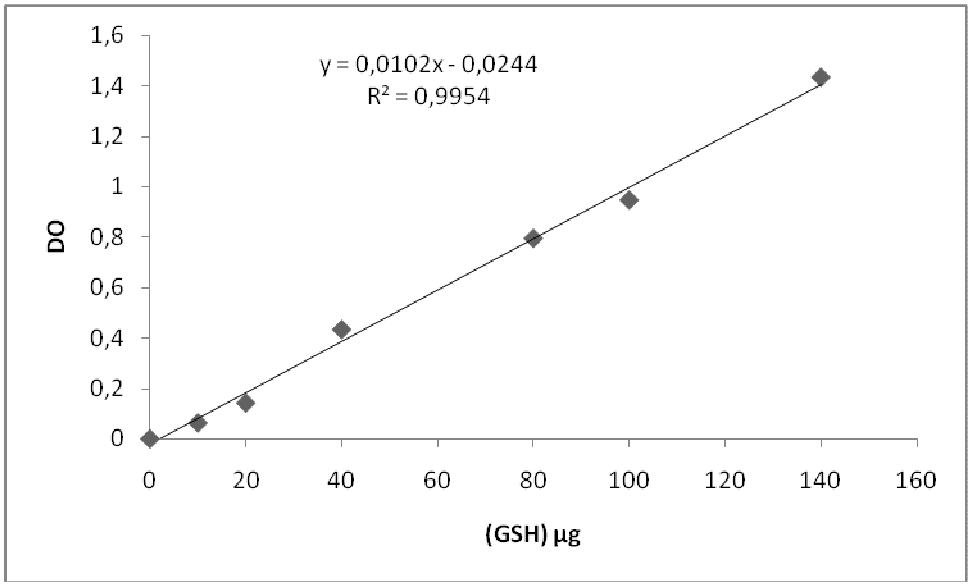
ANNEXE I

Courbe standard des étalons de cadmium portant en abscisse les concentrations des standards de cadmium exprimées en µg/l et en ordonnées les densités optiques.



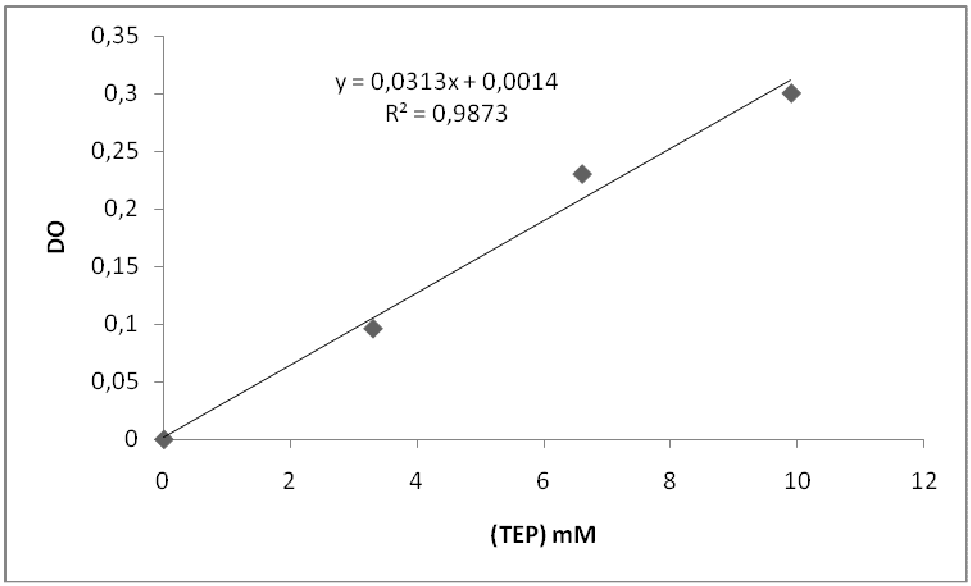
ANNEXE II

Courbe standard des étalons de GSH portant en abscisse les concentrations des standards de (GSH) exprimées en µg et en ordonnées les densités optiques.



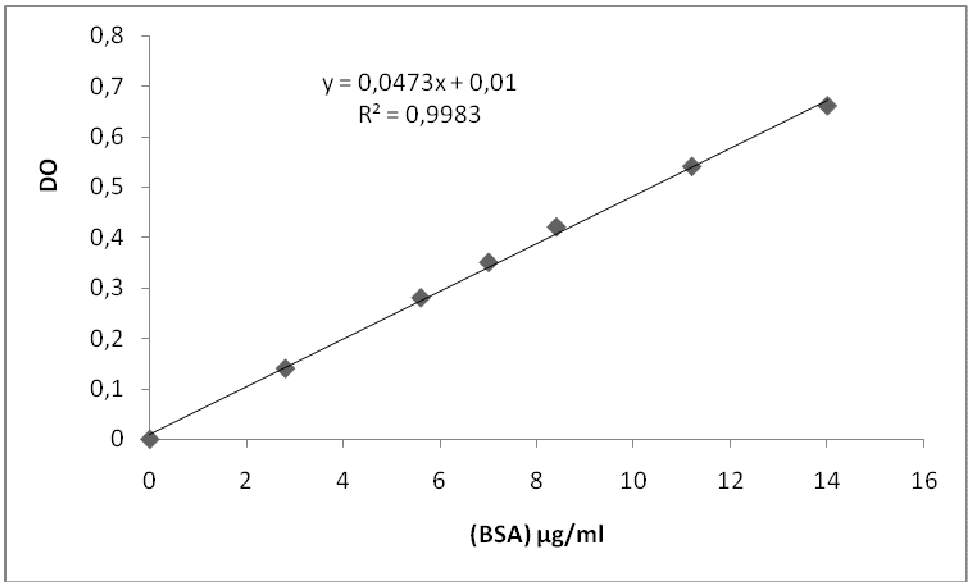
ANNEXE III

Courbe standard des étalons de TEP (1,1,3,3-Tétraéthoxypropane) portant en abscisse les concentrations des standards de (TEP) exprimées en mM et en ordonnées les densités optiques.



ANNEXE IV

Courbe standard des étalons de BSA portant en abscisse les concentrations des standards de (BSA) exprimées en µg/ml et en ordonnées les densités optiques.



ANNEXE V

1. Milieux de culture

-LB liquide : 0,5 extrait de levure ; 1% bacto-tryptone ; 1% NaCl.

-LB solide : LB liquide + 2% agar-agar.

-LBA : LB + 100µg/ml d'ampicilline.

2. Solutions et tampons

-Solution I : 25mM Tris-HCl ; 50mM glucose ; 10mM EDTA.

-Solution II : 0,2 M NaOH ; 2% SDS.

-Solution III : 3 M Acétate de sodium, pH5,2.

-T.E : 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 ; 1mM EDTA, pH 8.

-TBE 10X : 0,89 M Tris-HCl ; 0,89 M acide borique ; 20 mM EDTA.

-BET : 10mg/ml

-Tampon de dépôt d'ADN : 0,5% bleu de bromophénol ; 0,25 % xylène cyanol FF ; 30% glycérol.

- 20XSSC : 3M NaCl ; 0,3M citrate trisodique.

-Tampon de préhybridation : 6XSSC ; 1X Denhardt ; 0,1%SDS et 100µg/ml ADN de sperme de saumon dénaturé (10 min à 100° C).

-SDS 10% : 10g de SDS (sodium dodécyl sulfate) dans 100ml d'eau.

-Tampon Tris (50mM, pH 8,6) : 6,057 g de Tris + 0,357 ml de β mercaptoéthanol, compléter à 1l avec de l'eau bidistillée et ajuster le pH à 8,6.

LADHAR-CHAABOUNI R, MACHREKI-AJMI M and HAMZA-CHAFFAI A (2009) Spatial distribution of cadmium and some biomarkers in Cerastoderma glaucum living in a polluted area. Marine biology research, in press.

LADHAR-CHAABOUNI R, SMAOUI-DAMAK W and HAMZA-CHAFFAI A (2009) In vivo variation of some biomarkers with time and cadmium concentration in the cockle Cerastoderma glaucum. Marine biology research, in press.

LADHAR-CHAABOUNI R, GARGOURI- MOKDAD R, DENIS F and 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, DOI 10.1007/s11033-008-9274-8.



LADHAR-CHAABOUNI R, GARGOURI R and HAMZA-CHAFFAI A (2007) Effect of cadmium on some biomarkers in the clam Ruditapes decussatus: metallothionein quantification using two techniques. International journal of environment and pollution, 30: 593-605.



Publication 5

MACHREKI-AJIMI M, KETATA I. , **LADHAR-CHAABOUNI R** and HAMZA-CHAFFAI, (2008) The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers in Cerastoderma glaucum. Ecotoxicology ,17:1-11



Publication 1

LADHAR-CHAABOUNI R, MACHREKI-AJMI M and HAMZA-CHAFFAI A (2009) Spatial distribution of cadmium and some biomarkers in Cerastoderma glaucum living in a polluted area. Marine biology research, in press.

Marine Biology Research, 2009; 00: 0–00

ORIGINAL ARTICLE

Spatial distribution of cadmium and some biomarkers in *Cerastoderma glaucum* living in a polluted area

RIM LADHAR-CHAABOUNI, MONIA MACHREKI-AJMI & AMEL HAMZA-CHAFFAI

IPEIS, Sfax, Tunisia

Abstract
Elevated cadmium concentrations were observed at the southern part of Sfax which received direct contamination via water discharge from the crude phosphate treatment plant and indirect contamination by the stock of phosphogypsum. In this area the ecosystem is completely destroyed that is why it was necessary, for sample collection, to move toward the south. In order to determine a spatial distribution of pollution in this area and the consequences of this contamination on the cockles *Cerastoderma glaucum*, contour maps of cadmium (Cd), metallothionein like protein (MTLP), malondialdehyde (MDA) concentrations and acetylcholinesterase (AChE) activity were established. Contour mapping techniques showed elevated concentrations of Cd, MTLP and MDA in samples from Zarb El Ain toward the south and decreasing concentrations from the coast toward the east. The distribution pattern of AChE activity was opposite to the Cd concentrations. Our results showed that the area studied suffered from severe problems caused by the pollution transported from the phosphate treatment plant by the north–south streams.

Key words: Biomarkers, cadmium, *Cerastoderma glaucum*, interpolation, spatial distribution, pollution

Introduction

The Gulf of Gabès is situated in the south-eastern coast of Tunisia. This ecosystem is known to be rich in aquatic resources and contributes to about 65% of the national production in Tunisia (Hamza-Chaffai et al. 2003). Unfortunately, important industrial activity, most especially a phosphate treatment plant, is now being developed along the coasts, exposing coastal waters and marine organisms to increasing contamination (Zairi & Rouis 1999; Hamza-Chaffai et al. 2000). In fact, the marine ecosystem was completely destroyed around the crude phosphate treatment plant. This ability to act as a sink for metals at distance from sources demonstrates the need for monitoring in this sensitive environment. Biomonitoring based on measures of contaminants in seawater presents some disadvantages, such as the low concentrations and the random spatial and temporal variations. The sediment is a long-term integrator of pollution where concentrations are higher than in seawater, but contaminants are not always bioavailable for organisms owing to their physico-chemical forms (Hamza-Chaffai 2004). That is why the use of living organisms called biomonitors is preferable for measuring pollutants (Serafim & Bebianno 2001). In fact, these organisms usually accumulate contaminants from water and food, a fact reflecting only the bioavailable fraction that is of potential ecotoxicological significance. The cockle *Cerastoderma glaucum* is widely distributed along the Tunisian coast. This species is a sedentary, filter-feeding marine bivalve, thus satisfying criteria for a good bioindicator of pollution (Machreki-Ajmi & Hamza-Chaffai, 2006). Recently, biomarkers measured at the cellular level in the cockle *C. glaucum* have been proposed as sensitive 'early warning' tools for biological effect measurement in environmental quality assessment along the gulf of Gabès area (Machreki-Ajmi et al. 2007).

The little information about the usefulness of biomarkers in *C. glaucum* as powerful tools to detect the exposure and biological effect of marine pollution justifies the importance of this study. Among others, the following biomarkers received special attention: metallothioneins (MTs) or metallothionein like protein (MTLP) induction, malondialdehyde (MDA)

Correspondence: Rim Ladhar-Chaabouni, IPEIS, BP 805-3018 Sfax, Tunisia (Ecotoxicologie Marine, UR 09-03). E-mail: rladhar@yahoo.fr or chaabouni.skander@tunet.tn

(Accepted 8 October 2008; Printed XX XXX XXXX)

ISSN 1745-1000 print/ISSN 1745-1019 online © 2009 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/17451000802683985

synthesis and acetylcholinesterase (AChE) inhibition.

MTs are a class of heat-stable metal binding proteins of non-enzymatic nature, characterized by a unique amino acid composition with a very high cystein content. These low molecular weight proteins have been identified in various tissues of vertebrates and invertebrates (Amiard & Cosson 1997). Given their molecular properties and their role in metal uptake, transport, storage and excretion, MTs offer considerable potential as a contaminant-specific biochemical indicator of metal exposure (Roesijadi 1992). This biomarker has been widely used for assessing metal contamination in the marine environment (Carpené 1993; Amiard & Cosson, 1997; Hamza-Chaffai et al. 2000, 2003). Malondialdehyde was also measured as reflecting metal effect on the state of lipid peroxidation of the membrane (Hamilton & Merle 1986; Hamza-Chaffai et al. 2003) and it was proposed to appraise the health status of exposed species (Di Giulio et al. 1993; Thomas & Wofford 1993; Solé et al. 1996). AChE is responsible for the degradation of the neural transmitter acetylcholine to choline in cholinergic synapses and neuromuscular junctions. Its inhibition is directly linked with the mechanisms of toxic action of organophosphorus and carbamate insecticides (Ceron et al. 1996; Hernandez et al. 1998). In addition to anticholinesterase insecticides, other classes of environmental contaminants like heavy metals (Gill et al. 1990) have the potential to decrease AChE in exposed organisms. For this aim, the measurement of AChE activity is considered of great interest in evaluating the effects of exposure to neuro-toxic compounds like metals (Hamza-Chaffai et al. 1998) in aquatic invertebrates, especially since few studies have been made on AChE in these organisms (Lionetto et al. 2003) and particularly the cockle *C. glaucum*.

The main objectives of the present study are: (i) to determine the spatial distribution of cadmium in a site affected by a polluted stream; and (ii) to determine the relationships between Cd bioaccumulation and some biomarkers in cockles exposed to metals in their natural habitat. The distribution maps of cadmium and some biomarkers reflect the toxicological status of *C. glaucum* in a metal-contaminated environment.

Materials and methods

Samples collection

Cerastoderma glaucum were collected from Zarb El Ain, which is situated 17 km south of Sfax (Tunisia) and 8.5 km south of a 'hot spot' of pollution originating from crude phosphate treatment plant (Figure 1). It was the nearest site where the cockles were found. A preliminary study was carried out in order to determine a grid for sample collection. In fact, 17 sampling stations were selected and the in toto cadmium was measured. The sampling points of the final grid were selected on the basis of this preliminary study (Figure 2) and a random sampling was realized. The limits of the gird were fixed according to the following points:

- no cockles were available after 200 m to the east;
- the distance 1000 m to the south was sufficient to show how the pollution migrated in the studied area.

Tissue preparation

After dissection, the digestive glands (20 samples/sampling point) were divided in order to determine the metallothionein like protein, and malondialdehyde concentrations in the same organ. Then, they were homogenized (only organs intend for the MTLP dosage) with Tris–HCl buffer (Tris20 mM, NaCl 150 mM and β mercaptoethanol 10 mM, pH = 8.6). The homogenates were ultracentrifuged (25,000*g*, 1 h, 4°C). The supernatants (soluble fraction S_1) were separated from the pellet (P1). Then, they were heat-denatured (80°C/15 min) and subsequently centrifuged (20,000*g*, 30 min, 4°C) for the MTLP quantification as described by Hamza-Chaffai et al. (2000). The sex was determined by the identification of the gonads using optical microscopy.

Metal analysis

For metal analysis, the soft tissues (15 samples/sampling point) from each individual were dried, and then digested with suprapure nitric acid until the solution was clear. Cadmium was then analysed by atomic absorption spectrophotometry (flame) using the Zeeman correction (Hitachi Z 6100). This methodology has been validated through international intercalibration exercises (NILU HTU/O-7729). Internal quality controls were based on the analysis of Cd in standard reference materials (mussel tissues, SRM-2976) from the National Institute of Standard and Technology. Data obtained were 0.75 ± 0.12 μg/g compared with a certified value of 0.82 ± 0.16 μg/g.

Metallothionein-like protein analysis

The heat-stable fractions (the supernatant of the second centrifugation) were added to 4.2 ml of 0.43

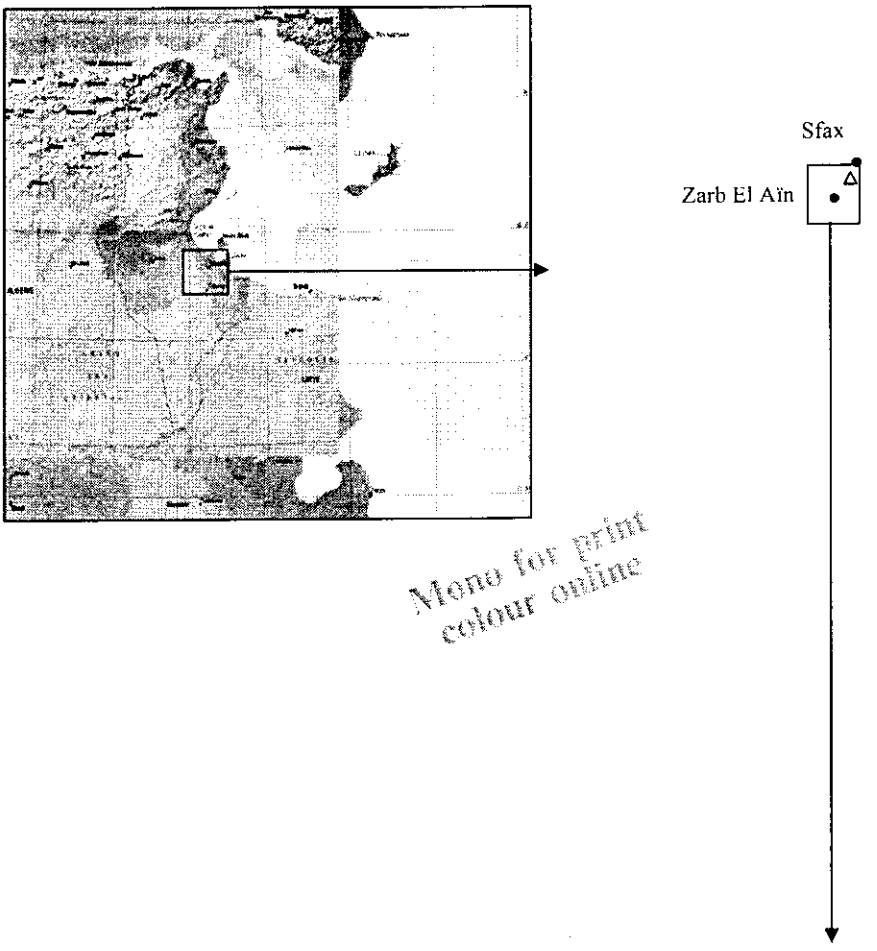


Figure 1. Location of the sampling station in the gulf of Gabès. (): crude phosphate treatment plant.

mM DTNB in 0.2M phosphate buffer. The concentration of reduced sulfhydryls was evaluated by reading the absorbance at 412 nm, by using glutathione (GSH) as a reference standard (Viarengo et al. 1997).

Malondialdehyde analysis

A cold KCl solution (150 mM) was used for the extraction of malondialdehyde (MDA) in the half part of the digestive glands. 1,1,3,3-Tetraethoxypropane was used for the standard and the reaction was developed with the addition of 2-thiobarbituric acid (Sunderman et al. 1985).

Acetylcholinesterase analysis

For acetylcholinesterase measurements, gills (20 samples/sampling point) were homogenized in phosphate buffer (0.1 M, pH = 7.4) at a ratio of 3 ml of buffer for 1 g of tissues. The homogenate obtained was then centrifuged at 9000*g* for 20 min at 4°C. An aliquot of the supernatant was used for measuring AChE according to the method of Ellman et al. (1961), modified for microplate reading by Bocquené & Galgani (1998). The extracts were incubated in the presence of acetylthiocholine iodide as substrate and 5.5′-dithiobis-2-dinitrobenzoic acid (DTNB). The reaction was carried out at 25°C and the absorption was measured by a spectrophotometer at 412 nm. The enzymatic reaction rate was quantified against a blank without substrate for each activity measurement. A second blank was performed without sample to subtract the spontaneous hydrolysis of the substrate. AChE activity is expressed as nmol of the product developed per minute and per mg of proteins. The quantity of protein present in the homogenate was determined according to the methods of Bradford (1976) at 595 nm, using bovine serum albumin (BSA) as a reference standard.

Statistical analysis

To determine the spatial distribution of Cd and the biomarkers (MTLP, MDA, AChE), an interpolation

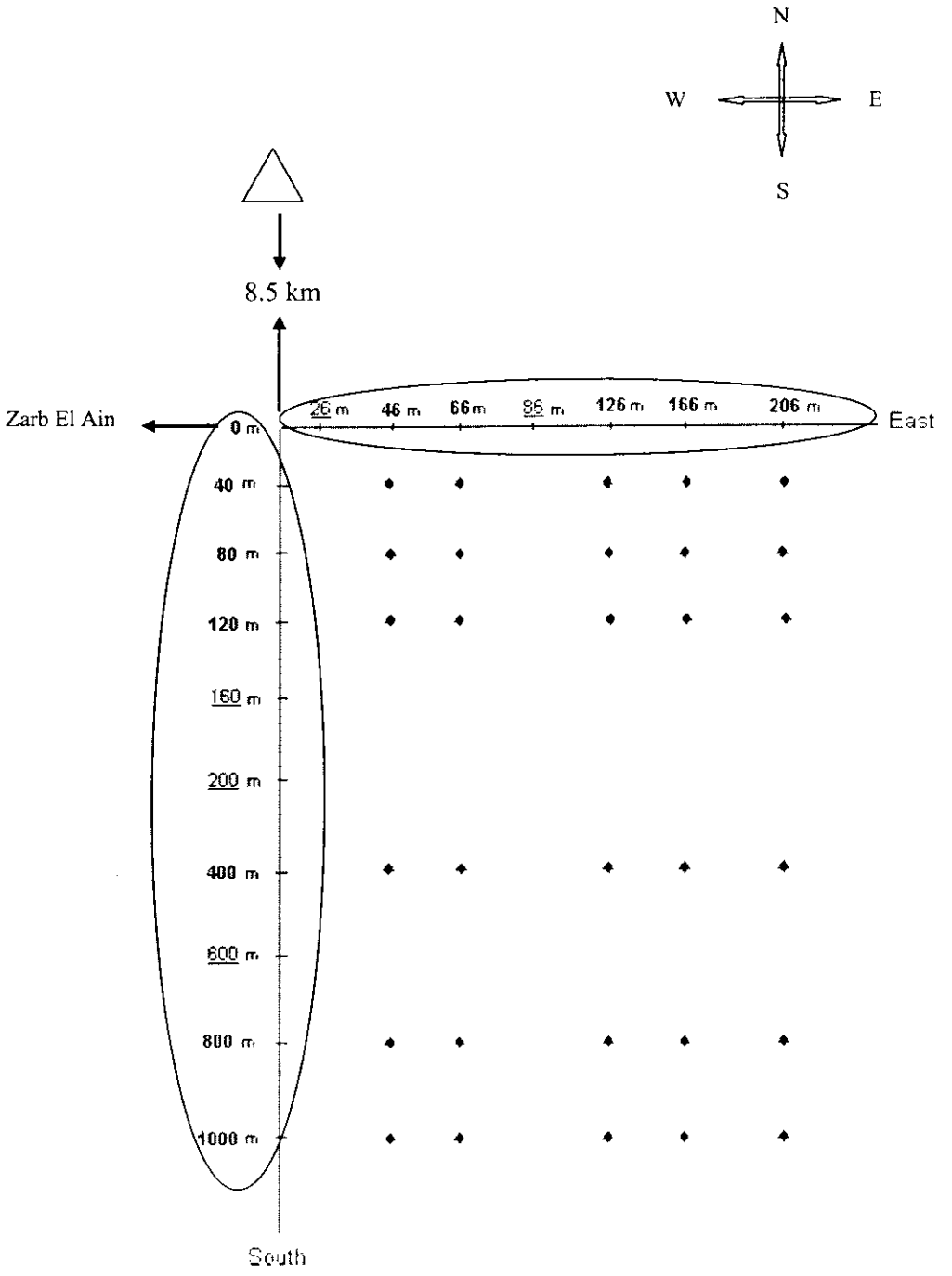


Figure 2. The preliminary and the final grid of the sampling collection: the 17 points of the preliminary grid were encircled and the eliminated points of the sampling collection were underlined. The points in bold represent the nodes of the final grid.

method was used. It was a reliable interpolation method which based on an intermediate contour map generation using the MINITAB 15 statistical software based on the Akima interpolation (Akima 1970). Multiple regression and correlation coefficients were determined using the program SPSS software.

Results

The choice of the final grid nodes

Based on the results of in toto cadmium concentrations, sampling points which showed no significant variation were not presented in the final grid (Figure 2). In fact, toward the south, no significant variation

was observed between the points 120 and 160 m, 120 and 200 m, or 600 and 800 m. Toward the east, no significant variation was determined between the points 26 and 46 m, or 46 and 66 m. This is why the points 160 m, 200 m and 600 m toward the south and 26 m and 86 m toward the east were not presented in the final grid (Figure 2).

Spatial distribution of Cd and the studied biomarkers

A contour mapping technique was used to determine the spatial distribution of cadmium bioaccumulation, MTLP and MDA concentrations and AChE activity in *Cerastoderma glaucum*.

A gradient of increasing and decreasing of cadmium concentrations was established toward the south and toward the east, respectively. The highest Cd concentrations were registered at approximately 700–1000 m toward the south (Figure 3). Similarly, the general pattern of the variation of the MTLP and MDA concentrations showed an increase toward the south and a decrease toward the east with some exceptions. In fact, the highest MDA concentrations were observed at points approximately 480 m to the south, 175 m to the east and approximately 600 m to the south and 160 m to the east (Figures 4 and 5). In the case of the AChE activity, the distribution pattern is opposite that of the cadmium concentrations (Figure 6). From approximately 800 m to the south of Zarb El Ain, no increase of the AChE activity toward the east was observed.

The relationships between MTLP, MDA, AChE and cadmium concentrations are presented in Figure 7. The MTLP and MDA concentrations increased along the metal gradient and this increase was positively correlated with cadmium concentration. The correlation was more significant for the MTLP than for the MDA. However, the acetylcholinesterase activity showed a significant decrease with increasing in cadmium concentration.

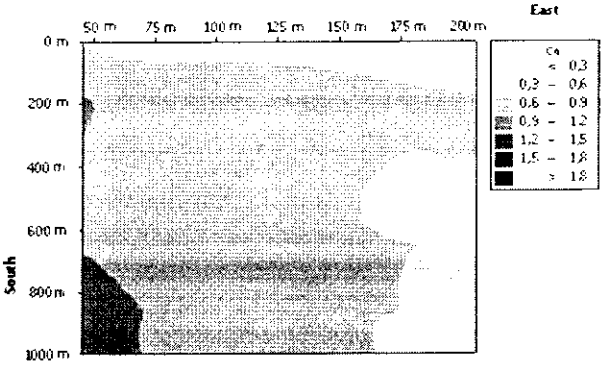


Figure 3. Distribution map of Cd concentrations (µg/g dry wt) in the whole soft tissue of *Cerastoderma glaucum*.

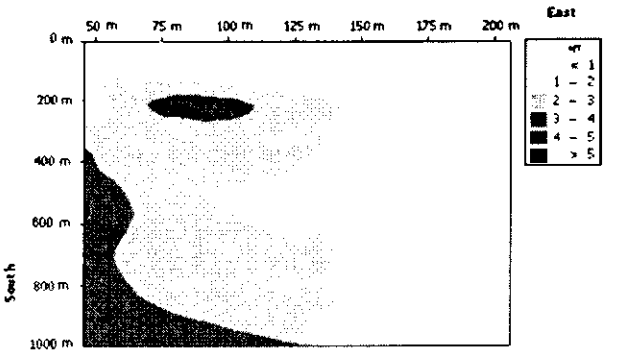


Figure 4. Distribution map of MTLP concentrations (mg/g wet weight) in digestive gland of *Cerastoderma glaucum*.

Effect of some biotic factors on the studied biomarkers concentrations

In order to compare the relative importance of the biotic factors (size, body mass and sex) and contaminant sources (cadmium), multiple regression analyses were performed to express biomarkers (MTLP, MDA and AChE) levels as a function of cadmium levels and biotic factors. Independent variables were standardized, the sex was introduced as a dummy variable. Concentrations of each biomarker can be expressed as a linear model: $Y = x_0 + x_1 Cd + x_2$ size $+ x_3$ mass $+ x_4$ sex. Values of (x_0, x_1, x_2, x_3, x_4), the significance of each coefficient (t-test) and R^2 are presented by the following models (I), (II) and (III), t-values are between brackets.

Model (I) MTLP (DG) $= 3.85 + 1.98$ Cd $- 0.12$ size

($R^2 = 0.27$) ($t = 11.62$) ($t = -5.14$)

Model (II) MDA $= 9.97 + 2.25$ Cd $- 0.158$ size

($R^2 = 0.14$) ($t = 7.64$) ($t = -3.51$)

Model (III) AChE $= -0.66 - 2.48$ Cd $+ 0.18$ size

($R^2 = 0.24$) ($t = -8.51$) ($t = -3.95$)

Models (I),(II) and (III) showed that the MTLP, MDA levels and AChE activity were affected by cadmium and total length (size) in the following order Cd > size. For all studied biomarkers, coeffi-

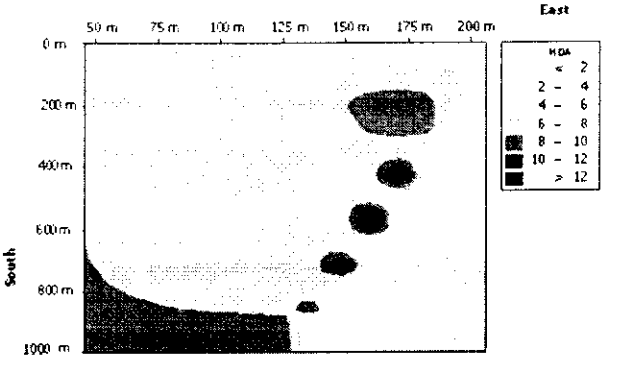


Figure 5. distribution map of MDA concentrations (mM/g wet weight) in digestive gland of *Cerastoderma glaucum*.

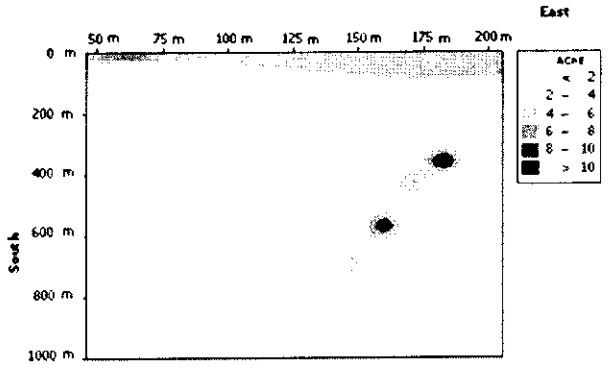


Figure 6. Distribution map of AChE activity (nmol/min/mg Prot) in gills of *Cerastoderma glaucum*.

cients relative to mass and sex were not significant. These observations suggest the importance of size as endogenous factors affecting MTLP, MDA and AChE levels in the cockles *Cerastoderma glaucum*.

Discussion

The marine environment is exposed to different kinds of pollutants capable of affecting the life of marine organisms. In order to optimize without constraints the exploitation of marine resources, one of the major preoccupations of governments and researchers is determining the impact of pollution on the health status of the polluted ecosystems. For this aim, several studies have been interested in the spatial distribution patterns of heavy metals in seawater and marine sediments (Illou 1999; Serbaji 2000).

The originality of the present study consists in using cockles, *Cerastoderma glaucum*, to monitor the bioavailability of cadmium in the southern part of Sfax, which receives direct contamination via water discharge from the crude phosphate treatment plant and indirect contamination from the stock of phosphogypsum. The results showed a decrease in cadmium concentrations toward the east and an increase southwards from the pollution source. These phenomena could be explained by the relatively low water exchange with the adjacent coastal area due to a limited tidal range (tidal amplitude < 50 cm) (Illou 1999) and the presence of littoral currents which transported the industrial wastes in a north-south direction. Consequently and from a human health point of view, cadmium concentrations in the whole soft tissues (in toto) of *C. glaucum* collected from Zarb El Ain were relatively high (more than 1 μg/g dry mass). Similarly, in the clam *Ruditapes decussatus*, collected from the same site, in toto cadmium exceeded the level of 2 μg/g dry mass (Ketata et al. 2007). Moreover, a trace metal enrichment of surface sediments of this area has been documented previously (Illou 1999; Serbaji 2000). In order to determine the effects of the cadmium bioaccumulation at the cellular level, the evaluation of biochemical biomarkers may be useful. For this aim, a multi biomarker approach was used: MTLP in digestive gland, MDA in digestive gland and AChE activity in gills. A high, positive and significant correlation appeared between MTLP and cadmium concentrations. These results suggest that this protein plays an important role in the transport and storage of the heavy metal and also provides a protective role against the toxic effect of cadmium by sequestering it and reducing the concentration of this metal as free metal ions (Hamilton & Merle 1986). Similarly, in other bivalve species like the clam *R. decussatus* (Serafim & Bebianno 2001; Ladhar-Chaabouni et al. 2007), the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Stien et al. 1998), the clam *M. balthica* (Bordin et al. 1996), the oyster *Crassostrea virginica* (Roesijadi 1992) and the oyster *C. gigas* (Mouneyrac et al. 1998), MT levels increased with the increase of the cadmium concentration present in the environment. Thus, MTLP could be used as an early-warning marker for assessing the toxicological status of *C. glaucum* in metal-contaminated environments.

A general pattern of increase of the malondialdehyde (MDA) concentrations along the metal gradient was observed. This increase was positively correlated with the in toto Cd concentrations. Increased levels of MDA following Cd exposure have been reported in some other bivalve studies (Couillard et al. 1995; Cossu et al. 2000; Géret et al. 2002; Ladhar-Chaabouni et al. 2007). These results could be explained by the insufficient response of the antioxidant systems which impaired their ability to neutralize the reactive oxygen species (ROS) and to prevent oxidative damage to biomolecules of the contaminated bivalves (Funes et al. 2006). In the case of the AChE activity, it increased toward the east, except for the points (800 m south, 206 m east) and (1000 m south, 206 m east), and decreased toward the south. A negative and significant correlation was observed between acetylcholinesterase activity and the in toto cadmium concentrations. The AChE activity inhibition by cadmium was previously determined in the cockle *C. glaucum* (Machreki-Ajmi et al. 2006) and in the mussel *M. galloprovincialis* (Najimi et al. 1997). In spite the fact that the cadmium concentrations decrease, an increase of the AChE activity in points (800 m south, 206 m east) and (1000 m south, 206 m east) was not detected. In this case we can suggest that the AChE activity could be influenced by other pollutants present in the studied environment. In fact, Najimi et al. (1997) reported that inhibition of AChE activity was higher

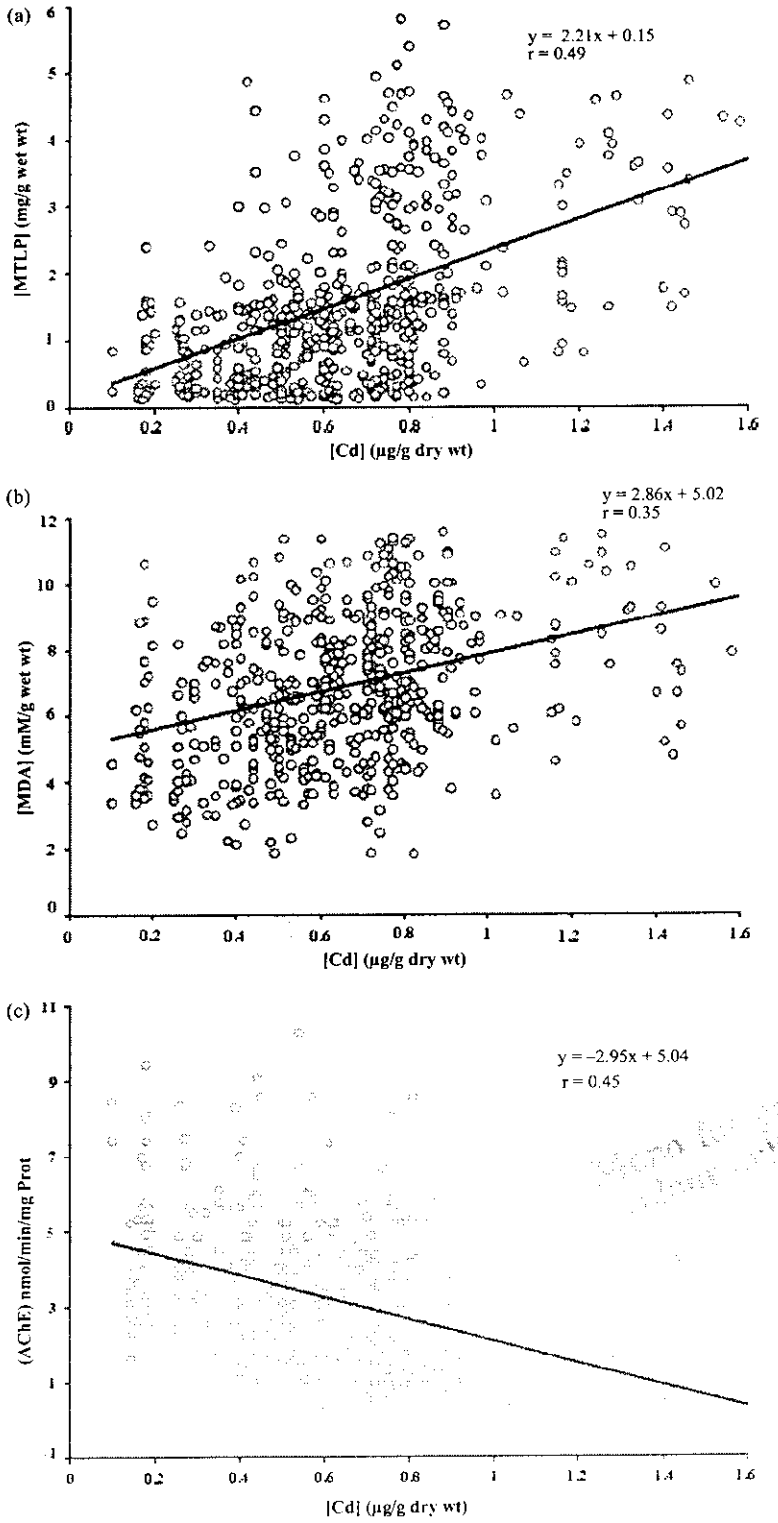


Figure 7. MTLP (a), MDA (b) and AChE (c) concentrations versus in toto cadmium concentrations in the cockle *Cerastoderma glaucum* (*R* significant at 99%).

in mussels exposed to copper or iron compared to cadmium. For both MDA and AChE a 'hot spots' of high concentration or activity were observed. This phenomenon could be explained by the fact that unlike MTLP, these two biomarkers of damage are not specific to metal contamination, but would represent an integrative response to the impact of multiple toxic effects caused by the presence of a

mixture of pollutants other than cadmium in the studied area.

Beside cadmium contamination, biomarker levels could be influenced by some biotic factors (sex, mass, size) related to the characteristics of the individual. These factors are able to influence protein metabolism and metal uptake and accumulation (Amiard et al. 2005). Consequently, the influence of such factors on MTLP, MDA and AChE concentrations in response to exposure to cadmium was taken into account in the present study. Unlike the factor size, mass and sex did not affect the biomarkers (MTLP, MDA and AChE) concentrations in *C. glaucum*. Models (I), (II) and (III) showed a decrease of MTLP and MDA levels and an increase of AChE activity with increasing body size. This fact reflects the phenomenon of 'biological dilution' of Cd, which is widely documented in other bivalves (Amiard & Berthet 1996; Swaileh 1996; Geffard et al. 2002; Raspor et al. 2004; Smaoui-Damak et al. 2006), and less known for the cockle *C. glaucum*.

In this research, exposed bivalves were collected from their natural habitat along a metal contamination gradient. The distribution maps for cadmium and some biomarkers (MTLP, MDA and AChE) were produced and showed a decrease of Cd, MTLP and MDA concentrations toward the large and an increase south ward from the phosphate treatment plant. An increase of MTLP and MDA levels and a decrease of AChE activity with increasing cadmium concentration were also determined. These results revealed the sever impact of anthropogenic inputs for many metals such as cadmium, which play an important toxicological role showed by the variation of the biomarker levels in the cockles *C. glaucum*. The deleterious effects of the industrial effluents were accentuated by the north–south streams which dispersed the pollutants at long distances from the source of pollution. A monitoring of the studied area was necessary before deleterious effects occur.

References

Akima H. 1970. A new method of interpolation and smooth curve fitting based on local procedures. Journal of the Association for Computing Machinery 17:589–602.

Amiard JC, Berthet B. 1996. Fluctuations of cadmium, copper, lead and zinc concentrations in field populations of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in the Bay of Bourgneuf (Atlantic coast, France). Annales de l. institut oceanographique Paris 72:195–205.

Amiard JC, Cosson RP. 1997. Les métallothionéines. In: Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramad F, editors. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspect fondamentaux. Paris: Masson. p 53–66.

Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS. 2005. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic Toxicology 76:160–202.

Bocquené G, Galgani F. 1998. Biological effect of contaminants: Cholinesterases inhibition by organophosphate and carbamate compounds. ICES Tech. Marine Environmental Research 22:1–13.

Bordin G, McCourt J, Raposo FC, Rodriquez A. 1996. Trace metals in the marine bivalve Macoma balthica in the Westerschelde estuary, The Netherlands. Part 3: Variability of the role of cytosol in metal uptake by the clams. Science of the Total Environment 180:241–55.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein–dye binding. Analytical Biochemistry 72:248–54.

Carpené E. 1993. Metallothionein in marine molluscs. In: Dalling R, Rainbow PS, editors. Ecotoxicoloy of Metal in Invertebrate. Boca Raton, FL: Lewis. p 56–72.

Ceron JJ, Ferrando MD, Sancho E, Gutierrez-Panzio C, Andreu-Moliner E. 1996. Effects of diazinon exposure on cholinesterase activity in different tissues of European eel (*Anguilla anguilla*). Ecotoxicology and Environmental Safety 35:222–5.

Cossu C, Doyotte A, Babut M, Exinger A, Vasseur P. 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unito tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediment. Ecotoxicology and Environmental Safety 45:106–21.

Couillard Y, Campbell PGC, Tessier A, Pellerin-Massicott J, Auclair JC. 1995. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher level of biological organization. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 52:703–15.

Di Giulio RT, Habig C, Gallagher EP. 1993. Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. Aquatic Toxicology 26:1–22.

Ellman GL, Courtney KD, Andreas V, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. Biochemical Pharmacology 7:88–95.

Funes V, Alhama J, Navas JI, López-Barea J, Peinado J. 2006. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. Environmental Pollution 139:214–23.

Geffard A, Amiard JC, Amiard-Triquet C. 2002. Kinetics of metal elimination in oysters from a contaminated estuary. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 131:281–93.

Géret F, Serafim A, Barreira L, Bebianno M. 2002. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. Biomarkers 7:242–56.

Gill TS, Tewari H, Pande J. 1990. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: Effects of mercury on tissue enzymes. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 97:287–92.

Hamilton SJ, Merle PM. 1986. Metallothionein in fish: Review of its importance in assessing stress from metal contaminants. Transactions of the American Fisheries Society 115:596–609.

Hamza-Chaffai A, Roméo M, Gnassia-Barelli M, El Abed A. 1998. Effect on copper and lindane on some biomarkers measured in the clam (*Ruditapes decussatus*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 61:397–404.

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. Comparative Biochemistry and Physiology 127:185–97.

Hamza-Chaffai A, Pellerin J, Amiard J.C. 2003. Health assessment of marine bivalve *Ruditapes decassatus* from the gulf of Gabès (Tunisia). Environment International 28:609–17.

Hamza-Chaffai A. 2004. The use of bio indicators and biomarkers in monitoring marine pollution: The Gulf of Gabès case. Proceeding of CMR-VBL, Akita-Sfax Joint Conference, 19–25.

Hernandez F, Serrano R, Pitarch E, Lopez FJ. 1998. Automated sample clean-up procedure for organophosphorus pesticides in several aquatic organisms using normal phase liquid chromatography. Analytica Chimica Acta 374:215–29.

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

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 146:415–30.

Ladhar-Chaabouni R, Gargouri R, Hamza-Chaffai A. 2007. Effect of cadmium on some biomarkers in the clam *Ruditapes decussatus*: Metallothionein quantification by using two techniques. International Journal of Environment and Pollution 30:593–601.

Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Pascariello MF, Marinosci L, Schettino T. 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzyme activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. Marine Pollution Bulletin 46:324–30.

Machreki-Ajmi M, Hamza-Chaffai A. 2006. Accumulation of cadmium and lead in *Cerastoderma glaucum* originating from the Gulf of Gabès, Tunisia. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 76:529–37.

Machreki-Ajmi M, Ketata I, Ladhar-Chaabouni R, Hamza-Chaffai A. 2007. The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers in *Cerastoderma glaucum*. Ecotoxicology 17:1–11.

Mouneyrac C, Amiard JC, Amiard-Triquet C. 1998. Effect of natural factor (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters (*Crassostrea gigas*) from a polluted estuary. Marine Ecology Progress Series 162:125–35.

Najimi S, Bouhaimi A, Daubèze M, Zekhnini A, Pellerin J, Narbonne JF, et al. 1997. Use of acetylcholinestérase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Marocco). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 58:901–08.

Raspor B, Dragun Z, Erk M, Ivankovic D, Pavicic J. 2004. Is the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* a tissue of choice for estimating cadmium exposure by means of metallothioneins? Science of the Total Environment 333:99–108.

Roesijadi G. 1992. Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Aquatic Toxicology 22:81–114.

Serafim MA, Bebianno MJ. 2001. Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: Sex and seasonal effects. Environmental Toxicology and Chemistry 20:544–52.

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). Doctorat de spécialité, Université de Tunis II, Tunisie.

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. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 143:252–61.

Solé M, Porte C, Biosca X, Mitchelmore CL, Chipman JK, Livingstone DR, et al. 1996. Effects of the 'Aegean Sea' oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in the digestive gland of mussel (*Mytilus edulis*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C 113:257–65.

Stien X, Percic P, Gnassia-Barelli M, Roméo M, Lafaurie M. 1998. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. Environmental Pollution 99:339–45.

Sunderman FW, Marzouk A, Hopfer SM, Zaharia O, Reid MC. 1985. Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. Annals of Clinical and Laboratory Sciences 15:229–36.

Swaileh KM. 1996. Seasonal variations in the concentrations of Cu, Cd, Pb, and Zn in *Arctica islandica* L. (Mollusca: Bivalvia) from Kiel Bay, Western Baltic Sea. Marine Pollution Bulletin 32:631–5.

Thomas P, Wofford HW. 1993. Effects of cadmium and arochlor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. Aquatic Toxicology 27:159–78.

Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbari R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. Marine Environmental Research 44:69–84.

Zairi M, Rouis MJ. 1999. Impacts environnementaux du stockage du phosphogypse à Sfax (Tunisie). Bulletin des laboratoires des Ponts et Chaussées 219:29–40.

Editorial responsibility:

LADHAR-CHAABOUNI R, SMAOUI-DAMAK W and HAMZA-CHAFFAI A (2009) **In vivo variation of some biomarkers with time and cadmium concentration in the cockle Cerastoderma glaucum. Marine biology research, in press.**

Marine Biology Research, 2008; 00: 0–00

ORIGINAL ARTICLE

In vivo variation of some biomarkers with time and cadmium concentration in the cockle *Cerastoderma glaucum*

LADHAR-CHAABOUNI RIM*, SMAOUI-DAMAK WAFA & HAMZA-CHAFFAI AMEL

IPEIS, BP 805-3018 Sfax, Tunisia

Abstract

The aim of this work was to detect in vivo effects of cadmium on marine organisms *Cerastoderma glaucum* and to determine the optimal conditions for the metallothionein-like protein (MTLP) induction in this species under laboratory conditions. The cockles *Cerastoderma glaucum* were exposed in vivo to different cadmium concentrations (50, 75, 100 and 150 $\mu g\ L^{-1}$). Stress on stress test, cadmium, metallothionein-like protein (MTLP), malondialdehyde (MDA) and protein levels were measured after 5, 10, 15 and 20 days of metal exposure. The results showed that the $CdCl_2$ concentrations of 50 $\mu g\ L^{-1}$ for 15 days as well as 150 $\mu g\ L^{-1}$ for 10 days provoked the highest MTLP induction. Nevertheless, the results obtained by the MDA, protein quantification and the stress on stress test showed that animals exposed to 50 $\mu g\ L^{-1}$ for 15 days were in a better health status than those exposed to 150 $\mu g\ L^{-1}$ $CdCl_2$ for 10 days.

Key words: Cerastoderma glaucum, *cadmium, malondialdehyde, metallothionein-like protein, proteins, stress on stress*

Introduction

The cockle *Cerastoderma glaucum* is a sedentary filter feeding marine bivalve (Howson & Picton 1997) living in the superficial sediment and widely distributed in the Gulf of Gabès. Like many other marine organisms, this species is able to assimilate and concentrate the cadmium present in the water (Machreki-Ajmi & Hamza-Chaffai 2006). The exposure of bivalves to cadmium has been shown to induce oxidative stress (Viarengo et al. 1990; Geret et al. 2002) and stimulate the synthesis of the Cd-binding proteins, metallothioneins (MTs) (Bebianno & Serafim 1998; Geret & Cosson 2002). MTs are a class of heat-stable metal binding proteins of non-enzymatic nature, characterized by a unique amino acid composition with very high cysteine content and the absence of aromatic amino acids or disulfide bonds that bind between 5 and 7 g atoms of group IIB heavy metals (such as Ag, Cd, Cu, Hg and Zn) per mole of protein. These low molecular weight proteins are inducible by metals and are believed to participate in functions associated with the metabolism and detoxification of metals (Kagi & Kojima 1987). Metallothioneins also seem to have other roles, including protection against ionizing radiation (Cai et al. 1999) and a more general antioxidant defence (Viarengo et al. 2000; Cavaletto et al. 2002). Indeed, Cd-induced oxidative stress has been associated with production of reactive oxygen species comprising mainly of superoxide radical anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and the hydroxyl radical (OH). Reactions of these reactive oxygen species with cellular biomolecules have been shown to lead to lipid peroxidation (O Ikediobi et al. 2004). The malondialdehyde, which is a secondary product of lipid peroxidation, is usually used as an indicator for membrane lesions caused by oxidative cell injury (Viarengo et al. 1991), and it was proposed to appraise the health status of exposed species (Di Giulio et al. 1993; Thomas & Wofford, 1993; Solé et al. 1996). The health status of the contaminated clams can also be reflected by the stress on stress response representing survival in air: the stress that oxygen depletion exerts was added to the cadmium contamination.

In the present work, the effect of $CdCl_2$ contamination on the MTLP, MDA, Cd bioaccumulation

*Correspondence: Ladhar-Chaabouni Rim, IPEIS, Ecotoxicologie Marine, UR 09-03, BP 805-3018 Sfax, Tunisia. E-mail: rladhar@yahoo.fr or chaabouni.skander@tunet.tn

Published in collaboration with the University of Bergen and the Institute of Marine Research, Norway, and the Marine Biological Laboratory, University of Copenhagen, Denmark

(Received 11 September 2008; Printed XX XXX XXXX)

ISSN 1745-1000 print/ISSN 1745-1019 online © 2008 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/17451000802534881

and protein concentrations was determined under the laboratory conditions. Indeed the most published data on metals in *Cerastoderma* concerned in situ studies (Baudrimont et al. 2003; Machreki-Ajmi & Hamza-Chaffai 2006). However, in polluted environments, animals are generally exposed to a mixture of different metals. In order to understand the effect of cadmium on some biomarkers, in vivo experiments using animals collected from a relatively clean site are needed.

No studies about in vivo biomarker inductions on the cockles *Cerastoderma glaucum* are available. For this reason, the aim of this work was (i) to demonstrate the effect of the contamination with different Cd concentrations for 5, 10, 15 and 20 days on the MTLP, MDA, protein concentrations and Cd accumulation in *Cerastoderma glaucum*; (ii) to determine the effect of the Cd exposure added to the oxygen depletion on the health status of *Cerastoderma glaucum*; and (iii) to estimate the best conditions for the MTLP induction.

Materials and methods

Contamination experiment and fraction preparation

Cerastoderma glaucum were collected from Mahras (site located 40 km to the south of Sfax) (Figure 1). Sixty cockles were directly conserved at –20°C and were used to determine the concentrations of the studied parameters at $t = 0$. Then, 1250 cockles were distributed in 5 tanks, each one containing 250 samples. Animals were held in 7 L of sea water and exposed to a $CdCl_2$ concentration of 50, 75, 100 and



Figure 1. Location of the sampling site in the Gulf of Gabès (Tunisia).

150 μg L^{-1} for 5, 10, 15 and 20 days. During the experiment, the seawater and the metal were renewed twice a week and the bivalves were fed (suspension of algae). Control animals were held in the same conditions.

Tissue preparation

After dissection, the digestive glands (380 samples) were divided in order to determine the metallothionein, protein and malondialdehyde concentrations in the same organ. Then, gills and the half part of digestive glands were homogenized with Tris–HCl buffer (Tris 20 mM, NaCl 150 mM and β mercaptoethanol 10 mM, pH = 8.6). The homogenates were centrifuged (25,000*g*, 1 h, 4°C). The supernatants (soluble fraction S_1) were separated from the pellet (P_1) and used for protein quantification. Then, they were heat denatured (80°C/15 min) and subsequently centrifuged (20,000*g*, 30 min, 4°C) for the MTLP quantification as described by Hamza-Chaffai et al. (2000).

Metal analysis

For metal analysis, the soft tissues (285 samples) from each individual were dried, and then digested with suprapure nitric acid until the solution was clear. Cadmium was then analysed by atomic absorption spectrophotometry (flame) using the Zeeman correction (Hitachi Z 6100). This methodology has been validated through international intercalibration exercises (NILU HTU/O-7729). Internal quality controls were based on the analysis of Cd in standard reference materials (mussel tissues, SRM-2976) from the National Institute of Standard and Technology. Data obtained were 0.75 ± 0.12 μg g^{-1} compared with a certified value of 0.82 ± 0.16 μg g^{-1}.

Metallothionein-like protein analysis

The heat-stable fractions (the supernatant of the second centrifugation) of gills and digestive glands were added to 4.2 ml of 0.43 mM DTNB in 0.2M phosphate buffer. The concentration of reduced sulfhydryls was evaluated by reading the absorbance at 412 nm, by using glutathione (GSH) as a reference standard (Viarengo et al. 1997).

Protein analysis

Determination of the protein content in the gills and digestive gland was carried out colorimetrically by using commercial Blue from BIORAD based on the method of Bradford (1976).

Malondialdehyde analysis

A cold KCl solution (150 mM) was used for the extraction of malondialdehyde (MDA) in the half part of the digestive glands. 1,1,3,3-Tetraethoxypropane was used for the standard and the reaction was developed with the addition of 2-thiobarbituric acid (Sunderman et al. 1985).

Stress on stress test

After contaminant exposure, 475 animals were exposed to anoxia by air exposure at 15°C. Survival was assessed daily. Death symptoms were considered to be open valves and absence of muscular activity. Lethal time corresponding to 50% of dead animals (LT_{50}) in each group was calculated.

Statistical analysis

The significant contribution of time and $CdCl_2$ concentration factors for each criterion, the Cd, MTLP, MDA and protein concentrations were checked using stepwise multiple regression analysis (software: SPSS).

A post-hoc test (Tukey test) was performed in order to determine statistical differences among means using the program SPSS software.

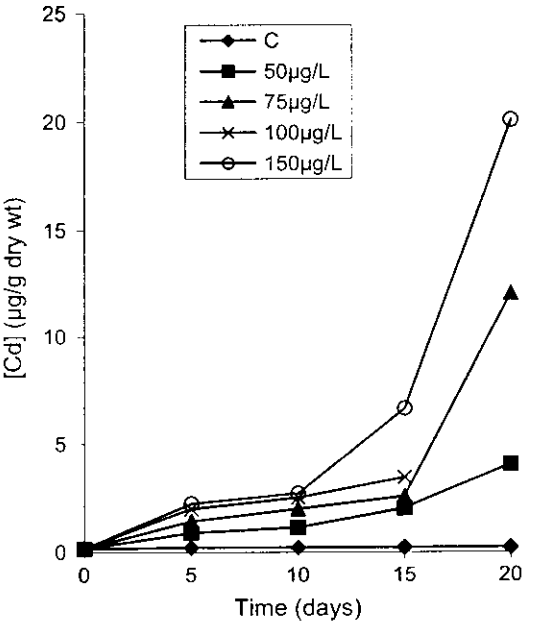


Figure 2. Variation of Cd in toto (μg g^{-1} dry wt) concentrations in *Cerastoderma glaucum* ($n = 285$) exposed to different $CdCl_2$ concentrations (50, 75, 100 and 150 μg L^{-1}) for 5, 10, 15 and 20 days.

Results

In toto cadmium concentration

Cd bioaccumulation in the whole soft tissue of *Cerastoderma glaucum* varies according to $CdCl_2$ concentrations and time of exposure as shown in Figure 2. A significant increase of the Cd bioaccumulation was observed for the following conditions of exposure: after 15 days of exposure to 50 $\mu g\ L^{-1}$ $CdCl_2$, 10 days of exposure to 75 $\mu g\ L^{-1}$ $CdCl_2$ and 5 days of exposure to 100 and 150 $\mu g\ L^{-1}$ $CdCl_2$. Cockles exposed to 100 $\mu g\ L^{-1}$ of $CdCl_2$ showed a total mortality after 18 days of exposure. At $t = 20$ days, a highly significant increase of the Cd bioaccumulation was observed in cockles exposed to 50, 75 and 150 μg $CdCl_2$ compared to $t = 15$ days. This increase was, respectively, 2-, 5- and 3-fold more important.

Protein determination in gills of Cerastoderma glaucum

Idem results were shown in Figure 3. The protein induction in gills of *Cerastoderma glaucum* was time- and $CdCl_2$ concentration-dependent. A significant increase of the protein synthesis was observed after only 5 days in cockles exposed to the different $CdCl_2$ concentrations. For the three $CdCl_2$ concentrations: 50, 75 and 100 $\mu g\ L^{-1}$, the protein evolution undergoes the same attitude with the progressive increase. The highest protein concentrations were registered for 100 $\mu g\ L^{-1}$ followed by 75 $\mu g\ L^{-1}$ and by 50 $\mu g\ L^{-1}$. However, in the case of animals contaminated by 150 $\mu g\ L^{-1}$ $CdCl_2$, protein content increased until the 10th day and then decreased after 15 days of exposure.

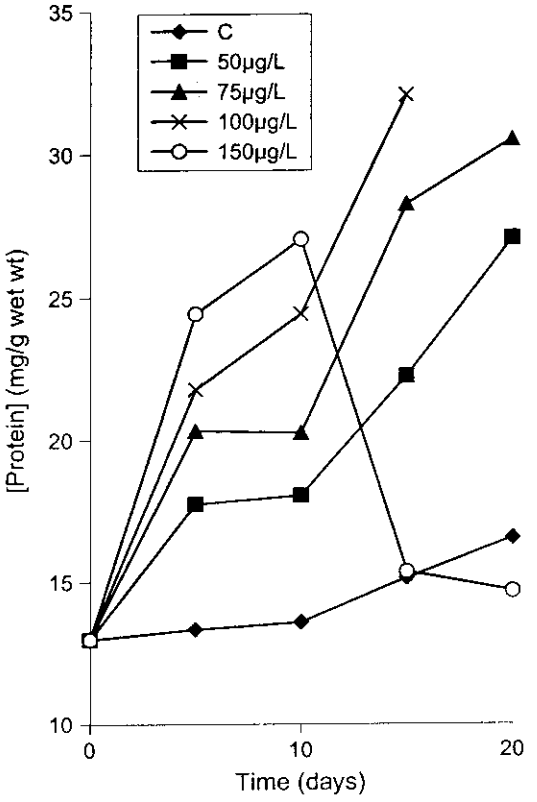


Figure 3. Variation of protein concentrations (mg g^{-1} wet wt) in gills of *Cerastoderma glaucum* ($n = 380$) exposed to different $CdCl_2$ concentrations (50, 75, 100 and 150 $\mu g\ L^{-1}$) for 5, 10, 15 and 20 days.

Protein determinations in digestive gland of Cerastoderma glaucum

Idem results were shown in Figure 4. The protein induction in the digestive gland of *Cerastoderma glaucum* was time- and $CdCl_2$ concentration-dependent. Compared to the gills, the significant increase of the protein synthesis in the digestive gland was observed after 10 days in cockles exposed to 50 $\mu g\ L^{-1}$ $CdCl_2$ instead of 5 days.

Metallothionein-like protein determinations in gills and digestive gland

The variations of MTLP levels in gills and the digestive gland of *Cerastoderma glaucum* were time- and $CdCl_2$ concentration-dependent.

MTLP variation with the time factor. For a contamination with 50 $\mu g\ L^{-1}$ $CdCl_2$, the induction was observed after 15 days of exposure. After 20 days of exposure, the MTLP levels decreased significantly (Tukey test, $p < 0.05$). For an exposure to 75 $\mu g\ L^{-1}$

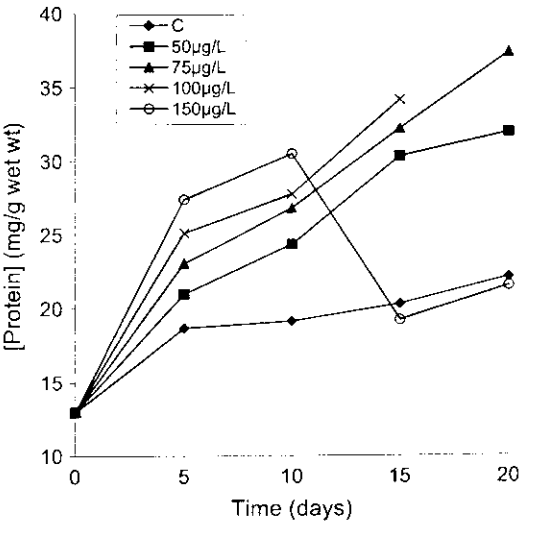


Figure 4. Variation of protein concentrations (mg g^{-1} wet wt) in digestive gland of *Cerastoderma glaucum* ($n = 380$) exposed to different $CdCl_2$ concentrations (50, 75, 100 and 150 $\mu g\ L^{-1}$) for 5, 10, 15 and 20 days.

$CdCl_2$, the induction of MTLP was observed after only 5 days. Levels remained nearly the same until the 20th day. For a contamination with 100 and 150 $\mu g\ L^{-1}$ $CdCl_2$, the MTLP induction occurred on the 5th day and the maximal value of MTLP was observed after 10 days of exposure followed by a significant decrease at t = 15days (Figures 5 and 6).

MTLP variation with $CdCl_2$ concentration.. When the time of exposure was inferior to 15 days, the MTLP induction was observed with 75, 100 and 150 $\mu g\ L^{-1}$ $CdCl_2$. Nevertheless, on the 15th day of exposure, the MTLP induction was determined with 50 and 75 $\mu g\ L^{-1}$ of $CdCl_2$ concentration. A perturbation of the MTLP synthesis was detected at t = 20 days of exposure (Figures 5 and 6).

Malondialdehyde determinations in digestive glands

As shown in Figure 7, the effect of Cd on MDA concentration of *Cerastoderma glaucum* was time- and $CdCl_2$ concentration-dependent. Compared to controls, MDA concentration increased significantly whatever the $CdCl_2$ concentration since the 5th day of exposure. This increase varied proportionally with the time of exposure, which given a shape nearly linear from 0 to 15 days. At t = 10 days, a highly significant increase of the MDA levels was observed (Tukey test, $p < 0.05$). Indeed, the MDA concentration was threefold more important in cockles exposed to 50 $\mu g\ L^{-1}$ $CdCl_2$ compared to controls (Figure 7).

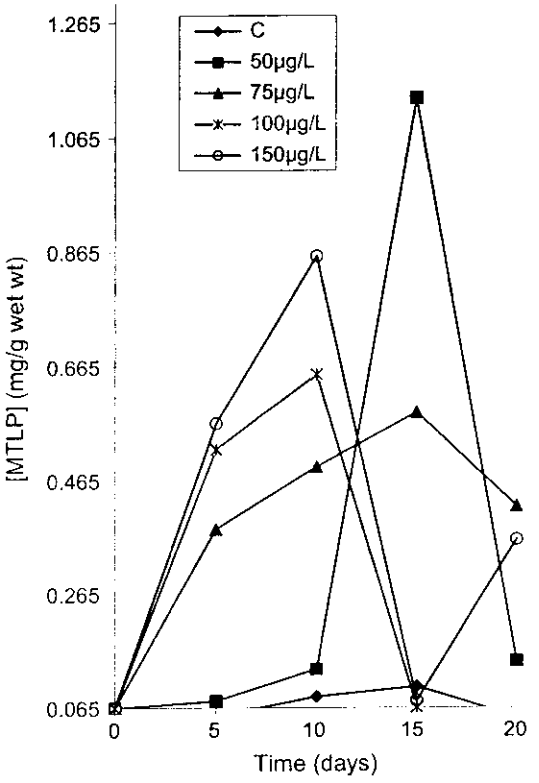


Figure 5. Variation of MTLP concentrations (mg g^{-1} wet wt) in gills of *Cerastoderma glaucum* ($n = 380$) exposed to different $CdCl_2$ concentrations (50, 75, 100 and 150 $\mu g\ L^{-1}$) for 5, 10, 15 and 20 days.

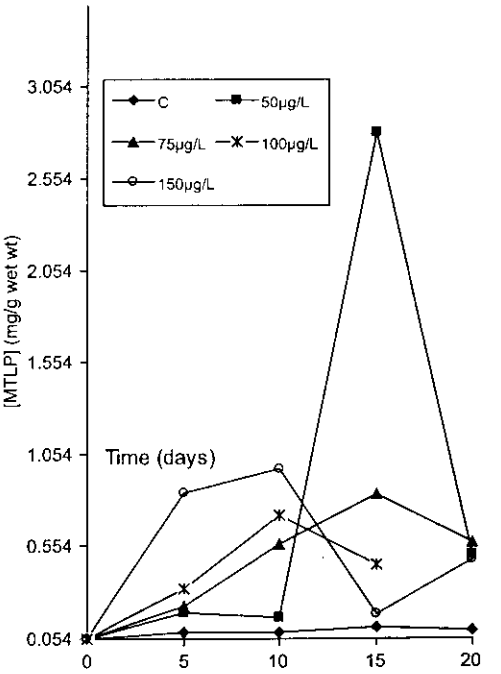


Figure 6. Variation of MTLP concentrations (mg g^{-1} wet wt) in digestive gland of *Cerastoderma glaucum* ($n = 380$) exposed to different $CdCl_2$ concentrations (50, 75, 100 and 150 $\mu g\ L^{-1}$) for 5, 10, 15 and 20 days.

Stress on stress response

The stress on stress experiment was performed on animals previously exposed to cadmium. Lethal time for 50% of individuals (LT_{50}) was determined and the effect of contaminant exposure on anoxic survival time in cockles was shown in Table I. A decrease of the LT_{50} with the increase of cadmium concentration and the time of exposure was observed. Such phenomena reflect a decrease of the tolerance to stress of the exposed cockles.

Discussion

In metal-exposed animals, we observed an increasing concentration of Cd with time and $CdCl_2$ concentrations, which reflects the ability of *Cerastoderma glaucum* to bioaccumulate the cadmium in their tissues. This species appeared to be a suitable organism for long-term ecotoxicity with Cd concentrations ranged from 50 to 150 $\mu g\ L^{-1}$. Nevertheless, after 18 days of contamination with 100 $\mu g\ L^{-1}$ of $CdCl_2$, a 100% mortality of cockles was observed.

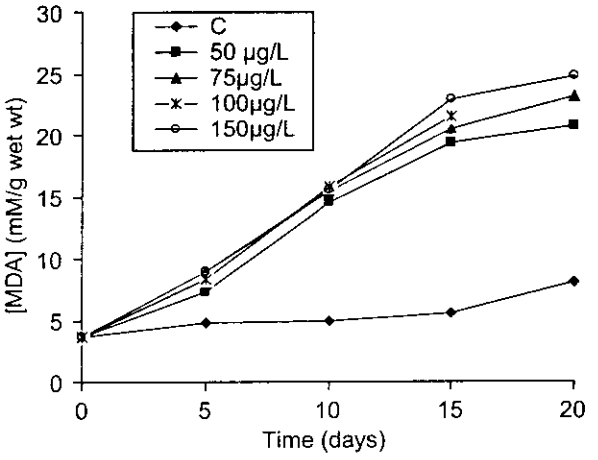


Figure 7. Variation of MDA concentrations (mM g^{-1} wet wt) in digestive gland of *Cerastoderma glaucum* ($n = 380$) exposed to different $CdCl_2$ concentrations (50, 75, 100 and 150 µg L^{-1}) for 5, 10, 15 and 20 days.

However, a contamination of *Ruditapes decussatus* with 400 µg L^{-1} of cadmium for 30 days showed the ability of these clams to accumulate a high amount of Cd in their soft tissues without exhibiting marked visible physiological effects (Bebianno et al. 1993). It seems that *R. decussatus* are more resistant to a cadmium contamination than *C. glaucum*. The bioaccumulation of cadmium leads to the increase of the total protein concentration in the gills and digestive gland of *C. glaucum* followed by a significant decrease after 15 and 20 days of contamination with 150 µg L^{-1} of $CdCl_2$. The same results were observed by Geret & Cosson (2002), who showed an increase of the total protein concentration after 4 days of cadmium exposure (200 µg L^{-1}) in gills, digestive gland and mantle of *Mytilus edulis* followed by a decrease after 21 days of exposure. We assume that cadmium caused strong metabolical perturbations in *C. glaucum*. In the case of our experiment, the dose of 150 µg L^{-1} $CdCl_2$ caused a real disruption of the protein metabolism of *C. glaucum*. Moreover, Cd is known to induce MT synthesis in *R. decussatus* (Bebianno & Serafim 1998), mussels (Bebianno & Langstone 1991) and oysters (Roesijadi & Klerks 1989; Geret et al. 2002). In our study a significant increase of MTLP synthesis in gills and digestive gland of *C. glaucum* was observed after 5 days of contamination with 75, 100 and 150 µg L^{-1} of $CdCl_2$ and after 15 days with 50 µg L^{-1} $CdCl_2$. In several species, MT or MTLP induction has been shown to be rapid in specimen exposed to different metals. For instance, MT induction was observed after 24 h in the whole soft body of *Dreissena polymorpha* exposed to 2 and 20 µg L^{-1} of Cd (Lecoeur et al. 2004) and after 4 days in the gills of oysters *Crassostrea virginica* exposed to 50 µg L^{-1} of Cd (Roesijadi & Klerks 1989). Nevertheless, in the bivalve *R. decussatus*, the induction of MT was observed after 12 days of exposure to 400 µg L^{-1} of Cd (Bebianno et al. 1993). After 21 days of exposure to 200 µg L^{-1} of Cd, no induction of MT was observed in the digestive gland of *M. edulis* (Amiard et al. 2005). The ability to synthesize MT in response to Cd is clearly not uniform among marine molluscs (Langston et al. 1989). The MTLP increase, observed in the present study, was followed by a significant decrease in gills and the digestive gland of cockles exposed to 50, 100 and 150 µg L^{-1} of $CdCl_2$. Cd is an effective inducer of MT, which in turn protects tissues from cadmium damage (Roesijadi 1994). Thus the resistance of *C. glaucum* to the Cd toxicity may be due to a more efficient induction of MTLP. However, the decrease of MTLP in gills and the digestive gland of the cockles indicate that at the beginning of the treatment, Cd might be associated with the soluble proteins such as MT; subsequently Cd was displaced to other tissues or to the particulate fraction in intracellular granules as suggested by Romeo & Gnassia-Barelli (1995). The decrease of MTLP concentration can also be explained by the possibility that the MTLP biosynthesis capacity in *C. glaucum* was overwhelmed by the Cd influx (Giguère et al. 2003). Baudrimont et al. (1999) demonstrated a shut down of MT synthesis in individuals contaminated by Cd and Zn. This shut down was rapidly followed by the death of the contaminated molluscs. Seventeen percent of mortality was observed in oysters exposed for 21 days to 200 ng L^{-1} of Cd (Geret & Cosson 2002). Similarly, at high concentrations of Cd, Roesijadi et al. (1997) observed a concomitant decrease in MT mRNA inducibility and suppression of ROS production. MTs have been identified in the digestive gland (Viarengo et al. 1985) and gills (Roesijadi & Klerks 1989) of bivalves. The highest MT concentrations are generally found in the digestive gland

Table 1. The LT_{50} of *Cerastoderma glaucum* ($n = 475$) after 5, 10, 15 and 20 days of contamination with 50, 75, 100 and 150 µg L^{-1} of $CdCl_2$.

	Days			
$CdCl_2$ concentration (µg L^{-1})	5	10	15	20
Control	6.65	6.44	6.30	5.50
50	6.58	6.40	6.00	5.00
75	6.50	6.23	5.50	4.90
100	6.25	6.00	2.00	100% of mortality after 18 days of contamination
150	5.42	5.30	5.00	3.50

when compared with the gills and other tissues (Bebianno et al. 1993; Géret et al. 1998). The same results were shown with *C. glaucum*. The expression of MTLP is tissue-specific.

Our results provide (i) evidence for the induction of metallothionein like protein in the cockles exposed to cadmium, confirming previous work on *Ruditapes decussatus* (Bebianno et al. 1993), on *Mytilus edulis* (Bebianno & Langston 1991) and *M. galloprovincialis* (Bebianno & Langston 1991). (ii) The highest MTLP concentration was registered for 50 μg $CdCl_2$ L^{-1} after 15 days followed by 150 μg $CdCl_2$ L^{-1} after 10 days: these concentrations could be adequate for the MTLP induction. Beside their role in the metal detoxification, MTs acts as a component of the antioxidant system in protecting cells against the cytotoxic effects of the reactive oxygen species (ROS) (Viarengo et al. 2000). The ROS, which results from the Cd exposure, alter the structure of the cell membranes by stimulating the lipid peroxidation process (Harris 1992; Stohs et al. 2000). A radical attack on lipids leads to the formation of lipid-hydroperoxides (lipid-OOH) (Leibovitz & Siegel 1980; Storey 1996), which can decompose to yield alkanes, alkenes, ketones and aldehydes (Zielinski & Portner 2000). The most important aldehyde produced is malonedialdehyde (MDA). In the present study, the MDA levels were elevated only in the digestive glands, indicating a bioaccumulation of contaminants. Indeed, the gills have been noticed as a short time storage organ, whereas absorption through the digestive gland leads to an accumulation of toxic metals for a longer time (Amiard et al. 1989). In the digestive gland of *C. glaucum*, the concentration of MDA increased along the metal gradient. Increased levels of MDA following Cd exposure have been reported in some other bivalves like *Pyganodon grandis* (Giguère et al. 2003; Couillard et al. 1995), *Bathymodiolus azoricus* (Bebianno et al. 2005), *Unio tumidus* (Cossu et al. 2000). Bonneris et al. (2005) showed a decrease of MDA concentrations, in gills and digestive gland of *Pyganodon grandis*, associated with the increased Cd and MT concentrations. The decrease of MDA may result from an intensification of production by the antioxidant systems including MT. This decrease was not observed in gills and digestive gland of *C. glaucum*. The continuous increase of the MDA levels with time and $CdCl_2$ concentrations revealed the strong metabolic perturbations, caused by cadmium in *C. glaucum*. The metabolic perturbations were also detected by the decrease of the LT_{50} of the exposed cockles. Thus, the stress on stress experiment showed that the studied cokles have suffered from joint stress effects caused by both cadmium contamination and oxygen deficiency. The same result was observed with *R. decussatus* (Hamza-Chaffai et al. 1998), *M. galloprovincialis* (Viarengo et al. 1995) and *M. trossulus* (Veldhuisen-Tsoerken et al. 1991). However, our results showed that cockles exposed to 150 μg L^{-1} for 15 days were more resistant to those exposed to 100 μg L^{-1}. One possible scenario to explain these results is that at the presence of high cadmium concentration, the adductor muscle rhythm was shortened and thus caused valve closure as seen for mussels exposed to elevated levels of Cd, Hg, Zn and Al (Doherty et al. 1987; Kadar et al. 2002; Loayza-Muro & Elias-Letts 2007). In consequence, this physiological adjustment for avoiding temporal exposure to contaminants (Pynnonen & Huebner 1995) would have contributed to reduce the filtration rate of *C. glaucum*. This hypothesis could also explain the decrease of the protein concentrations determined in gills and digestive glands of *C. glaucum* exposed to 150 μg L^{-1} for 15 days.

The present research appears to be the first attempt to quantify changes in Cd bioaccumulation, MTLP, MDA and protein concentrations in *C. glaucum* following the exposure to different Cd concentrations during different periods. The optimal conditions ($CdCl_2$ concentration and the duration of exposure) for the MTLP induction in gills and digestive gland of *C. glaucum* were also determined. In fact the results of MTLP concentrations showed that the maximum induction of this protein was observed after 15 days of contamination with 50 μg L^{-1} $CdCl_2$ and after 10 days of contamination with 150 μg L^{-1} $CdCl_2$. Based on the results obtained by the proteins and MDA concentrations and the stress on stress test, a strong metabolic perturbations were observed after a contamination with 150 μg L^{-1} $CdCl_2$. In the light of these results, it seems that the best conditions for the MTLP induction in *C. glaucum* are 50 μg L^{-1} $CdCl_2$ for 15 days. These data are helpful for future studies such as those using the cockle *C. glaucum* as a bioindicator of metal pollution, using the MTLP and MDA as a biomarker of Cd exposure in this species and cloning the MT gene of *C. glaucum*.

References

Amiard JC, Amiard-Triquet C, Ballan-Dufrançais C, Berthet B, Jeantet AY, Martoja R, et al. 1989. Study of the bioaccumulation at the molecular, cellular and organism levels of lead and copper transferred to the oyster *Crassostrea gigas* thunberg directly from water or via food. Polish Academy of Sciences 34:521–9.

Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS. 2005. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic Toxicology 76:160–202.

Baudrimont M, Andrès S, Metivaud J, Lapaquellerie Y, Ribeyre F, Maillet N, et al. 1999. Field transplantation of the freshwater

bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. Environmental Toxicology and Chemistry 18:2472–7.

Baudrimont M, Schafer J, Marie V, Maury-Brachet R, Bossy C, Durrieu G, et al. 2003. Cadmium contamination of three bivalve species (oyster, cockles and clams) in Nord Médoc salt marshes (Gironde estuary, France): Geochemical survey and metal bioaccumulation kinetics. Journal de physique IV France 107:135–40.

Bebianno MJ, Langston WJ. 1991. Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. Comparative Biochemistry and Physiology 103:79–85.

Bebianno MJ, Nott JA, Langston WJ .1993. Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussates*: The role of metallothioneins. Aquatic Toxicology 27:315–34.

Bebianno MJ, Serafim MA. 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. Science of the Total Environment 214:123–31.

Bebianno MJ, Company R, Serafim A, Camus L, Cosson RP, Fiala-Médoni A. 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. Aquatic Toxicology 75:354–73.

Bonneris E, Perceval O, Masson S, Hare L, Campbell PGC. 2005. Sub-cellular partitioning of Cd, Cu and Zn in tissues of indigenous unionid bivalves living along a metal exposure gradient and links to metal-induced effects. Environmental Pollution 135:195–208.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of quantities of protein using the principale of protein–dye binding. Analytical Biochemistry 72:248–54.

Cai L, Satoh M, Tohyanna C, Cherian M.G. 1999. Metallothionein in radiation exposure: Its induction and protective role. Toxicology 132:85–98.

Cavaletto A, Ghezzi B, Burlando B, Evangelisti V, Ceratto N, Viarengo A. 2002. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 131:447–55.

Cossu C, Doyott A, Badut M, Exinger A, Vasseur P. 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. Ecotoxicology and Environmental Safety 45:106–21.

Couillard Y, Campbell PGC, Tessier A, Pellerin-Massicott J, Auclair JC. 1995. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher level of biological organization. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 52:703–15.

Di Giulio RT, Habig C, Gallagher EP. 1993. Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. Aquatic Toxicology 26:1–22.

Doherty FG, Cherry DS, Cairns J. 1987. Valve closure responses of the Asiatic clam *Corbicula fluminea* exposed to cadmium and zinc. Hydrobiologia 153:159–67.

Geret F, Rainglet F, Cosson RP. 1998. Comparison between isolation protocols commonly used for the purification of mollusc metallothioneins. Marine Environmental Research 46:545–50.

Geret F, Serafim A, Barreira L, Bebianno MJ. 2002. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. Biomarkers 7:242–56.

Geret F, Cosson RP. 2002. Induction of specific isoforms of metallothionein in mussel tissues after exposure to cadmium or mercury. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 42:36–42.

Giguère A, Couillard Y, Campbell PGC, Perceval O, Hare L, Pinel-Alloul B, et al. 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. Aquatic Toxicology 64:185–200.

Hamza-Chaffai A, Romeo M, Gnassia-Barelli M, El Abed A. 1998. Effects 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, 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. Comparative Biochemistry and Physiology 127:185–97.

Harris ED. 1992. Regulation of antioxidant enzymes. FASEB Journal 6:2675–83.

Howson CM, Picton BE editors. 1997. The Species Directory of the Marine Fauna and Flora of the British Isles and Surrounding Seas. Ulster Museum and The Marine Conservation Society, Belfast and Ross-on-Wye. Belfast: Ulster Museum. [Ulster Museum publication, no. 276.]

Kadar E, Costa V, Santos RS, Lopes H. 2005. Behavioural response to the bioavailability of inorganic mercury in the hydrothermal mussel *Bathymodiolus azoricus*. Journal of Experimental Biology 208:505–13.

Kagi JHR, Kojima Y. 1987. Chemistry and biochemistry of metallothioneins. In: Kagi JHR, Kojima Y, editors. Metallothionein II. Basel: Birkhauser-Verlag. p 25–61.

Langston WJ, Bebianno MJ, Zhou M. 1989. A comparison of metal-binding proteins and cadmium metabolism in the marine molluscs *Littorina littorea* (Gastropoda), *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* (Bivalvia). Marine Environmental Research 28:195–200.

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 94:184–91.

Leibovitz BE, Siegel BV. 1980. Aspects of free radical reactions in biological systems: Aging. Journal of Gerontology 35:45–56.

Loayza-Muro R, Elias-Letts R. 2007. Responses of the mussel *Anodontites trapesialis* (Unionidae) to environmental stressors: Effect of pH, temperature and metals on filtration rate. Environmental Pollution 149:209–15.

Machreki-Ajmi M, Hamza-Chaffai A. 2006. Accumulation of cadmium and lead in *Cerastoderma glaucum* originating from the Gulf of Gabès, Tunisia. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 76:529–37.

O Ikediobi CL, Badisa V, Ayuk-Takem LM, Latinwo L, West J. 2004. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL–1439 normal rat liver cells. International Journal of Molecular Medicine 14:87–92.

Roesijadi G, Klerks P. 1989. A kinetic analysis of Cd-binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. Journal of Experimental Zoology 251:1–12.

Roesijadi G. 1994. Metallothionein induction as a mesure of response to metal exposure in aquatic animals. Envronmental Health Perspective 102:91–6.

Roesijadi G, Brubacher L, Unger ME, Anderson RS. 1997. Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen intermediates in molluscan hemocytes exposed to Cd in vitro. Comparative Biochemistry and Physiology 118:171–6.

Romeo M, Gnassia-Barelli M. 1995. Metal distribution in different tissues and in subcellular fractions of mediterranean

clam *Ruditapes decussatus* treated with cadmium, copper or zinc Comparative Biochemistry and Physiology 111:457–63.

Pynnonen KS, Huebner J. 1995. Effects of episodic low pH exposure on the valve movements of the freshwater bivalve *Anodonta cygnea* L. Water Research 29:2579–82.

Solé M, Porte C, Biosca X, Mitchelmore CL, Chipman JK, Livingstone DR, et al. 1996. Effects of the "Aegean Sea" oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in the digestive gland of mussel (*Mytilus edulis*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C 113:257–65.

Stohs JS, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. 2000. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. Journal of Environmental Pathology and Oncology 19:201–13.

Storey KB. 1996. Oxidative stress: Animal adaptations in nature. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 29:1715–33.

Sunderman FW, Marzouk A, Hopfer SM, Zaharia O, Reid MC. 1985. Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. Annals of Clinical and Laboratory Sciences 15:229–36.

Thomas P, Wofford HW. 1993. Effects of cadmium and arochlor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. Aquatic Toxicology 27:159–78.

Veldhuisen-Tsoerken MB, Holwerda DA, Zandee DI. 1991. Anoxic survival time and metabolic parameters as stress indices in sea mussels exposed to cadmium or polychlorinated biphenyls. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 20:259–65.

Viarengo A, Palmero S, Zannicchi G, Capelli R, Vaissiere R, Arunesu M. 1985. Role of metallothionein in Cu and Cd accumulation and elimination in the gill and digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* Lam. Marine Environmental Research 16:23–36.

Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Poli G, Moore MN, Orunesu M. 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. Comparative Biochemistry and Physiology 97:37–42.

Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Livingstone DR. 1991. Seasonal variations in the antioxidant defense systems and lipid peroxydation of the digestive gland of mussels. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 1006:187–90.

Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Mancinelli G, Accomando R, Smaal AC, et al. 1995. Stress on stress response: A simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. Marine Environmental Research 39:245–8.

Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbari R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. Marine Environmental Research 44:69–84.

Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panfoli I. 2000. Antioxidant role of metallothioneins: A comparative overview. Cell and Molecular Biology 46:407–17.

Zielinski S, Portner HO. 2000. Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: A function of metabolic rate or age? Comparative Biochemistry and Physiology Part B 125:147–60.



Publication 3

LADHAR-CHAABOUNI R, GARGOURI- MOKDAD R, DENIS F and 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, DOI 10.1007/s11033-008-9274-8.

Mol Biol Rep
DOI 10.1007/s11033-008-9274-8

Cloning and characterization of cDNA probes for the analysis of metallothionein gene expression in the Mediterranean bivalves: *Ruditapes decussatus* and *Cerastoderma glaucum*

Rim Ladhar-Chaabouni · Raja Mokdad-Gargouri · Françoise Denis · Amel Hamza-Chaffai

Received: 10 January 2008 / Accepted: 13 May 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract cDNA probes have been developed for subsequent use in monitoring the cadmium exposure of the clam *Ruditapes decussatus* and the cockle *Cerastoderma glaucum* using metallothionein (MT) gene expression in different tissues of these species. Two partial MT cDNAs were isolated from *Ruditapes decussatus* and *Cerastoderma glaucum*. The identification of the nucleotide sequences showed that the cDNAs consist of 480 bp coding 72 amino acid proteins containing 21 cysteine residues organized in Cys–X–Cys motifs as classically described for MTs. The induction of MT gene expression in $CdCl_2$ treated bivalves was confirmed by dot blot analysis and suggests a potential specific tissue expression rate.

Keywords cDNA · *Cerastoderma glaucum* · Expression · Metallothionein · *Ruditapes decussatus*

R. Ladhar-Chaabouni (✉) · A. Hamza-Chaffai
IPEIS (Ecotoxicologie Marine, UR 09-03),
BP 805-3018, Sfax, Tunisia
e-mail: rladhar@yahoo.fr; chaabouni.skander@tunet.tn

R. Mokdad-Gargouri
LGME, CBS, Route Sidi Mansour km 6,
BP 1177, 3018 Sfax, Tunisia
e-mail: raja.gargouri@cbs.rnrt.tn

F. Denis
LBGE, Université du Maine, Avenue Olivier Messiaem,
72085, Le Mans, France
e-mail: Francoise.Denis@univ-lemans.fr

A. Hamza-Chaffai
e-mail: amel.chaffai@tunet.tn

Introduction

The gulf of Gabès, situated on the southeastern coast of Tunisia, is exposed since decades to pollution from anthropogenic and industrial activities. Therefore, this area was shown to be contaminated by trace metals, especially cadmium [1, 2]. This toxic metal has been investigated in same bivalve molluscs widely distributed in this area, particularly the clam *Ruditapes decussatus* and the cockle *Cerastoderma glaucum* [3–5]. These species are filter feeders and they are incapable of rapidly escaping from a polluted environment. Therefore, they have been used as bioindicators of Cd pollution in Tunisian coasts [5, 6]. Furthermore, it was shown that Cd exposure induced metallothionein synthesis in *R. decussatus* and *C. glaucum* [3, 5, 7, 8]. Metallothioneins are constitutive, low-molecular weight, cysteine-rich, and heat-stable proteins of non enzymatic nature. Several studies aiming to use MT as a biochemical indicator of cadmium contamination have been performed in *R. decussatus* [3, 9, 10]. However, the lack of information about the MT induction in *C. glaucum*, especially under laboratory conditions, justifies the importance of the contamination experiment realized in the present study.

Due to the fact that MT gene expression is induced as a consequence of cadmium exposure, this property may be useful in environmental studies in terms of, first, using MT gene expression as a bioindicator of exposure to cadmium and, second, as a parameter for measuring the efficiency of the detoxification mechanisms in an organism [11, 12]. To investigate MT gene expression in different tissues of *R. decussatus* and *C. glaucum*, two partial MT cDNAs were amplified from the gills of the treated animals and one of them was used as homologous probe. MT cDNAs have been determined in many marine invertebrate bivalve species including *Crassostrea gigas* [13, 14], *Laternula*

elliptica [15], *Meretrix lusoria* [16] etc. However very little information is available concerning the MT cDNA of *R. decussatus* and *C. glaucum*. Therefore, the availability of these cDNA sequences provides a good opportunity to investigate MT gene expression in the studied species.

The overall purpose of the present study is to analyse the expression of the MT gene in *R. decussatus* and *C. glaucum* exposed to cadmium using MT cDNA probe. In this paper, we report the isolation and characterization of cDNA probes that will facilitate the future analysis of gene expression for MT in the studied species.

Materials and methods

First contamination experiment

C. glaucum were collected from Mahras site (located 40 km to the south of Sfax). Bivalves were held in 7 l of sea water and exposed to a cadmium concentration of 50, 75, 100 and 150 µg/l $CdCl_2$ for 5, 10, 15 and 20 days. During experiment, seawater and metal were renewed twice a week and bivalves were fed. Control animals were held in the same conditions without metal.

Tissue preparation and metallothionein-like protein (MTLP) quantification

After dissection, gills (20 samples from each group) were homogenized with Tris-HCl buffer (Tris 20 mM, NaCl 150 mM and β mercaptoethanol 10 mM, pH = 8.6). The homogenates were ultra-centrifuged (25,000 g, 1 h, 4°C). The supernatants (soluble fraction S_1) were separated from the pellet ($P1$), heat denatured (80°C/15 min) and then centrifuged (20,000 g, 30 min, and 4°C) for the MTLP quantification. MTLP concentrations were measured by spectrophotometric determination of S-H groups using Ellman's reagent, according to the procedure of Viarengo et al. [17]. The heat stable fractions (the supernatant of the second centrifugation) of gills were added to 4.2 ml of 0.43 mM DTNB in 0.2 M phosphate buffer. The concentration of reduced sulfhydryls was evaluated by reading the absorbance at 412 nm by using glutathione (GSH) as a reference standard. The results were expressed as concentration of MTLP (mg/g of fresh tissue).

Second contamination experiment

R. decussatus and C. glaucum were collected from Mahras. Bivalves were held in 7 l of sea water and exposed respectively to a cadmium concentration of 100 µg/l during 20 days and 50 µg/l for 15 days. During experiment, seawater and metal were renewed twice a week and bivalves were fed. Control animals were held in the same conditions without metal.

RNA extraction

At the end of the Cd treatments, gills, foot, adductor muscle and mantle of treated were quickly removed and then frozen at −80°C. Frozen tissues were grounded in liquid nitrogen in a mortar and the resulting powder was suspended in 3 ml of denaturing solution (Total RNA isolation system, Promega). Total RNA was isolated according to the manufacturer's specifications and purified (only for the RNA extracted from gills) using the Quick Prep micro mRNA purification kit (Amersham pharmacia biotech). The concentration of RNA samples was analysed spectrophotometrically.

cDNA synthesis

Complementary DNA was synthesized using approximately 2 µg of mRNA. Oligo dT (15 bp) primer were added and the final volume was adjusted to 20 µl with a nuclease free water. This mixture was denatured at 70°C during 5 min, and put on ice. Samples were reverse-transcribed for 60 min at 37°C with Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RTR-Promega), RNAse inhibitor (RNAsin, Promega) and dNTPs in a reaction volume of 25 µl. The reaction was stopped by incubating for 5 min at 94°C.

Polymerase chain reaction

The reverse transcribed products were used for polymerase chain reaction (PCR) amplification performed with a sense and anti sense primers I and II (ATTCCWTGYAAYT GYRTYGA and oligo dT respectively). Primer I corresponds to a conserved region of the coding sequence based on an alignment of MT sequences from some species of Mytilidae [18]. Polymerase chain reactions were conducted using buffer, Taq polymerase® (Promega), primers, dNTPs and nuclease-free water. All reactions were performed in a final volume of 50 µl. The thermal cycling program used to amplify the MT fragments was performed on a thermocycler (Applied biosystems) and was configured as follows: 50 cycles of 1 min at 94°C (denaturing phase), 1 min at 47°C (annealing phase), and 1 min at 72°C (elongation phase) followed by a single cycle at 72°C for 10 min.

The quantification of metallothionein gene expression has to be standardised by comparing its level with that of other gene considered as stable and non-interfering with the metal detoxification processes. The chosen one was 18S gene. The reverse transcribed products (obtained from foot) were used for PCR amplification performed with a sense

and anti sense primers A and B (AYCTGGTTGATCCTGC CAGT and TASGACGGTATCTGATCGTCTT respectively) [19]. The thermal cycling program was set as follows: 40 cycles of 1 min at 94°C (denaturing phase), 1 min at 60°C and 1 min at 72°C (elongation phase) followed by a single cycle at 72°C for 10 min.

Cloning of MT cDNA and sequencing analysis

Purified PCR products were ligated into the pGEM-T easy vector system (Promega) with T4 DNA ligase. *Escherichia coli* were transformed with 3 µl of the ligation mixture and plated on ampicillin plates containing Xgal and IPTG. pGEM-T plasmids containing the correct size insert were sequenced on a fluorescent automated sequencer from both the 5′ and 3′ ends with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Characterization searching was performed using Blast program, using the nucleotide acid and predicted amino acids sequences to compare the MT sequences to others deposited in multiple databases. Sequences were aligned with a multiple sequence alignment tool ClustalW software.

Dot blot hybridization

Dot blot analysis was used to determine MT mRNA levels in the tissues. Ten micrograms of each RNA sample were mixed with 20 µl 100% formamide, 7 µl 37% formaldehyde and 2 µl 20 × SSC, heated at 55°C for 15 min and immediately cooled on ice. RNA samples were transferred to positively charged nylon blotting membranes (Amersham) using a dot-blot apparatus. Membranes were then UV- cross linked and rinsed in 2 × SSC before being used for hybridization. Prehybridization was done at 42°C for 2 h in 50% formamide, 0.1% SDS, 6 × SSC, 1 × Denhardt and 100 µg ml^{-1} denatured salmon sperm DNA. Hybridizations were carried out with 1 µl of the MT DNA ligated to the pGEM-T vector. The Probe was radiolabeled with [α^{32} P] dCTP using standard procedures (Megaprime DNA labelling, Pharmacia). Unincorporated nucleotides were removed using Sephadex G-50 columns. Hybridization with the labelled probe was done overnight (12–16 h) at 42°C in the buffer mentioned above. All hybridizations were carried out under the same conditions. Membranes were washed with 2 × SSC, 0.1% SDS one fold at room temperature and one fold at 42°C during 15 min. Blots were then exposed to an Instant Imager (BIORAD) for quantification of gene expressions. RNA integrity was checked by hybridizing the filters with a specific [α^{32} P] dCTP labelled 18 S ribosomal DNA probe. Dot blot results are presented as the mean ± SD. Data were analyzed by paired t-test using Excel software. Statistical significance was accepted at a level of $P < 0.05$.

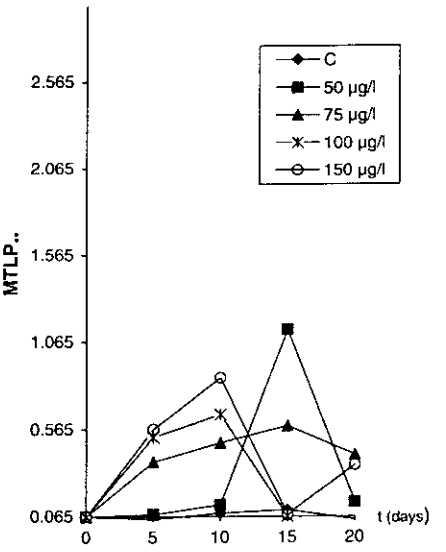


Fig. 1 Variation of MTLP (mg/g Wt wt) concentrations with time and $CdCl_2$ concentrations in gills of *C. glaucum* ($n = 20$)

Results

MTLP levels in gills of *C. glaucum*

MTLP levels in gills of *C. glaucum* are reported in Fig. 1. From 0 to 10 days of exposure to the different $CdCl_2$ concentrations, the general profiles of MTLP concentrations showed approximately the same variations with a tendency to increase.

At $t = 15$ days, a significant decrease of MTLP concentrations was observed in cockles exposed to 100 and 150 µg/l $CdCl_2$. Nevertheless, MTLP appeared to peak on the 15th day of treatment with 50 µg/l of $CdCl_2$, and then it showed a sudden decrease after 20 days of exposure. It seems that the contamination of *C. glaucum* with 50 µg $CdCl_2$/l during 15 days represents the best experimental condition for the MTLP induction.

MT-cDNAs isolation

Two partial MT cDNAs of *C. glaucum* and *R. decussatus* were amplified using primers (I and II). Isolated products corresponded to partial cDNAs of 480 bp fragment for *R. decussatus* (GenBank accession no. *EU000310*) and *C. glaucum* (GenBank accession no. *EU518714*) (Fig. 2). Each fragment was sequenced on both strands and manual verification of the chromatograms corroborated the differences in the sequences. The two MT fragments called Rd MT for *R. decussatus* metallothionein and Cg MT for *C. glaucum* metallothionein, contained coding sequences of 219 bp and 3′ untranslated regions of 261 bp. These sequences encoded two different protein sequences. The

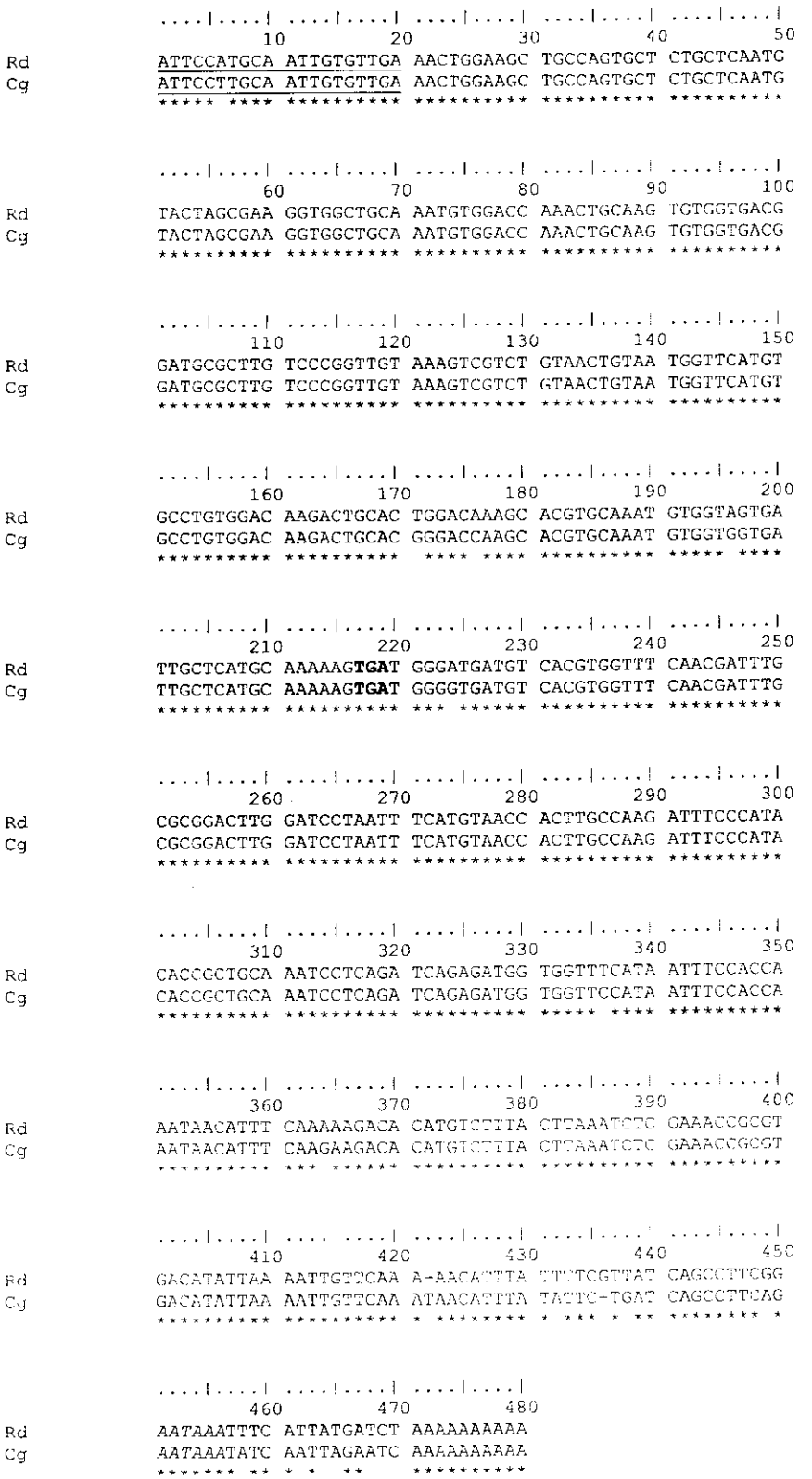


Fig. 2 The nucleotide sequences of *Ruditapes decussatus* (Rd) and *Cerastoderma glaucum* (Cg) MT cDNAs. The sense primer is underlined. The stop codon is in bold. The italic characters indicate the putative polyadenylation signal

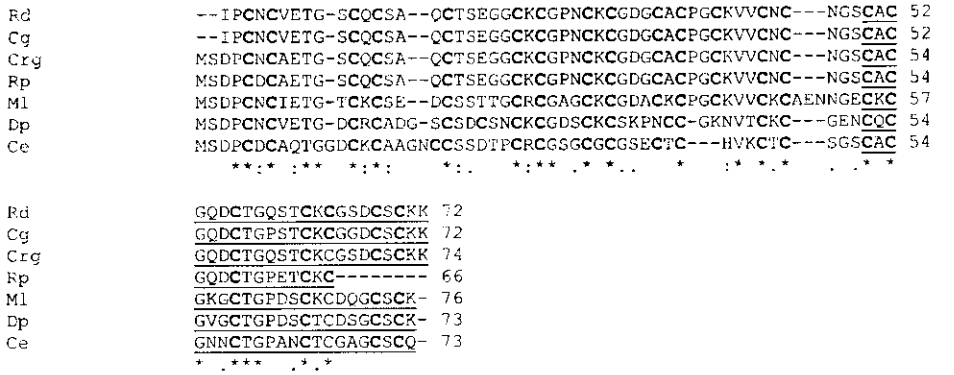


Fig. 3 Comparison of *Ruditapes decussatus* (Rd) and *Cerastoderma glaucum* (Cg) MT amino acid sequences with class I MT sequences from other species. The GenBank accession of the proteins are as follows: *Crassostrea gigas* (crg) (GenBank accession no. *CAC 82788*), *Ruditapes philippinarum* (Rp) (GenBank accession no. *ABP57063*), *Meretrix lusoria* (Ml) (GenBank accession no. *AAS92877*), *Dreissena polymorpha* (Dp) (GenBank accession no. *Q94550*) and *Cerastoderma edule* (Ce) (GenBank accession no. *ABP57066*). Asterisks mark identity and Cys residues are in bold. The specific pattern of molluscs is underlined [20]

peptide MT sequences deduced from the nucleotide sequences contained 72 amino acid residues including 21 cystein residues, organized in 9 Cys–X–Cys, 1 Cys–X–X–Cys and 7 Cys–X_3–Cys. The two protein sequences differed by replacement of Gln for Pro in position 59 and by Ser for Gly in position 66 (Fig. 3).

The comparison between the MT amino acid sequences determined in the present study and known MTs of other bivalves: *Crassostrea gigas* (GenBank accession no. *CAC 82788*), *Ruditapes philippinarum* (GenBank accession no. *ABP57063*), *Meretrix lusoria* (GenBank accession no. *AAS92877*), *Dreissena polymorpha* (GenBank accession no. *Q94550*) and *Cerastoderma edule* (GenBank accession no. *ABP57066*); revealed highly conserved cysteine positions. Moreover, all the sequences present a high glycine content. Nevertheless, an elevated number of lysine residues was detected in MT of *Meretrix lusoria* (9 lysine residues) compared to the other sequences (2–6 lysine residues) (Fig. 3). Table 1 showed that *Crassostrea gigas* MT (GenBank accession no. *CAC82788*) presents the highest percentage of homology with Rd MT (97.2%) and Cg MT (91.9%).

Tissue specific expression

R. decussatus MT cDNA was used as a dot blot probe to assess the level of hybridizing mRNA expression in four tissues: gills (G), mantle (Mn), foot (F) and adductor muscle (Am) of *R. decussatus* and *C. glaucum* treated with cadmium. The induction of MT gene expression was observed in all the studied tissues following this decreasing order: gills > mantle > adductor muscle = foot (Figs. 4 and 5).

Discussion

Gills are exposed to the external medium as a consequence of their respiratory function, and are affected by any change in the environment (temperature, salinity, contaminant exposure). These organs function both as a site of metal uptake and as an important reservoir for metal storage [3]. In the present study, the variation of MTLP concentrations in gills of *C. glaucum* with factors time and $CdCl_2$ concentrations showed a significant increase of

Table 1 *Ruditapes decussatus* and *Cerastoderma glaucum* MT amino acid similarity with *Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum*, *Meretrix lusoria*, *Dreissena polymorpha* and *Cerastoderma edule* MT

	Ruditapes decussatus (GenBank accession no. *EU000310*) (%)	*Cerastoderma glaucum* (GenBank accession no. *EU518714*) (%)
Crassostrea gigas (GenBank accession no. *CAC82788*)	97.2	91.9
Ruditapes philippinarum (GenBank accession no. *ABP57063*)	79.7	81.1
Meretrix lusoria (GenBank accession no. *AAS92877*)	68.8	70.1
Dreissena polymorpha (GenBank accession no. *Q94550*)	54.4	54.4
Cerastoderma edule (GenBank accession no. *ABP57066*)	46.8	48.1

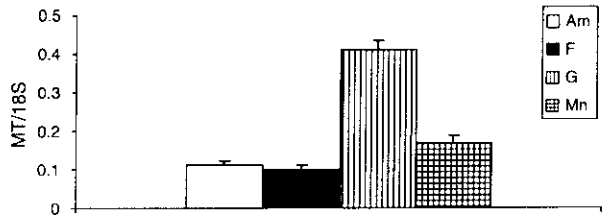


Fig. 4 Normalised levels of MT mRNA (MT/18S) in *R. decussatus* (exposed to 100 µg/l $CdCl_2$ during 20 days) tissues (Am = Adductor muscle, F = Foot, G = Gills and Mn = Mantle). The amounts of MT mRNA and 18 S rRNA were estimated by the phosphoimager. Each bar is the average of measurements carried out in three distinct blots

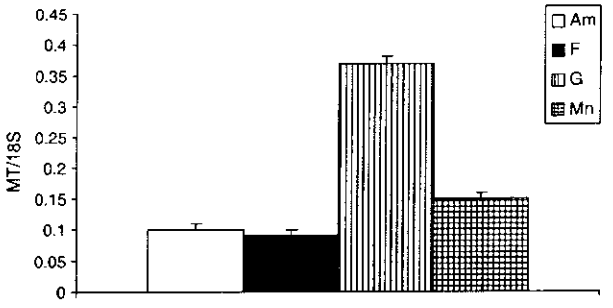


Fig. 5 Normalised levels of MT mRNA (MT/18S) in *C. glaucum* (exposed to 50 µg/l $CdCl_2$ during 15 days) tissues (Am = Adductor muscle, F = Foot, G = Gills and Mn = Mantle). The amounts of MT mRNA and 18 S rRNA were estimated by the phosphoimager. Each bar is the average of measurements carried out in three distinct blots

MTLP synthesis after 5 days of contamination with 75, 100 and 150 µg/l of $CdCl_2$ and after 15 days with 50 µg/l $CdCl_2$. The increase of MTLP levels after Cd exposure provides evidence for the induction of this protein in the cockles exposed to this non-essential metal, confirming its capacity to modify the MT gene expression previously observed in *R. decussatus* [9], on *Mytilus edulis* [21] and on *M. galloprovincialis* [22]. In several species, MT or MTLP induction has been shown to be rapid in specimen exposed to different metals [23, 24]. On the other hand, in the bivalve *Ruditapes decussatus*, MT induction was observed after 12 days of exposure to 400 µg Cd l^{-1} [9]. After 21 days of exposure to 200 µg Cd $l,^{-1}$ no induction of MT was observed in the digestive gland of *Mytilus edulis* [Geffard et al. 2000 in 25]. The ability to synthesize MT in response to Cd exposure clearly varies among marine molluscs [26]. In the case of *C. glaucum* the highest MTLP synthesis appeared at 15 days of treatment with 50 µg/l $CdCl_2$ followed by a significant decrease at 20 days of exposure. One possible scenario to explain these results is that the gill transferred metals to other tissues while executing its barrier functions, all in order to maintain its normal multiple functions [16]. Moreover, the MTLP biosynthesis capacity in *C. glaucum* could be overwhelmed by the Cd influx [27].

In this work, the cloning of two partial MT cDNAs of the cockle *C. glaucum* and the clam *R. decussatus* was realized. The deduced amino acid sequences showed all the features characteristic for MTs; especially the 21 cysteines arranged in the MT typical motifs. Moreover, the absence of aromatic amino acid residues and the presence of the specific mollusc sequence pattern Cys–X–Cys–X–X–X–Cys–Thr–Gly–X–X–X–Cys–X–Cys–X(n)–Cys–X–Cys–Lys described by Binz and Kagi [20] in class I and family 2 mollusc MTs, were noted (Fig. 4). As observed in other molluscs MTs [28, 29], the Rd MT and the Cg MT presented a high glycine content (15.27% and 16.66% respectively) randomly distributed throughout the sequences. The lysine residues number in Rd MT and Cg MT (8.33%) was lower than that in *M. lusoria* (11.84%) [16] and *L. elliptica* MTs (11%) [15] and higher than that in mussels MTs (6.8%) [15]. Pan et al. [30] suggested that the lysine residues of MTs are not critical for maintaining protein structure, but that they play a role in regulating the microenvironment and stability of both metal-binding clusters.

The amino acid sequences of *R. decussatus* and *C. glaucum* MTs showed a lack of Cys–Cys pairs as observed in *C. gigas* [13]. Based on the cysteine number, we can hypothesize that an α-domain and a β-domain [31] are present in Rd MT and Cg MT. Nevertheless, the lack of Cys–Cys pairs could have implications on the efficiency of the detoxification process of the different bivalent metals in organisms [13]. The differences in the 3′ untranslated region observed in the nucleotide sequences of Rd MT and Cg MT could account for differential regulation of these proteins transcripts. 3′ UTR influence translation efficiency, mRNA localization, mRNA stability and degradation rate [32]. In the studied species 3′ untranslated regions of 261 bp were determined. These sequences are longer than those found in some MTs of other bivalves like *Crassostrea virginica* (139 bp) [33], *Crassostrea gigas* (118-139 bp) [13] and *Mytilus edulis* (104–123 bp) [34]. Nevertheless, a 572 bp 3′ UTR was observed in *Dreissena polymorpha* [35].

The dot blot analysis using total RNA from Cd-treated animals showed a tissue-specific inducible expression of *R. decussatus* and *C. glaucum* MT gene. In fact, the MT gene expression was observed following this decreasing order: gills > mantle > adductor muscle = foot. Gills and mantle are the tissues directly in contact with sea-water containing cadmium. However, the mantle is responsible for the synthesis of the shell of the bivalve molluscs and has a lesser importance than gills in the uptake and storage of metals. The same results were observed with *M. edulis*

[36]). In *Crassostrea gigas*, Tanguy et al. [13] showed mRNA-probed expression only in gills from Cd^{2+} exposed oysters. This expression was not observed in the mantle and the digestive gland of the treated animals and in the tissue samples taken from untreated oysters. These results indicate induction responsiveness of the probed mRNA to heavy metals and its specific tissue expression [13].

Conclusions

The best conditions for the MTLP synthesis in gills of *C. glaucum* were determined and showed that the highest MTLP concentrations were observed after a contamination by 50 µg/l $CdCl_2$ for 15 days. Then, we have established two partial cDNAs sequences of metallothionein from the gills of *R. decussatus* and *C. glaucum* and one of them was used as a tool for studying the expression of MT gene. The dot blot analysis confirmed the induction of MT gene expression in gills of new species of bivalves. Moreover, this technique appeared as a useful tool to follow the chronic contamination of metal pollution. Future studies are required to strengthen this hypothesis.

References

1. Hamza-Chaffai A, Amiard JC, Cosson RP (1999) Relationship between metallothioneins and metals in a natural population of clam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast: a non- linear model using box-cox transformation. Comp Biochem Physiol C 123:153–163
2. 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 Gabès, Tunisia. Bull Environ Contam Toxicol 71: 961–970
3. Smaoui-Damak W, Hamza Chaffai A, Bebianno MJ, Amiard JC (2004) Variation of metallothioneins in gills of the clam *(Ruditapes decassatus)* from the Gulf of Gabès, (Tunisia). Comp Biochem Physiol 139:181–188
4. 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
5. Machreki-Ajmi M, Ketata I, Ladhar-Chaabouni R, Hamza-Chaffai A (2007) The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers in *Cerastoderma glaucum*. Ecotoxicology 17: 1–11
6. Hamza-Chaffai A, Pellerin J, Amiard JC (2003) Health assessment of marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) from the gulf of Gabès (Tunisia). Environ Int 28:609–617
7. Bebianno MJ, Serafim MA (1998) Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. Sci Total Environ 214:123–131
8. Machreki-Ajimi M, Hamza-Chaffai A (2006) Accumulation of cadmium and lead in *Cerastoderma glaucum* originating from the Gulf of Gabès,Tunisia. Bull Environ Contam Toxicol 76:529–537
9. Bebianno MJ, Nott JA, Langston WJ (1993) Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussatus*: the role of metallothioneins. Aquat Toxicol 27:315–334
10. Ladhar-Chaabouni R, Gargouri R, Hamza-Chaffai A (2007) Effect of cadmium on some biomarkers in the clam *Ruditapes decussatus*: metallothionein quantification by using two techniques. Int J Environ Pollut 30:593–601
11. Peakall DB (1992) Animal biomarkers as pollution indicators. Chapman and Hall, London
12. Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB (2000) Principles of ecotoxicology, 2nd edn. Taylor and Francis, London
13. 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* (Cg MT1). Aquat Toxicol 55:35–47
14. Tanguy A, Moraga D (2001) Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptative response to metal-induced stress? Gene 273:123–130
15. Park H, Ahn IY, Choi HJ, Pyo SH, Lee HE (2007) Cloning, expression and characterization of metallothionein from the Antarctic clam *Laternula elliptica*. Protein Expr Purif 52:82–88
16. Chang YT, Jong KJ, Liao BK, Wu SM (2007) Cloning and expression of metallothionein cDNA in the hard clam (*Meretrix lusoria*) upon cadmium exposure. Aquaculture 262:504–513
17. Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbari R (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. Mar Environ Res 44:69–84
18. Hardivillier Y (2000) Caractérisation et induction de la transcription des genes de métallothionéines chez la moule *Mytilus edulis*. Utilisation des ARNm des MTs comme marqueurs de contamination métallique, approche expérimentale. Thèse de doctorat de l'université du Maine, France. 113 pp
19. Nygren A, Sundberg P (2003) Phylogeny and evolution of reproductive modes in Autolytinae (Syllidae, Annelida). Mol Phylogenet Evol 29:235–249
20. Binz PA, Kagi JHR (1999) Metallothionein: molecular evolution, classification. In: Klaassen C (ed) Metallothionein, vol IV. Birkhauser, Basel, pp 7–13
21. Bebianno MJ, Langston WJ (1991) Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. Mar Biol 108:91–96
22. Bebianno MJ, Langston WJ (1992) Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. Comp Biochem Physiol C 103:79–85
23. Lecoeur S, Videmann B, Berny P (2004) Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. Environ Res 94:184–191
24. Roesijadi G, Klerks P (1989) A kinetic analysis of Cd-binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. J Exp Zool 251:1–12
25. Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2005) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquat Toxicol 76:160–202
26. Langston WJ, Bebianno MJ, Zhou M (1989) A comparison of metal-binding proteins and cadmium metabolism in the marine molluscs *Littorina littorea* (Gastropoda), *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* (Bivalvia). Mar Environ Res 28:195–200
27. 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 ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. Aquat Toxicol 64:185–200
28. Dallinger R, Berger B, Hunziker PE, Birchler N, Hauer CR, Kagi JH (1993) Purification and primary structure of snail

metallothionein. Similarity of the N-terminal sequence with histones H4 and H2A. Eur J Biochem 216:739–746
29. Simes DC, Bebianno MJ, Moura JJ (2003) Isolation and characterisation of metallothionein from the clam *Ruditapes decussatus*. Aquat Toxicol 63:307–318
30. Pan PK, Hou FY, Cody CE, Huang PC (1994) Substitution of glutamic acids for the conserved lysines in the alpha domain aVects metal binding in both the alpha and beta domains of mammalian metallothionein. Biochem Biophys Res Commun 202:621–628
31. Kagi JHR, Kojima Y (1987) Chemistry and biochemistry of metallothionein. Experientia Supplementum 52:25–61
32. Jackson RJ (1993) Cytoplasmic regulation of mRNA function: the importance of the 3′ untranslated region. Cell 74:9–14
33. Fuentes ME, Unger M.E, Roesijadi G (1994) Individual variability in the 3′ untranslated region of metallothionein mRNAs in a natural population of the mollusc *Crassostrea virginica*. Mol Mar Biol Biotechnol 3:141–148
34. Barsyte D, White KN, Lovejoy DA (1999) Cloning and characterization of metallothionein cDNAs in the mussel *Mytilus edulis* L. digestive gland. Comp Biochem Physiol C 122:287–296
35. Engelken J, Hildebrandt A (1999) cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Biochem Cell Biol 77:237–241
36. Lemoine S, Bigot Y, Sellos D, Cosson RP, Laulier M (2000) Metallothionein Isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia): complementary DNA characterization and quantification of expression in different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper. J Mar Biotechnol 2:195–203



Publication 4

LADHAR-CHAABOUNI R, GARGOURI R and HAMZA-CHAFFAI A (2007) Effect of cadmium on some biomarkers in the clam Ruditapes decussatus: metallothionein quantification using two techniques. International journal of environment and pollution, 30: 593-605.

Effect of cadmium on some biomarkers in the clam *Ruditapes decussatus*: metallothionein quantification using two techniques

Rim Ladhar-Chaabouni*

Marine Ecotoxicology UR 09-03,
IPEIs BP 805, 3018 Sfax, Tunisia
E-mail: rladhar@yahoo.fr
*Corresponding author

Raja Gargouri

Laboratoire Génétique Moléculaire des Eucaryotes,
Centre de Biotechnologie de Sfax,
BPK 3038 Sfax, Tunisia
E-mail: raja.gargouri@cbs.rnrt.tn

Amel Hamza Chaffai

Marine Ecotoxicology UR 09-03,
IPEIs BP 805, 3018 Sfax, Tunisia
E-mail: Amel.Chaffai@tunet.tn

Abstract: After the contamination of *Ruditapes decussatus* with 100 µg/l and 200 µg/l of cadmium chloride during 21 days, metallothioneins (MTs), malondialdehyde (MDA) and cadmium concentrations were determined in the gills and the digestive gland. The results showed an increase of Cd, MTs and MDA concentrations in the gills and the digestive gland. No significant variations of the concentrations with sex were observed. Two techniques (polarography and colorimetry) for metallothionein quantification were compared. The results showed that the polarographic method is more sensitive than the colorimetric one.

Keywords: biomarkers; cadmium; malondialdehyde; metallothioneins; *Ruditapes decussates*.

Reference to this paper should be made as follows: Ladhar-Chaabouni, R., Gargouri, R. and Hamza-Chaffai, A. (2007) 'Effect of cadmium on some biomarkers in the clam *Ruditapes decussatus*: metallothionein quantification using two techniques', *Int. J. Environment and Pollution*, Vol. 30, Nos. 3/4, pp.593–605.

Biographical notes: Rim Ladhar-Chaabouni obtained a Master's Degree in Ecotoxicology in 2002. She is now preparing a PhD at Sfax University.

Raja Gargouri obtained a thesis in Biology in 1986 and a PhD in Molecular Biology in 1994. She is actually Professor at the 'centre de Biotechnologie de Sfax' Tunisia.

Copyright © 2007 Inderscience Enterprises Ltd.

Amel Hamza-Chaffai obtained an Engineering Diploma in Food Science in 1988, a Master's Degree in Analytical Chemistry in 1990, a PhD in Biology in 1993 and a HDR in Ecotoxicology in 1999. She is now a Full Professor and the head of the research lab of marine Ecotoxicology at sfax University.

1 Introduction

Mollusc bivalves are known to accumulate high concentrations of heavy metals in their tissues, and so they have been proposed as biomonitors reflecting the pollution state of one site. *Ruditapes decussatus* is the biomonitor organism used in Tunisian monitoring programmes (Hamza-Chaffai et al., 2000). This bivalve is able to accumulate cadmium to a high degree without any apparent detrimental effect (Gnassia-Barelli et al., 1995). At the cellular level, heavy metals such as cadmium stimulate the synthesis of some biomarkers such as metallothionein and malondialdehyde (Viarengo et al., 1990; Hamza-Chaffai et al., 2000).

Cadmium is known to enhance the intracellular formation of Reactive Oxygen Species (ROS) and to promote cellular oxidative stress (Stohs et al., 2000). ROS alter the structure of the cell membranes by stimulating the lipid peroxidation process through oxidation of polyunsaturated fatty acids (Harris, 1992; Stohs et al., 2000). A radical attack on lipids leads to the formation of lipid-hydroperoxides (lipid-OOH) (Leibovitz and Siegel, 1980; Storey, 1996), which can decompose to yield alkanes, alkenes, ketones and aldehydes (Zielinski and Portner, 2000). The most important aldehyde produced is malondialdehyde (MDA), which forms Schiff bases with amines of proteins, phospholipids and nucleic acids (Zielinski and Portner, 2000). MDA is usually used as an indicator for membrane lesions caused by oxidative cell injury (Viarengo et al., 1991) and it was proposed to appraise the health status of exposed species (Di Giulio et al., 1993; Thomas and Wofford, 1993; Solé et al., 1996).

Metallothineins (MTs), which are low molecular weight and cystein-rich proteins, are induced following cadmium exposure in several molluscs such as oysters (Roesijadi and Klerks, 1989), mussels (Bebianno and Langston, 1991) and clams (Bebianno and Serafim, 1998; Hamza-Chaffai et al., 2000; Smaoui-Damak et al., 2004). These proteins have been identified in various tissues of vertebrates and invertebrates (Amiard and Cosson, 1997; Cosson and Amiard, 1998) and play a leading role in metal uptake, transport, storage and excretion (Roesijadi, 1992). MTs also seem to have other roles, including protection against ionizing radiation (Cai et al., 1999) and a more general antioxidant defence (Viarengo et al., 2000b; Cavaletto et al., 2002). MTs could protect cells from oxidative stress by acting as oxyradical scavengers and through metal binding/release dynamic mechanisms (Langston et al., 1998). The determination of MTs together with MDA could provide a clarification of this phenomenon.

In order to use MTs in biomonitoring, we need a simple, cheap and repeatable method of quantification. For this purpose, the polarographic and the colorimetric methods were the most successful. These two techniques present differences both in sample extraction and metallothionein analysis. Viarengo et al. (1999) used the colorimetric method after solvent precipitation. Thompson and Cosson (1984) used the polarographic method after heat denaturation. When comparing the two technical approaches, Géret et al. (1998) showed that MTs' amounts were significantly lower using solvents in comparison with

heat denaturation in gills of *M. edulis*. In order to minimise the loss of proteins during extraction, the heat denaturation seems to be more suitable than the solvent precipitation. For quantification we can either use polarography or colorimetry. Moreover, if used for monitoring purposes, MTs' variation is more important than absolute values; that is why it is more suitable to use the simplest method, which is the colorimetric one after the heat denaturation.

The objectives of this work were to study in vivo

- the effect of Cd contamination on the accumulation of this metal, MTs and MDA
- MTs quantification based on the colorimetric method combined to the heat denaturation of the cytosolic fraction
- the comparison between the MTs' results determined by the colorimetric and the polarographic methods.

2 Materials and methods

2.1 Choice of the site

Ruditapes decussatus were collected from Borj Younga, which is situated at 44 km south of Sfax (Tunisia). It is far from any industrial activity. Compared with other sites of the Gulf of Gabés, Borj Younga was the least contaminated one (Smaoui-Damak et al., 2003).

This choice was made in order to have clams presenting a good health status and able to support the in vivo cadmium contamination.

2.2 Contamination experiment

Ruditapes decussatus of standardised shell size (35–41 mm) were collected in December, then acclimated in aerated seawater for five days. In each tank, 52 clams were held in 7 L and exposed to a cadmium concentration of 100 µg/l and 200 µg/l for up to 21 days. During exposure, the seawater and the metal were renewed twice a week and the bivalves were fed (organ planer see). Control animals were held in the same conditions.

After sex determination, gills, digestive glands and remaining tissues were dissected, except for 15 samples of control and contaminated animals, which were used for cadmium analysis in the whole soft tissues.

The choice of the time of exposure and the Cd concentrations was guided by the literature. It was demonstrated that the contamination for a long period (Bebianno and Serafim, 1998) or with a high Cd concentration (Bebianno et al., 1993) contributes to the perturbation of the MT synthesis.

2.3 Fraction preparation

The gills and the digestive glands were homogenised with Tris-HCl buffer (Tris 20 mM, NaCl 150 mM and β mercaptoethanol 10 mM, pH = 8.6). The homogenates were ultra-centrifuged (25,000 *g*, 1 h, 4°C). The supernatants (soluble fraction S_1) were separated from the pellet ($P1$), heat denatured (80°C/15 min) and subsequently centrifuged (20,000 *g*, 30 min, 4°C).

2.4 Metal analysis

Cadmium determination was carried out on whole soft tissues, after mineralisation at 100°C with suprapur nitric acid. The pellets (*P*1) of dissected and homogenised organs (gills and digestive glands), were mineralisated at 80°C with suprapur nitric acid. Cadmium was analysed by flameless atomic absorption spectrophotometry using the Zeeman correction (Hitachi Z 6100). This methodology has been validated through international inter-calibration exercises (NILU HTU/O-7729). Internal quality controls were based on the analysis of Cd in standard reference materials (mussel tissues, SRM-2976) from the National Institute of Standard and Technology. Data obtained were 0.75 ± 0.12 µg/g compared with a certified value of 0.82 ± 0.16 µg/g.

2.5 Malondialdehyde analysis

A cold KCl solution (150 mM) was used for the extraction of malondialdehyde (MDA) from the digestive glands of *R. decussatus*. 1,1,3,3-Tetraethoxypropane was used as standard and the reaction was developed with the addition of 2-thiobarbituric acid (Sunderman et al., 1985).

2.6 MT analysis

- *Colorimetric method.* The heat stable fractions (the supernatant of the second centrifugation) of gills and digestive glands were added to 4.2 ml of 0.43 mM DTNB in 0.2 M phosphate buffer. The concentration of reduced sulfhydryls was evaluated by reading the absorbance at 412 nm, by using glutathione (GSH) as a reference standard (Viarengo et al., 1997).
- *Polarographic method.* The heat stable fractions (*S*2) of gills were used for MTs' quantification.

A differential pulse polarographic assay for MTs was accomplished using a Parc Model µAutolab II analyser and Methrom 646 static mercury drop electrode (SMDE; Bebianno and Langston, 1989). Protein standards were of rabbit liver metallothionein. MT concentrations in the clam gills were calculated using the standard addition method.

2.7 Comparison between two techniques of metallothionein quantification: the colorimetric method and the polarographic one

To compare the two techniques of metallothionein quantification, metallothionein analysis using colorimetric and polarographic methods after heat denaturation of cytosolic fraction was realised on gills of *R. decussatus* ($n = 20$) collected from Borj Younga in June–August.

In our study, the colorimetric method results were compared with those obtained using polarographic method with heat denaturation during the fraction preparation.

2.8 Statistical treatments

In order to study the variations of Cd, MTs and MDA concentrations with the sex and the $CdCl_2$ concentrations, a two-way ANOVA was used.

3 Results

3.1 Variations of MTs, MDA and Cd levels with the cadmium concentration

After 21 days of metal exposure, the cadmium concentrations (µg/g dry weight) in whole soft part, in gills and digestive glands of *Ruditapes decussatus*, were significantly taken up compared with control animals. Cadmium was accumulated at decreasing levels: gills > digestive glands after a contamination with 100 µg Cd/l and digestive glands > gills after a contamination with 200 µg Cd/l (Table 1).

Table 1 Metallothionein, malonedialdehyde and cadmium concentrations data in parenthesis are standard deviation (SD)

		Cadmium concentration (µg/l)		
		0	*100*	*200*
MTs (µg/g wet mass) ($n = 20$)	Gills	353.65 (39.10)	390.90 (66.70)	453.22 (70.59)
	Digestive gland	444.63 (57.55)	542.32 (78.78)	547.54 (78.78)
MDA (mM/g) ($n = 15$) = (mM/g)	Digestive gland	6.50 (2.31)	19.21 (5.75)	42.40 (9.01)
Cadmium (µg/g d.w.) ($n = 20$)	In toto ($n = 15$)	0.42 (0.33)	8.52 (1.66)	20.81 (4.46)
	Gills	0.30 (0.10)	31.66 (4.50)	33.28 (12.21)
	Digestive gland	0.60 (0.30)	29.58 (12.00)	37.88 (11.29)

A significant increase in MDA (mM/g) concentrations was observed in digestive glands of clams exposed to 100 µg/l of $CdCl_2$ (3 times of controls) and to 200 µg/l of $CdCl_2$ (6.5 times of controls). (Table 1)

In gills, the contamination with 100 µg/l and 200 µg/l of $CdCl_2$ showed, respectively, an increase of 10.5% and 28% of MT concentrations (µg/g wet mass). In digestive glands, the increase is about 22% (contamination with 100 µg $CdCl_2$/l) and 23.14% (contamination with 200 µg $CdCl_2$/l) of MT concentrations.

Our results showed that: metallothionein was accumulated at decreasing levels: digestive glands > gills. (Table 1)

3.2 Variation of MTs, MDA and Cd concentrations with the sex and the $CdCl_2$ concentration

The two-way ANOVA showed no significant variation of MTs, MDA and Cd concentrations with the sex (calculated $F <$ theoretical F for a 5% of risk) but the variation with the $CdCl_2$ concentration was highly significant (calculated $F >$ theoretical F for a 5% of risk) (Tables 2–4).

The result of interaction dose/sex showed that the male and female have the same reaction against a metal contamination (Tables 2–4).

Table 2 The results of two-ways ANOVA (factors are : sex and $CdCl_2$ concentrations) for Cd in the gills, digestive glands and *in toto*

	Cd (µg/g d.w.)								
	Gills			*Digestive glands*			*In toto*		
	Freedom degree	*Calculated F*	*Theoretical F*	*Freedom degree*	*Calculated F*	*Theoretical F*	*Freedom degree*	*Calculated F*	*Theoretical F*
Sex effect	1	1.79	4.04	1	0.14	4.25	1	0.31	4.25
Dose effect	2	70.09	3.19	2	73.73	3.40	2	111.25	3.40
Interaction dose/sex	2	0.89	3.19	2	1.07	3.40	2	0.047	3.40

Table 3 The results of two-ways ANOVA (factors are: sex and $CdCl_2$ concentrations) for MDA in the digestive glands

	MDA en mM/g in digestive glands		
	Freedom degree	*Calculated F*	*Theoretical F*
Sex effect	1	3.40	4.01
Dose effect	2	169.96	3.16
Interaction dose/sex	2	0.46	3.16

Table 4 The results of two-ways ANOVA (factors are: sex and $CdCl_2$ concentrations) for MTs in the gills and digestive glands

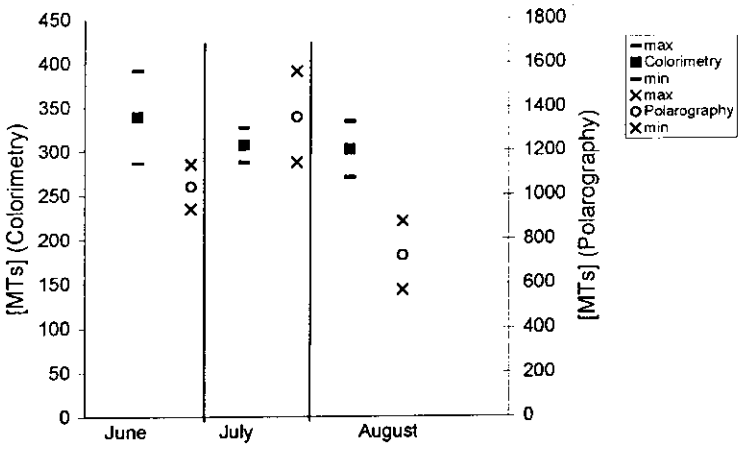
	MTs (µg/g)					
	Gills			*Digestive glands*		
	Freedom degree	*Calculated F*	*Theoretical F*	*Freedom degree*	*Calculated F*	*Theoretical F*
Sex effect	1	1.99	4.11	1	0.14	4.17
Dose effect	2	9.48	3.25	2	6.95	3.31
Interaction dose/sex	2	0.07	0.93	2	1.31	3.31

3.3 Comparison between two techniques of metallothionein quantification: the colorimetric method and the polarographic one

Figure 1 shows that MT concentrations (µg/g wet mass) obtained by the polarographic method are higher than those obtained by the colorimetric one. The MT concentrations determined by the polarographic method are three-fold higher than those obtained by the colorimetric method in June. In July, they are 4.4-fold higher but in August they are 2.4-fold greater.

Also, the variation of MT concentrations with months was detected by the polarographic method and masked by the colorimetric one.

Figure 1 Means of MTs (µg/g wet mass) affected with confidence intervals (95% level) in gills of *Ruditapes decussatus* determined by colorimetric and polarographic methods, ($n = 20$)



4 Discussion

The ability of *Ruditapes decussatus* to accumulate cadmium without any apparent detrimental effect was confirmed. Our results are in agreement with those obtained by Bebianno et al. (1993), who reported a linear uptake of cadmium by whole soft parts of *Ruditapes decussatus* at 400 µg/l during 30 days. Nevertheless, a contamination with a high concentration of cadmium (500 µg/l) during 96 hours caused the mortality of treated animals (Roméo and Gnassia-Barelli, 1995).

As a consequence of cadmium exposure, the concentration of this metal increases in the gills and digestive glands of *Ruditapes decussatus*. The highest concentrations occur in the gills followed by the digestive glands after a contamination with 100 µg Cd/l (gills > DG). Nevertheless, the order was inversed after a contamination with 200 µg Cd/l (DG > gills). The relatively high levels of Cd accumulated by the gills of *Ruditapes decussatus* reflect the fact that this tissue is a major site for Cd uptake, the same function has been established for the gills of *Mytilus edulis* (Viarengo et al., 1985; Roesijadi, 1986). It seems likely that much of the Cd taken up by the gills is subsequently transported to the digestive glands. Similarly, after Cd exposure of clams (*Ruditapes decussatus*) for 14 days, Bebianno et al. (1994) observed a transport of Cd from gills to digestive glands for storage.

Gills are exposed to the external medium as a consequence of their respiratory function, and are affected by any change in the environment (temperature, salinity, contaminant exposure) (Smaoui-Damak et al., 2004). Digestive gland, the organ where the main part of the absorption occurs, undergoes continuous weight changes owing to the existence of cycles of accumulation or loss of food or reserve substances (Ibarrola et al., 1998).

Smaoui-Damak et al. (2004) showed that the detoxication of Cd in the insoluble forms (such as metal-rich granules) represents the most important mechanism in accumulation and detoxication of Cd in gills of *Ruditapes decussatus*. Some molluscs

appear to predominantly accumulate the metal in insoluble fractions (Viarengo and Nott, 1993). In the present work, Cd is quantified in the insoluble fraction because the distribution of metals among cytosolic fractions may be modified after the heat denaturation (Bradigand and Berthet, 2003).

In studied clams, the MDA levels were only elevated in the digestive glands, indicating a bioaccumulation of contaminants. Indeed, the gills have been noticed as a short-time storage organ, whereas absorption through the digestive gland leads to an accumulation of toxic metals for a longer time (Amiard et al., 1989).

Interestingly, the digestive gland plays an important role in heavy metal metabolism, in particular the digestive cells have a developed lysosomal vacuol system, which seems to be involved not only in the digestive process but also in the accumulation of lipofuscin granules, which may trap heavy metal cations, thus contributing to their detoxication (Viarengo, 1989).

The results presented in this work demonstrate the exposure to cadmium stimulate lipid peroxidation in digestive glands of *Ruditapes decussatus*, as shown by the increased MDA concentration in this organ of the metal-exposed animals. Increased levels of MDA following Cd exposure have been reported in some other bivalve studies (Couillard et al., 1995; Cossu et al., 2000; Géret et al., 2002) but this type of response cannot be generalised, since other researchers have failed to detect such increases (Viarengo et al., 1990; Thomas and Wofford, 1993; Venugopal et al., 1997; Reddy, 1999). Cadmium could provoke the degradation of cellular membranes through two pathways. First, we know that MT is an antioxidant that can be bound by Cd after exposure and that the binding of Cd to this antioxidant would interfere with its capacity to protect against oxidative stress (Christie and Costa, 1984). Second, Cd readily interacts with the ubiquitous sulphydryl groups of amino acids, proteins and enzymes. The replacement of essential metals such as Cu and Zn by non-essential metals such as Cd would tend to change the conformation of antioxidant enzymes and affect their activity (Hamilton and Mehrle, 1986). That is why the increasing of MT detected in the gills and digestive glands of metal exposed clams (*Ruditapes decussatus*) was not followed by a decreasing of MDA levels. The same results were observed by Bebianno et al. (2005).

The increase of metallothionein levels after Cd exposure provides evidence for the induction of this protein in the clams exposed to this non-essential metal, confirming the work on this species (Bebianno et al., 1993), on *Mytilus edulis* (Bebianno and Langston, 1991) and on *M. galloprovincialis* (Bebianno and Langston, 1991). These results suggest that metallothioneins are involved in the accumulation and in the elimination of cadmium from the gills and digestive gland.

Metallothioneins have been identified in the digestive gland (Viarengo et al., 1985) and gills (Roesijadi and Klerks, 1989) of the bivalves. In all, the studied species, MT concentrations were higher in the digestive gland than in the gills (Amiard et al., 2005), including *Ruditapes decussatus*.

Different methods have been developed for MT evaluation like the polarographic (Dabrio et al., 2002) and the colorimetric methods (Viarengo et al., 1997). For the MT analysis, some authors used the polarographic method after heat denaturation of the cytosolic fraction (Bebianno et al., 1994; Smaoui-Damak et al., 2004). Others used the colorimetric method after solvent precipitation during the fraction preparation (Viarengo et al., 1999).

Géret et al. (1998) showed that MT amounts were significantly lower using solvents in comparison with heat denaturation in gills of *M. edulis*. This observed difference could result from the coprecipitation of MTs with hydrophobic compounds during the first addition of solvents. Alternatively, MTs could have remained in the last supernatant after the second ethanol addition together with highly hydrophilic compounds. The chromatographic profiles showed the presence of MT-I and MT-II (which can be analysed by the colorimetric method) in the heat-stable fractions.

So, to compare the polarographic and the colorimetric method, the second method was combined to the heat denaturation for MT quantification in the gills of *R. decussatus*. The results were compared with those obtained using the polarographic method with heat denaturation during the fraction preparation.

The results showed that MT concentrations obtained by the polarographic method are higher than those obtained by the colorimetric method. And that MTs' variation over months was detected by the polarographic method and was masked with the colorimetric method.

It seems that the polarographic method is more sensitive than the colorimetric one. And in order to determine the MT variations over months, it is better to use the polarographic method. Nevertheless

- the variation of MTs levels was also detected by the colorimetric method
- after the cadmium exposure, the increase of MT concentrations was showed using the colorimetric method
- which can be used as a tool for MT quantification in biomonitoring programmes (Viarengo et al., 1997, 2000a).

So, if the purpose is the detection of the MT variability, it is more suitable to use the colorimetric method combined with the heat denaturation in order to avoid the loss of the MTs.

The present study showed that the Cd, MTs and MDA levels are highly affected by the metal concentration factor but not affected by the sex factor.

Hamza-Chaffai et al. (1999) showed that the sex factor did not affect metal concentrations in the digestive gland of *R. decussatus*. Nevertheless, important differences in metallothionein levels linked to sex were observed during July (spawning period in females). For the other months, the reproductive state for male and female was nearly the same, leading to less variability in MT levels according to the sex. Smaoui-Damak et al. (2004) showed that the MTs' concentrations are not affected by the sex factor.

In this work, sample collection was carried out in December; so we can explain the absence of variation of MTs, Cd and MDA levels with sex (sexual rest).

5 Conclusion

In Tunisia, *Ruditapes decussatus* constitute an interesting bioindicator of metal contamination and an adequate material for biomonitoring based on biomarkers. In order to validate the use of some biomarkers, we need to combine both in situ and in vivo experiments. In situ studies have the advantage of reflecting the reality of field, but in vivo experiments are necessary to understand some induction mechanisms. Moreover, in

order to make molecular studies and gene expression of metallothionein in field condition levels that are generally low is why contamination experiments allow induction. The present work evidenced the effect of two doses of cadmium contamination on MTs and MDA levels with respect to the organ distribution and variations linked to dose and sex.

For metallothionein quantification, the colorimetric method was combined to the heat denaturation in order to avoid the loss of MTs and the results were compared to those obtained by the polarographic method. It seems that the polarographic method is more sensitive than the colorimetric one. Nevertheless, the use of the colorimetric method could be also recommended for biomonitoring purposes owing to repeatability and low cost.

Acknowledgements

The CBS (Sfax) and the ARSEN (Sfax) are thanked for providing good conditions during sample preparation. A special thanks goes to Dr. Smaoui-Damak Wafa for her help.

References

Amiard, J.C. and Cosson, R.P. (1997) 'Biomarqueurs en ecotoxicologie', in Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C. and Rmade, F. (Eds.): *Aspects Fondamentaux*, Masson, Paris.

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Ballan-Dufrançais, C., Berthet, B., Jeantet, A.Y., Martoja, R. and Truchet, M. (1989) 'Study of the bioaccumulation at the molecular, cellular and organism levels of lead and copper transferred to the oyster Crassostrea gigas thunberg directly from water or via food', *Polish. Acad. Sci.*, Vol. 34, pp.521–529.

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J. and Rainbow, P.S. (2005) 'Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers', *Aquatic Toxicology*, Vol. 76, pp.160–202.

Bebianno, M.J. and Langston, W.J. (1989) 'Quantification of metallothioneins in marine invertebrates using differential pulse polarography', *Port. Electrochim. Acta*, Vol. 7, pp.511–524.

Bebianno, M.J. and Langston, W.J. (1991) 'Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis*', *Comp. Biochem. Physiol*, Vol. 103, pp.79–85.

Bebianno, M.J. and Serafim, M.A.P. (1998) 'Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*', *Science of the Total Environment*, Vol. 214, pp.123–131.

Bebianno, M.J., Company, R., Serafim, A., Camus, L., Cosson, R.P. and Fiala-Médoni, A. (2005) 'Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from mid-Atlantic ridge hydrothermal vent fields', *Aquatic Toxicology*, Vol. 75, pp.354–373.

Bebianno, M.J., Nott, J.A. and Langston, W.J. (1993) 'Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussates*: the role of metallothioneins', *Aquat Toxicol.*, Vol. 27, pp.315–334.

Bebianno, M.J., Serafim, M.A.P. and Rita, M.F. (1994a) 'Involvement of metallothionein in cadmium accumulation an elimination in the clam *Ruditapes decussatus*', *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 53, pp.726–732.

Bradigand, V. and Berthet, B. (2003) 'Some methodological aspects of metallothionein evaluation', *Comp. Biochem. Physiol*, Vol. 134, pp.55–61.

Cai, L., Satoh, M., Tohyanna, C. and Cherian, M.G. (1999) 'Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role', *Toxicology*, Vol. 132, pp.85–98.

Cavaletto, A., Ghezzi, B., Burlando, B., Evangelisti, V., Ceratto, N. and Viarengo, A. (2002) 'Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*', *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, Vol. 131, pp.447–455.

Christie, N.T. and Costa, M. (1984) 'In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV. Disposition of metals in cells: interactions with membranes, glutathione, metallothionein, and DNA', *Biol. Trace Elem. Res.*, Vol. 6, pp.139–158.

Cosson, R.P. and Amiard, J.C. (1998) in Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C. and Rmade, F. (Eds.): *Utilisation des Biomarqueurs Pour la Surveillance de la Qualité de L'environnement*, Lavoisier, Londre.

Cossu, C., Doyott, A., Badut, M., Exinger, A. and Vasseur, P. (2000) 'Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments', *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, Vol. 45, pp.106–121.

Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Tessier, A., Pellerin-Massicott, J. and Auclair, J.C. (1995) 'Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher level of biological organization', *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.*, Vol. 52, pp.703–715.

Dabrio, M., Rodriguez, A.R., Bordin, G., Bebianno, M.J., de Ley, M., Sestakova, I., Vasak, M. and Nordberg, M. (2002) 'Recent developments in quantification methods for metallothionein', *J. Inorg. Biochem*, Vol. 88, pp.123–134.

Di Giulio, R.T., Habig, C. and Gallagher, E.P. (1993) 'Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish', *Aquat. Toxicol.*, Vol. 26, pp.1–22.

Géret, F., Rainglet, F. and Cosson, R.P. (1998) 'Comparison between isolation protocols commonly used for the purification of mollusc metallothioneins', *Marine Environmental Research*, Vol. 46, pp.545–550.

Géret, F., Serafim, A., Barreira, L. and Bebianno, M. (2002) 'Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*', *Biomarkers*, Vol. 7, pp.242–256.

Gnassia-Barelli, M., Roméo, M. and Puiseux-Dao, S. (1995) 'Effects of cadmium and copper contamination on calcium content of the bivalve *Ruditapes decussatus*', *Mar Environ Res.*, Vol. 39, pp.325–328.

Hamilton, S.J. and Mehrle, P.M. (1986) 'Metallothionein in fish: review of its importance in assessing stress from metal contaminants', *Trans. Am. Fish. Soc.*, Vol. 115, pp.596–609.

Hamza-Chaffai, A., Amiard, J.C. and Cosson, R.P. (1999) 'Relationship between metallothioneins and metals in a natural population of Cclam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast: a non- linear model using box-cox transformation', *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, Vol. 123, pp.153–163.

Hamza-Chaffai, A., Amiard, J.C., Pellerin, J., Joux, L. and Berthet, B. (2000) 'The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of *in situ* metal exposure', *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, Vol. 127, pp.185–197.

Harris, E.D. (1992) 'Regulation of antioxidant enzymes', *FASEB Journal*, Vol. 6, pp.2675–2683.

Ibarrola, I., Larretxea, X., Iglesias, J.I.P., Urrutia, M.B. and Navarro, E. (1998) 'Seasonal variation of digestive enzyme activities in the digestive gland and the crystalline style of the common cockle *Cerastoderma edule*', *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 121, pp.25–34.

Langston, W.J., Bebianno, M.J. and Burt, G. (1998) 'Metabolic pathways in marine invertebrates', in Langston, W.J. and Bebianno, M.J. (Eds.): *Metal Metabolism in Aquatic Environments*, Chapmann and Hall, London, pp 219–284.

Leibovitz, B.E. and Siegel, B.V. (1980) 'Aspects of free radical reactions in biological systems: aging', *J. Geront.*, Vol. 35, pp.45–56.

Reddy, P.S. (1999) 'Modulations in antioxidant enzymes in the hepatopancreas and gill of the freshwater crab *Oziotelphusa senex* during exposure to cadmium and copper', *Fresenius Environ. Bull.*, Vol. 8, pp.445–452.

Roesijadi, G. (1986) 'Mercury-binding proteins from the marine mussel, *Mytilus edulis*', *Environ. Health Perspect*, Vol. 65, pp.45–48.

Roesijadi, G. (1992) 'Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals', *Aquat. Toxicol.*, Vol. 22, pp.81–114.

Roesijadi, G. and Klerks, P. (1989) 'A kinetic analysis of Cd-binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills', *J. Exp. Zool*, Vol. 251, pp.1–12.

Roméo, M. and Gnassia-Barelli, M. (1995) 'Metal distribution in different tissues and in subcellular fractions of the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* treated with cadmium, copper, or zinc', *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 111, pp.457–463.

Smaoui-Damak, W., Hamza-Chaffai, A., Bebianno, M.J. and Amiard, J.C. (2004) 'Variation of metallothioneins in gills of the clam *Ruditapes decussatus* from the Gulf of Gabès (Tunisia)', *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*, Vol. 139, pp.181–188.

Smaoui-Damak, W., Hamza-Chaffai, A., Berthet, B. and Amiard, J.C. (2003) 'Preliminary study of the clam *Ruditapes decussatus* exposed *in situ* to metal contamination and originating from the Gulf of Gabès, Tunisia', *Bull. Environ. Contam. Toxico*, Vol. 71, pp.961–970.

Solé, M., Porte, C., Biosca, X. Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K., Livingstone, D.R. and Albaiges, J. (1996) 'Effects of the 'Aegean Sea' oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in the digestive gland of mussel (*Mytilus edulis*)', *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, Vol. 113, pp.257–265.

Stohs, J.S., Bagchi, D., Hassoun, E. and Bagchi, M. (2000) 'Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions', *Journal of Environmental Pathology and Oncology*, Vol. 19, pp.201–213.

Storey, K.B. (1996) 'Oxidative stress: animal adaptations in nature', *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Vol. 29, pp.1715–1733.

Sunderman, F.W., Marzouk, A., Hopfer, S.M., Zaharia, O. and Reid, M.C. (1985) 'Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats', *Annals of Clinical and Laboratory Sciences*, Vol. 15, pp.229–236.

Thomas, P. and Wofford, H.W. (1993) 'Effects of cadmium and arochlor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues', *Aquat. Toxicol.*, Vol. 27, pp.159–178.

Thompson, J.A.J. and Cosson, R.P. (1984) 'An improved electrochemical method for the quantification of metallothioneins in marine organisms', *Mar. Env. Res.*, Vol. 11, pp.137–152.

Venugopal, N.B.R.K., Ramesh, T.V.D.D., Reddy, D.S. and Reddy, S.L.N. (1997) 'Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in a freshwater field crab, *Barytelphusa guerini*', *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 59, pp.132–138.

Viarengo, A. (1989) 'Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level', *CRC Reviews in Aquatic Sciences*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.295–317.

Viarengo, A. and Nott, J.A. (1993) 'Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates', *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, Vol. 104, pp.355–372.

Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N. and Panfoli, I. (2000b) 'Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview', *Cell. Mol Biol.*, Vol. 46, pp.407–417.

Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A and Fabbri, R. (1999) 'Metallothionéin as a tool in biomonitoring programmes', *Biomarkers*, Vol. 4, pp.455–466.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M. and Livingstone, D.R. (1991) 'Seasonal variations in the antioxydant defense systems and lipid peroxydation of the digestive gland of mussels', *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, Vol. 1006, pp.187–190.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N. and Orunesu, M. (1990) 'Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* LAM', *Comparative of Biochemistry and Physiology Part C*, Vol. 97, pp.37–42.

Viarengo, A., Lafaurie, M., Gabrielides, G.P., Fabbri, R., Marro, A. and Roméo, M. (2000a) 'Critical evaluation of an intercalibration exercise, undertaken in the framework of the MED Pol biomonitoring program', *Marine Environmental Research*, Vol. 49, pp.1–18.

Viarengo, A., Palmero, S., Zannicchi, G., Capelli, R., Vaissiere, R. and Arunesu, M. (1985) 'Role of metallothionein in Cu and Cd accumulation and elimination in the gill and digestive gland cells of Mytilus galloprovincialis Lam', *Mar. Envron. Res.*, Vol. 16, pp.23–36.

Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F. and Fabbari, R. (1997) 'A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs', *Marine Environmental Research*, Vol. 44, pp.69–84.

Zielinski, S. and Portner, H.O. (2000) 'Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age?', *Comp. Biochem. and Physiol. Part B*, Vol. 125, pp.147–160.

MACHREKI-AJIMI M, KETATA I. , **LADHAR-CHAABOUNI R** and HAMZA-CHAFFAI, (2008) The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers in Cerastoderma glaucum. Ecotoxicology ,17:1-11

Ecotoxicology (2008) 17:1–11
DOI 10.1007/s10646-007-0166-9

The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers in *Cerastoderma glaucum*

M. Machreki-Ajmi · I. Ketata · R. Ladhar-Chaabouni · A. Hamza-Chaffai

Accepted: 9 August 2007 / Published online: 4 December 2007
© Springer Science+Business Media, LLC 2007

Abstract The present study was designed to detect in situ effects of cadmium on marine organisms *Cerastoderma glaucum* from the gulf of Gabès (Tunisia). Six sampling stations were chosen: one site, relatively far from known local source of pollution, was considered as uncontaminated site and five sites clearly exposed to anthropogenic impact. Metallothionein like protein (MTLP) and sub-cellular metal partitioning were measured in cockles (*C. glaucum*) gills and digestive gland. Various biomarkers were also measured, including malondialdehyde (MDA) in the digestive gland and acetylcholinesterase activity (AChE) in the remainder. The health status of the cockles was assessed by using the condition index (CI). Significant differences between sites were noted for Cd concentrations, (CI) and also for the three studied biomarkers. Significant higher biomarkers response was measured in cockles from stations located in the northern part of the gulf, which are exposed directly to industrial and urban effluents, whereas the response of most biomarkers was minimal at the reference station. Positive and significant correlations were observed between MTLP and Cd concentrations in the digestive gland and in the gills. However, it must be noted that these correlations were more significant in the digestive gland, suggesting that compared to the gills, the digestive gland of *C. glaucum* is more suitable for monitoring metal pollution. The subcellular distribution of Cd showed that the soluble fraction was the major compartment for Cd storage, a pattern which is due to the role of MTLP in Cd detoxication. But at the most contaminated site (EH), cadmium in the digestive gland was preferentially accumulated in the insoluble fraction (P1) suggesting that the MTLP capacity in binding metals was not sufficient to avoid the binding of Cd to the insoluble fraction. Furthermore, the MTLP concentrations in the cockles from this site are lower than expected. So in highly polluted sites, MTLP in *C. glaucum* should not be used as a useful biomarker for metal pollution. The lipid peroxidation as presented by malondialdehyde levels, and MT-like protein concentrations increased in cockles exposed to cadmium contamination. We can, therefore, hypothesize that Cd could induce MTLP synthesis and MDA increase. While AChE had distinct and specific pattern showing that cadmium is not the only factor of the inhibition of cholinesterase activity. There are other polluting inputs engendering this inhibition.

Keywords Acetylcholinesterase · Cadmium · *C. glaucum* · Condition index · Malondialdehyde · Metallothionein like protein · Subcellular distribution

M. Machreki-Ajmi (✉) · I. Ketata · R. Ladhar-Chaabouni · A. Hamza-Chaffai
Marine Ecotoxicology, UR 09-03, University of Sfax, IPEIS, BP 805, 3018 Sfax, Tunisia
e-mail: monia.machreki@fss.rnu.tn

Introduction

The gulf of Gabès area (South eastern part of Tunisia) is known to be very rich in aquatic resources and it represents an important economic interest. This area is also influenced by anthropogenic inputs associated with a considerable demographic growth. Many industrial activities such as crude phosphate treatment, chemical industry, tannery, etc...release in the marine environment their effluents containing pollutants such as toxic metals (Illou 1999; Zairi and Rouis 1999; Serbaji 2000; Hamza-Chaffai et al. 2000, 2003). Moreover, cadmium is discharged from crude phosphate treatment plants located in the studied area

(Sfax, Skhira and Gabès) (Fig. 1). Monitoring studies in our laboratory showed that cadmium is one of the most important contaminant (Hamza-Chaffai et al. 1995; 2000, 2003; Smaoui-Damak et al. 2003).

The major fraction of trace metals introduced into the environment is found to be associated with the bottom sediments (Illou 1999) constituting a potential danger for both autotrophic and hetetrophic benthic organisms. Among benthic species, bivalves are characterised by their very high bioaccumulation capacities of heavy metals present in the water or sediment and thus are considered as pollution bioindicators (Phillips 1990).

Several monitoring studies of environmental metal pollution in the gulf of Gabès are based on measuring the level of selected metal in the whole organism or in respective organs (El Menif-Triqui 1995; Chouba et al. 1998; Smaoui-Damak et al. 2003; Machreki-Ajmi and Hamza-Chaffai 2006). However, measuring only the metal content does not give information about its effect at the subcellular level. Therefore, the evaluation of the biochemical biomarkers in marine organisms may be useful in assessing chemical exposure and in predicting the potential detrimental effect induced by different contaminants in this area. Some studies about pollution and biomarkers were devoted to some bivalves such as the clam *Ruditapes decussatus* (Hamza-Chaffai et al. 2000, 2003; Smaoui-Damak et al. 2003, 2004). However there are no studies about the cockle *C. glaucum*. This species was validated in previous studies as a biomonitor organism showing correlation between site contamination and metal accumulation (Szefer and Szefer 1985; Szefer and Wolowicz 1993; Arjonilla et al. 1994; Szefer et al. 1999; Machreki-Ajmi and Hamza-Chaffai 2006). Moreover, *C. glaucum* lives in the superficial sediment, and together with *R. decussatus* could provide a couple of bivalves for pollution biomonitoring along Tunisian coasts. The lack of information about the usefulness of biomarkers in *C. glaucum* as powerful tools to detect the exposure and biological effect of marine pollution justifies the importance of this study.

The present work aims to characterize the biochemical response of *C. glaucum* to in situ cadmium contamination. A multi biomarker approach was used: MT-like protein (MTLP) in digestive gland and in the gills, malondialdehyde (MDA) in the digestive gland and acetylcholinesterase (AChE) activity in the remainder. Determining metallothionein like protein concentrations can be a suitable monitoring procedure for assessing metal contamination in the marine environment (Carpené 1993; Amiard and Cosson 1997; Cosson and Amiard 1998; Langston et al. 1998; Cosson 2000; Hamza-Chaffai et al. 2000, 2003). Malondialdehyde was also measured as reflecting metal effect on the state of lipid peroxidation of the membrane (Hamilton and Mehrle 1986; Hamza-chaffai et al. 2003). Acetylcholinesterase activity which is known to be

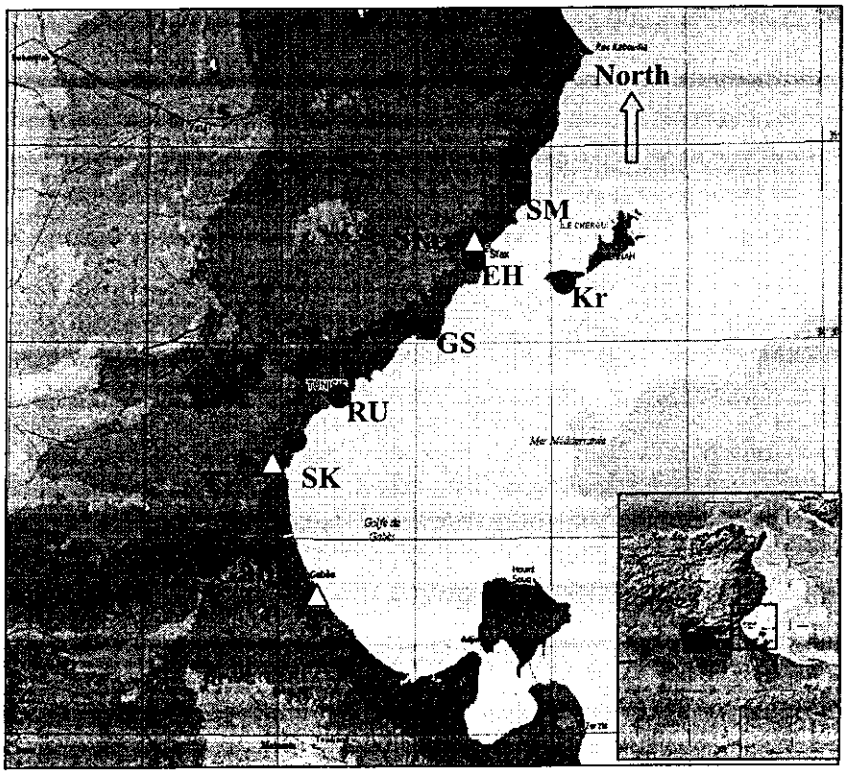


Fig. 1 Geographical location of the sampling stations in the gulf of Gabès. SM = Sidi Mansour; EH = EL Hofra; GS = Gargour Souissi; RU = Ras Ungha; SK = Skhira; Kr = Kerkennah; (Δ): crude phosphate treatment plant

inhibited by the presence of organophosphorus compounds and carbamates is considered an exposure biomarker for these substances (Galgani and Bocquené 1989). Some others studies demonstrated that acetylcholinesterase is also inhibited by heavy metals in various organisms (Bocquené et al. 1997), in mussels (Najimi et al. 1997) and in clams (Hamza-Chaffai et al. 1998). In addition to these data on chemical bioaccumulation and biochemical effect, the impact on organisms was also assessed using a general index, the condition index, which reflects the physiological status of the studied animals.

As far as we know, no previous in situ study dealing with biomarkers in *C. glaucum* has been reported. It seems important to test if the spatial variability in biomarkers responses would reflect any significant trend of contamination impact and to validate the usefulness of biomarkers in the *C. glaucum* to in situ contamination monitoring.

Materials and methods

Studied area

Cockles *C. glaucum* were collected at six sites along the gulf of Gabès. Sampling sites were not necessarily selected on the basis of specific source of pollution, but rather represent an exploratory investigation of the large-scale variability in the level of contaminants along the studied littoral. Stations of Sidi Mansour (SM), EL Hofra (EH) and Gargour Souissi (GS) were located in the northern part of the gulf (Fig. 1). (SM) and (EH) stations are urban and industrialized areas with variable degrees of organic and metallic pollution in their marine ecosystems (Illou 1999; Serbaji 2000). Station (EH) is considered as one of the most metal contaminated sites in the gulf of Gabès (Machreki-Ajmi 2002; Smaoui Dammak et al. 2003) due to the intense industrial activity in this area, and the presence of the stock of phosphogypsum which represents the main source of cadmium contamination. The site of (GS) is not directly associated with punctual sources of pollution but is located at 7 km to the south of (EH) station. It could then receive contamination by the marine streams carrying pollution from the north to the south. Stations of Skhira (SK) and Ras Ungha (RU) are located in the southern sector of the gulf of Gabès. (SK) station is adjacent to the industrial complex of Skhira. However (RU), which was chosen as a reference site, is relatively far from known local source of industrial and urban pollution. The sixth site in Kerkannah islands (Kr) is located 20 km of the coast of Sfax (Fig. 1). This area supports an intense fishing activity and an important petroleum plant.

Bivalve collection and dissection

In each site, *C. glaucum* 29–32 mm (n = 15) were collected near the low water level during ebb tide in February 2001. At the time of sampling, water temperature varied between 15.7 and 17.7°C; the salinity ranged between 39 and 41.5‰. The cockles' samples were immediately placed in coolers chilled with ice (T = −4°C) for transport to our laboratory. There, each animal was measured (Shell length in mm) and weighed [total mass (g) and wet weight soft tissue (g)] to determine its condition index (CI = (wet weight soft tissues/total mass) *100). Cockles were then rapidly dissected; gills and the digestive gland were dissected and weighed. The digestive gland of each animal was divided in two parts. One part was used for malondialdehyde quantification. The other part along with the gills were analyzed for metallothioneins and sub-cellular partitioning. Acetylcholinesterase activity was determined using the remainder (foot, mantle, adductor muscles and siphons).

Metal and metallothioneins analysis

Fraction preparation

The digestive gland and gills of each specimens were separately analysed (n = 15). The tissues were homogenized in ice-cold 50 mMTris with 4.4 mM β-mercaptoethanol buffer adjusted to pH 8.6. The ratio of Tris solution to the fresh tissue mass was 4 ml/g. The homogenates were submitted to a 10-min sonication in order to break the cell membrane and release the remaining metals, and they were centrifuged (25,000g, 60 min, at 4°C). The supernatants (S1) were separated from the pellet (P1), heat denatured (80°C for 15 min) to precipitate the heat sensitive compounds, and subsequently centrifuged (20,000g, 30 min, at 4°C).

Metallothionein like protein analysis

MT-like protein (MTLP) concentrations were measured by spectrophotometric determination of S–H groups using Ellman's reagent, according to the procedure of Viarengo et al. (1997). The heat stable fractions (the supernatant of the second centrifugation) of gills and of digestive gland were added to 4.2 ml of 0.43 mM DTNB in 0.2 M phosphate buffer. The concentration of reduced sulfhydryls was evaluated by reading the absorbance at 412 nm by using glutathione (GSH) as a reference standard. The results were expressed as concentration of MTLP (mg/g of fresh tissue).

Metal analysis

The soluble (S1) and insoluble fraction (P1) were digested with suprapure nitric acid at 80°C for 7–8 h (1 ml nitric acid per 0.5 ml cytosol and 1 ml nitric acid per 0.5 g pellet). The volume was then adjusted to 3 ml with deionised water. The cadmium level was then analyzed in the acid solution by flameless atomic absorption spectrophotometry using the Zeeman correction. Internal quality controls were based on the analysis of Cd in standard reference materials (mussel tissue, SRM-2976) from the National Institute of standard and technology. Data obtained were 0.75 ± 0.12 µg g^{-1} compared with a certified value of 0.82 ± 0.16 µg g^{-1}.

Malondialdehyde analysis

Malondialdehyde determination was carried out in the digestive gland using the colorimetric method (Sunderman et al. 1985) which is based on the reaction of thiobarbituric acid with MDA. Malondialdehyde levels were estimated at 532 nm using 1,1,3,3-tetraethoxypropane as a standard. The concentration of lipid peroxidation in the digestive gland is expressed as µM of MDA per gram of fresh tissues.

Acetylcholinesterase analysis

For acetylcholinesterase measurements, the tissues (foot, mantle, adductor muscles and siphons) were homogenized in phosphate buffer (0.1 M, pH = 7.4) at a ratio of 3 ml of buffer for 1 g of tissues. The homogenate obtained was then centrifuged at 9000 g for 20 min at −4°C. An aliquot of the supernatant was used for measuring AChE according to Ellman method (Ellman et al. 1961) modified for microplate reading by Bocquené and Galgani (1998). The extracts were incubated in the presence of acetylthiocholine iodide as substrate and 5,5′-dithiobis-2-dinitrobenzoic acid (DTNB). The reaction was carried out at 25°C and the absorption was measured by a spectrophotometer at 412 nm. The enzymatic reaction rate was quantified against a blank without substrate for each activity measurement. A second blank was performed without sample to substract the spontaneous hydrolysis of the substrate. AChE activity is expressed as nmol of the product developed per minute and per mg of proteins. The quantity of protein present in the homogenate was determined according to the methods of Bradford (1976) at 595 nm, using bovine serum albumin (BSA) as a reference standard.

Statistical analysis

Differences in condition index (CI), cadmium and biomarkers concentrations between cockles originating from the six sites were evaluated by an analysis of variance (one-way ANOVA) with significance level of 0.05 using the program SPSS software. Normality and homogeneity of variances were verified and a parametric one-way analysis (ANOVA) was performed on data. A Tukey test for a normal distribution was used.

Results

Metal in digestive gland and gills

Cadmium concentrations analyzed in the digestive gland and in gills at different sites are presented in Fig. 2. The cadmium (S1 + P1) distribution in the digestive gland and in the gills followed the same spatial variation and were area-dependant (ANOVA, $p < 0.05$). The cockles from El Hofra (EH) presented the highest cadmium concentrations with a significant difference with the other sites (Tukey test, $p < 0.05$). Relatively high Cd concentrations were observed at Sidi Mansour (SM) site. Intermediate levels were recorded at the stations of Gargour Soussi (GS) and Skhira (SK). However the significant lowest concentrations were observed at Ras Ungha (RU) and Kerkennah (Kr) (Tukey test, $p < 0.05$).

In the contaminated sites (EH, SM, GS and SK) the digestive gland accumulated more cadmium than the gills. The ratio digestive gland/gills was higher in the most contaminated site (EH) than the other sites.

Distribution of cadmium concentration between soluble (S1) and insoluble (P1) fractions

Metal concentrations were compared in two fractions: the insoluble fraction (P1) and the soluble fraction (S1)

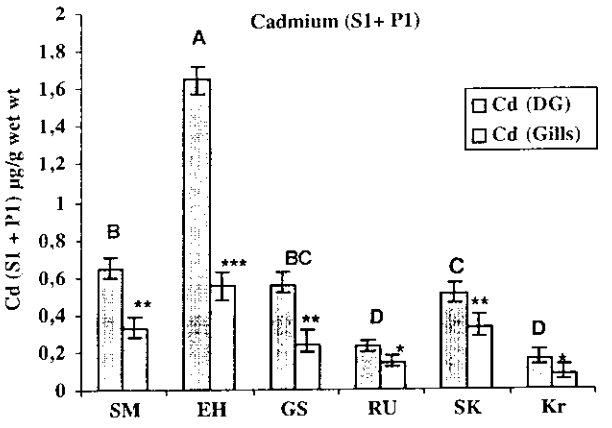


Fig. 2 Spatial variation of the Cd concentrations (S1 + P1) (µg/g wet wt) (confidence intervals at 95% level) in the digestive gland (DG) and in gills of cockle (*C. glaucum*) collected at different sites ($n = 15$). Sites with the same superscript indicate that they did not differ significantly at 95% level (Tukey test)

containing MT-like protein (Fig. 3A). In the two studied organs (digestive gland and gills) The soluble fraction was the major compartment for the cadmium storage, except in cockles from (EH) in which the insoluble fractions of the digestive gland accumulates 60% of total cadmium. The relationship between cadmium concentrations in the soluble (S1) or insoluble (P1) fractions and total cadmium concentrations (S1 + P1) is shown in Fig. 3B. Positive correlations between cadmium concentrations in (S1) or (P1) fraction versus Cd (S1 + P1) were present. In the gills the highest correlation coefficient is obtained for the soluble fraction. In the digestive gland equivalent correlation coefficients were obtained for the two fractions. But the highest slope is observed for the insoluble fraction. In fact, when the cadmium contaminations in the digestive gland increase, the metal was incorporated into both (S1) and (P1) fractions. But, when the total cadmium concentrations became higher than 1 $\mu g\ g^{-1}$ wet weight, the cadmium will be preferentially accumulated in the insoluble fraction (P1).

Metallothionein like protein variation in the two organs

MT-like protein concentrations (mg g^{-1} wet weight) in the digestive gland and in the gills of *C. glaucum* collected in different sites are presented in Fig. 4A. Compared to the gills, the digestive gland of cockles collected from different sites presented higher MTLP concentrations, except for cockles from (EH) in which no significant differences were observed between MTLP concentrations in the two organs.

The MT-like protein concentrations in the digestive gland and in the gills followed the same spatial variation. Significant differences among sites (ANOVA, $p < 0.05$) were proved. The minimum value was found in the reference site (RU), significantly lower than the other sites (Tukey test, $p < 0.05$) followed by station (SK). The significant high concentrations were observed in station (SM), (EH), (GS), and (Kr) (Tukey test, $p < 0.05$) without any significant difference. In these urban and industrialized sites, MTLP concentrations were 2-fold higher than those in cockles from the reference site (RU).

MTLP were correlated to metal concentrations in the soluble fraction (S1). Correlation results and significance are presented in Fig. 4B. Significant relationships were found between cadmium and MTLP in the digestive gland and in gills. The correlation was more significant in the digestive gland (r significant at 99%) than in the gills (*r* significant at 95%).

Variation of MDA concentration in the digestive gland according to sites

The malondialdehyde (MDA) concentrations in the digestive gland of cockles *C. glaucum* from different sites are presented in Fig. 5A. The analysis of variance revealed a spatial variation of MDA concentrations (ANOVA, $p < 0.05$). Cockles from (EH) and (Kr) have the highest

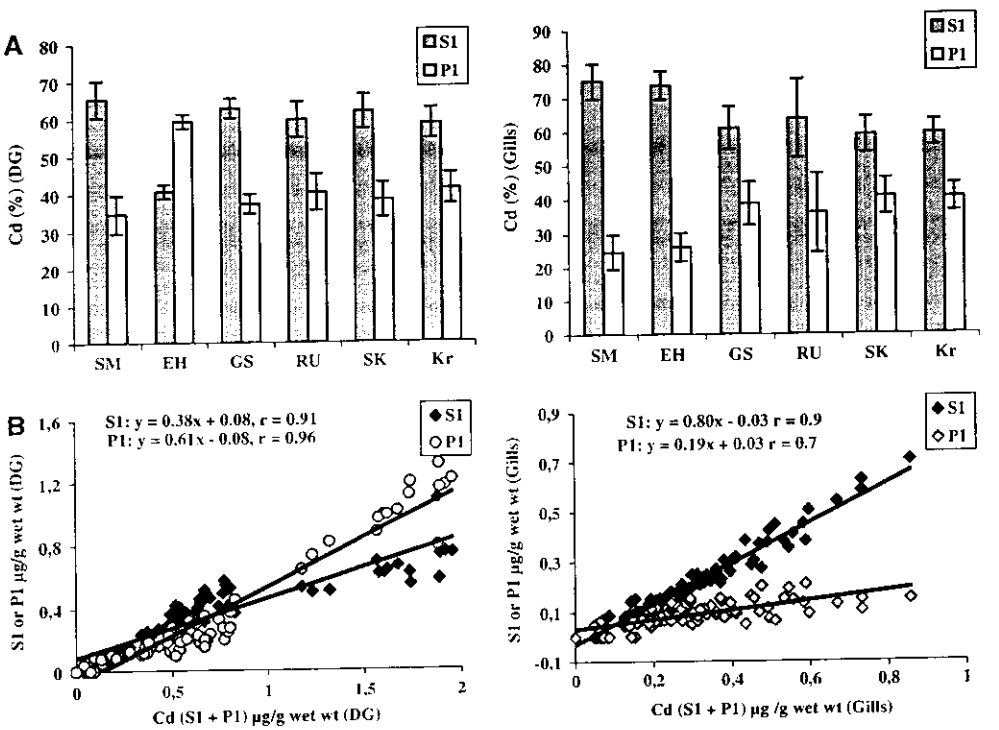


Fig. 3 (A) Percentages of Cd in the soluble (S1) and insoluble (P1) of digestive gland (DG) and gills of cockles (*C. glaucum*) collected from different sites (confidence intervals at 95% level). (B) The relationship between concentrations of S1 or P1 Cd and total Cd (S1 + P1) in the digestive gland (DG) and in the gills of the studied species (*C. glaucum*) (*r* significant at 99%, $n = 88$)

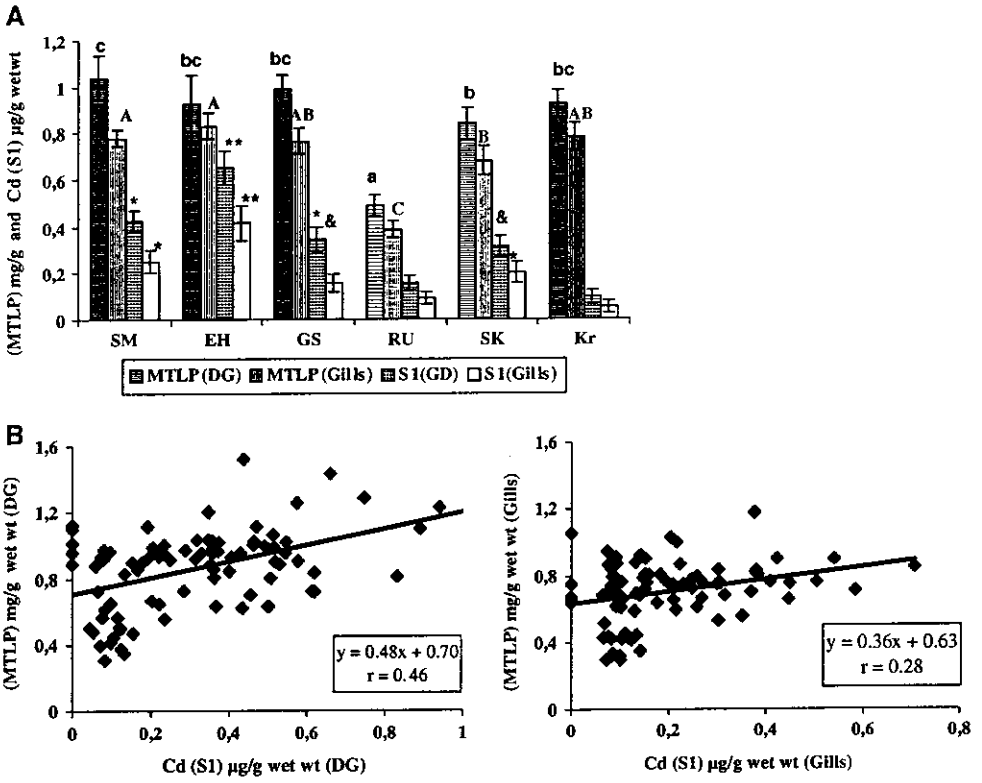


Fig. 4 (A) Spatial variation of MTLP (mg/g wet wt) and Cd (S1) (µg/g wet wt (confidence at 95% level) in the digestive gland (DG) and in the gills of cockle (*C. glaucum*) collected from different sites (n = 15). Sites with the same superscript indicate that they did not differ significantly at 95% level (Tukey test). (B) MTLP concentrations versus Cd concentrations in the soluble fraction in the digestive gland and in the gills of *C. glaucum* (r significant at 99% for digestive gland and significant at 95% for the gills, n = 84)

levels of lipid peroxidation in their digestive gland (Tukey test, $p < 0{,}05$) with MDA concentrations reaching, respectively, 204 and 226 µmol g^{-1} wet weight compared with 112 µmol g^{-1} wet weight in the digestive gland of cockles from the control site. Except (Kr) site, the MDA distribution in the studied sites followed the same spatial variation of Cd concentrations.

The relationship between MDA and total Cd concentrations in the digestive gland (S1 + P1) (Fig. 5B) is described by the equation: [MDA] = 26.91x + 134.91. Significant relationships were found between MDA and Cd concentrations in the digestive gland, (r significant at 95%).

Variation of AChE activity in the remainder according to the different sites

The acetylcholinesterase activities in the remainder of cockles *C. glaucum* collected from different sites are presented in Fig. 6. Spatial variation of AChE activity was shown (ANOVA, $p < 0.05$). Compared to the other sites, the significant higher inhibition of cholinesterase activity was observed in both (SM) and (GS) sites, followed by (EH) (the highest cadmium contaminated site) (Tukey test, $p < 0.05$). It seems that cadmium is not the only factor of the cholinesterase activity inhibition. There are other polluting inputs causing this inhibition.

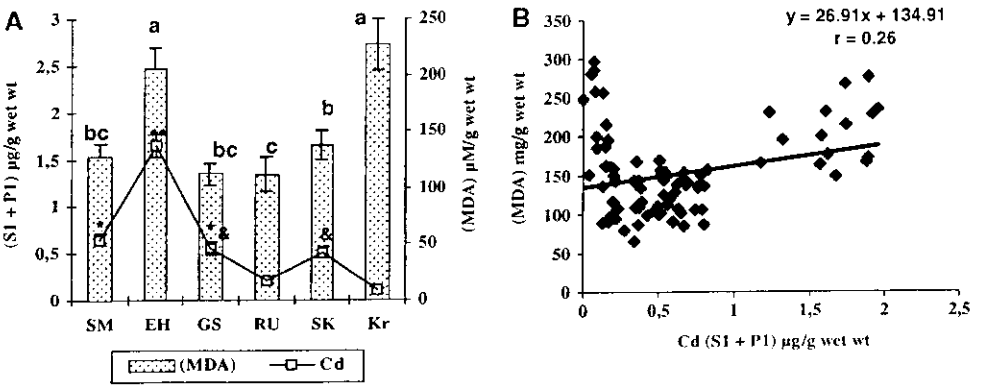


Fig. 5 (A) Spatial variation of MDA concentration (confidence at 95% level) in the digestive gland of cockles (*C. glaucum*) collected from different sites (n = 15). (B) MDA concentrations versus total Cd concentrations in the digestive gland of *C. glaucum* (r significant at 95%, n = 87). Sites with the same superscript indicate that they did not differ significantly at 95% level (Tukey test)

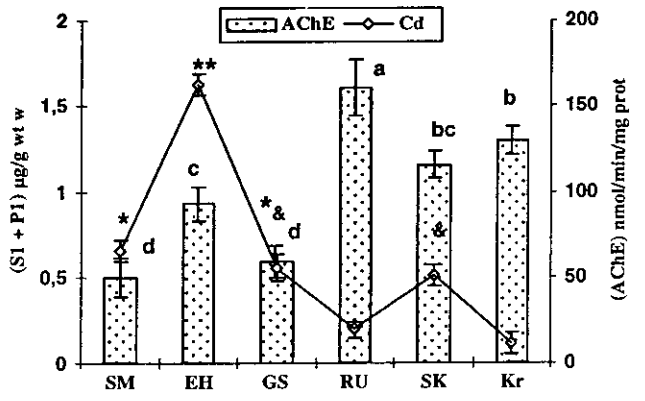


Fig. 6 Spatial variation of AChE (nmol/min/mg Prot) in the remainder of cockles (*C. glaucum*) collected at different sites (n = 15). Sites with the same superscript indicate that they did not differ significantly at 95% level (Tukey test)

Variation of condition index according to sites

Condition index (CI) values are shown in Fig. 7. Cockles from (RU), (Kr) and (SM) generally had the highest (CI). A decrease in the (CI) values in the other sites was observed. This decrease being greater in the cockles from (EH) and (GS) sites (Tukey test, $p < 0.05$). There was a trend of highly contaminated cockles (EH) showing the lowest condition index.

Discussion

The present work resulting from a field study is based on *C. glaucum* as a bioindicator and MT-like protein, malondialdehyde and acetylcholinesterase activities as biomarkers of metal contamination. MT-like protein and cadmium concentrations were analyzed in the digestive gland and in gills. Significant and similar pattern of

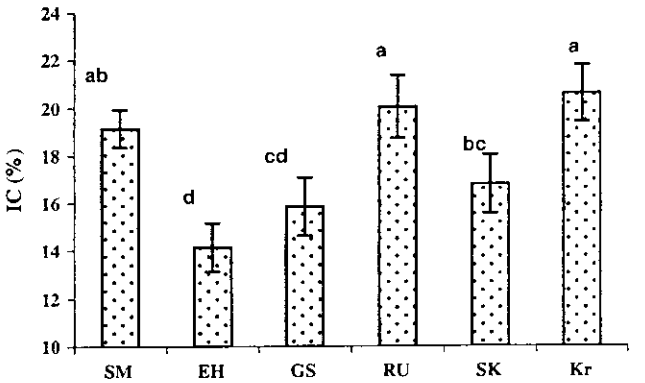


Fig. 7 Spatial variation of condition index (CI) (confidence at 95% level) in cockle (*C. glaucum*) collected from different sites. Sites with the same superscript indicate that they did not differ significantly at 95% level (Tukey test)

variation between sites were observed for the two studied organs. When compared to the control site, the cockles from (SM), (EH), (GS) and (SK) stations were under a severe anthropic influence, showing high Cd concentrations. The cadmium concentrations in the digestive gland of cockles collected from the corresponding polluted sites displayed approximately twice to eight times the content of those from the reference site (RU). The cadmium content of the cockles from (EH) exceeds the maximum permitted levels according to the FDA regulation (FDA 1993). The highest levels of Cd in this site could reflect a more important source of Cd input in this area. In fact, EH site received anthropogenic contaminants from several sources, especially the stock of phosphogypsum which represents the main source of metal contamination especially cadmium. Furthermore, it has been shown that the surface sediment of this area was highly contaminated with toxic metals (Illou 1999; Abdellaoui and Jaballi 2005). In SM station, the diversity of the industrial activities mainly painting, plastic plant as well as the agricultural activities could be a major source of cadmium. However, GS station which is located at 7 km to the south of EH station receive Cd contamination by the marine streams carrying pollution from the northern (SM and EH) to the southern part of the gulf. The relatively high Cd concentrations observed in SK is mainly explained by an important plant transforming crude phosphate and discharging cadmium in its effluent.

When comparing the two organs, the digestive gland seems to accumulate more cadmium than the gills and shows higher MT-like protein concentrations. This could be due to the different physiological roles of the organs. The gills have been noticed to be a storage organ for a short time, whereas absorption through the digestive gland has led to an accumulation of toxic metals for a longer time (Amiard et al. 1989). In the digestive gland, correlations between MTLP and Cd were positive and significant at 99%. In gills the significant and positive correlations between MTLP and Cd were at 95%. These findings suggest that compared to the gills, the digestive gland of *C. glaucum* is more suitable for monitoring metal pollution.

Concerning metal distribution, metal quantities associated with the soluble fraction containing MT-like protein were higher than the insoluble fraction. However, at the most contaminated site (EH), the insoluble fraction of the digestive gland bound much more cadmium than the soluble fraction (containing MT-like protein). Moreover, when concentration of total Cd (S1 + P1) in the digestive gland rose above 1 µg/g wet weight, they coincide with the predominance of the Cd in the insoluble fraction compared to soluble fraction (Fig. 2A). This means that MTLP can bind only a limited fraction of metal and that the relationship between MTLP and metal levels is relevant only

up to a certain degree of metal contamination. In fact, the significance of the insoluble fraction is not well established. However, according to Sokolova et al. (2005) the association of cadmium with the insoluble fraction (containing organelles) could be accompanied by high organelle specific Cd concentration that can be sufficient to cause dysfunction of such metal-sensitive organelle as mitochondria and lysosomes.

Compared to SK station (Fig. 4A) the significant increase in Cd concentrations in the soluble fraction of the digestive gland of cockles from SM was accompanied by a significant increase in MTLP concentrations. It is not the case for cockles from EH in which MTLP concentrations are lower than expected. In fact, the soluble fraction include both low molecular weight (metallothioneins) and high molecular weight compounds (containing enzyme), so cadmium could probably bind to the high molecular proteins in digestive gland of cockles from the more contaminated site. The "spillover" of metals onto high molecular proteins is observed in a number of marine organisms as metallothioneins proteins become saturated (Langston and Zhou 1986; Hamza-Chaffai et al. 1997).

Despite the limited capacity of the detoxication function of MT-like protein in the most contaminated site (EH), result obtained for the other sites indicated the normal cytosolic distribution of Cd which is found in the soluble fraction containing MTLP suggesting the important role of these proteins in metal regulation. Moreover, the relationship between Cd and MTLP was relevant for both digestive gland and gills. Relationship between metallothioneins levels and cadmium concentrations was also proved in a natural population of *Andonta grandis* (Couillard et al. 1993), *Crassostrea gigas* (Mouneyrac et al. 1998) and for the clams *Ruditapes decussatus* collected from the same area (Hamza-Chaffai et al. 2000, 2003). Roesijadi (1992, 1996) has reviewed and suggested that the use of metallothioneins in assessing the status of exposed aquatic invertebrates may be the most suitable with cadmium due to the specificity in the response, the non essential role of cadmium in biological process, and the normally low concentration of Cd in tissues. Bebianno and Machado (1997) have proposed that measurement of metallothioneins concentrations in biomonitors can provide an accurate indication of sublethal environment increases in metal contamination. Moreover, metallothioneins may be useful in predicting metal toxicity in aquatic organisms because cellular toxicity may result after metal binding capacity of metallothioneins is exceeded and associated with the stress response in aquatic organisms (Cattani et al. 1996; Tort et al. 1996).

The two biomarkers of damage malondialdehyde (MDA) and acetylcholinesterase activity (AChE) are not specific to metal contamination as it was mentioned for MT-like protein, but they would represent an integrative response to the impact of multiple toxic effects.

The concentrations of malondialdehyde (MDA), a break down product of the oxidative degradation of cell membrane lipids, increased along the metal gradient and this increase was positively correlated with digestive Cd concentrations. Increased levels of MDA following Cd exposure have been reported in other species of bivalves (Cossu et al. 2000; Giguère et al. 2003).

The comparison of all studied sites, except Kerkannah station, showed that the lipid peroxidation as presented by malondialdehyde levels and MT-like protein concentrations increase in cockles exposed to cadmium contamination. We can, so, hypothesize that cadmium could induce MTLP synthesis and MDA increase. These results are in agreement with previous studies (Bebianno and Serafim 1998; Geret et al. 2002, 2003).

Metallothioneins have a known role in metal uptake, transport, storage and excretion (Roesijadi 1992). These proteins seem also to have a protective role against oxidative stress (Viarengo et al. 2000; Cavaletto et al. 2002) by acting as oxy-radical scavengers and through metal binding/release dynamic mechanisms (Langston et al. 1998). In the present work increasing of MT-like protein detected in digestive gland of metal exposed cockles was not followed by a decreasing of MDA levels. This is could be explained by the fact that cadmium could interact with the ubiquitous sulphydryl group of amino acids, proteins and enzymes. The replacement of an essential metal such as copper (Cu) and zinc (Zn) by non-essential metal such as cadmium would tend to change the conformation of antioxidant enzymes and affect their activity (Hamilton and Mehle 1986).

The high level of MDA and MTLP in cockles from Kerkannah seemed to be unusual because this site had the lowest concentration of cadmium. In addition, the cholinesterase activity measured in the remainder tissues of cockles collected from this site seems to be inhibited compared to these from the reference site (RU). We could then hypothesize that cockles from Kerkannah which appeared not contaminated by cadmium could have been exposed to some other toxic chemicals.

Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme involved in the synaptic transmission of nerve impulses and is inhibited by neurotoxine compounds like orgonophosphate and carbamate. The responsiveness of AChE inhibition to other chemicals such as heavy metals has also been acknowledged (Bocquené et al. 1997; Najimi et al. 1997; Hamza-Chaffai et al. 1998; Guilhermino et al. 1998). According to our study, AChE activity was significantly inhibited in the sites located at the northern part of the gulf (EH, SM and GS) which is often under urban and industrial effluents (inputs include municipal waste water treatment plant

discharge, industrial discharges including those of phosphogypsum treatment, inputs of untreated surface runoff). These inputs bring a vast array of pollutants and among them more trace metals than organophosphorus compounds. Moreover, the frequency and severity of metal contamination in water, sediment and biota in this part of the gulf is well documented (Zairi and Rouis 1999; Illou 1999; Serbaji 2000; Hamza-Chaffai et al. 2000, 2003; Abdellaoui and Jaballi 2005). The inhibiting effect of metals on AChE activities has been widely investigated in clams (Hamza-Chaffai et al. 1998), mussels (Najimi et al. 1997) and in other marine organisms such as fish (Flammarion et al. 1996; Bocquené et al. 1997). Heavy metals and particularly copper have a pronounced preference for sulfur group and may therefore inhibit enzyme by binding to the SH residues of proteins (Viarengo 1989).

As we have chosen calibrated cockles, comparing the condition index can provide information about the health status of cockles and the trophic state of the studied sites. The condition index (CI) also declined significantly in response to increased cadmium exposure. The heavily contaminated cockles EH showed the lowest condition index, supporting the fact that the toxic effect of cadmium may affect the condition index. It is well known that the condition index may vary with food availability and diet quality (Mougraud et al. 2002). CI variations were clearly indicative of changes in tissues mass. Therefore, the relatively high CI values of the cockle from SM and Kr (high contaminated sites) were probably related to the abundant organic matter in water. According to Widdows et al. (1997) the detrimental effects of toxicants on the growth of mussels living in the more polluted inner sites may be partially offset by the positive effects of eutrophication and the higher food/ration levels at sampling site.

From the present study it is apparent that *C. glaucum* can yield a significant level of variation in the different biomarkers presumably as a result of variable levels of contamination and posses the requisites to be used as a bioindicator for metal pollution monitoring programs in the gulf of Gabès. MT-like protein in the digestive gland and in gills of *C. glaucum* can be used as useful biomarkers for metal contamination only if its binding capacity is not exceeded. Nevertheless, in these conditions, the soluble fraction (containing MT-like protein) and the insoluble fraction (containing organelles) should be deeply investigated.

Despite the important implication of this work in the development of biomarkers for heavy metal pollution, research work is still required to understand the mechanisms of toxic effect of metals, and the implication of these biomarkers in contamination and decontamination processes. Further studies, focused on transplanting and caging these organisms at several sites of interest, will prove to be crucial in determining whether cockles *C. glaucum* are capable of being a genuine bioindicator of environmental risk.

Acknowledgments We thank Bouassida M, Lazzez M, Hantati B and Mansour R for their help. Rebai A (Center of Biotechnology of Sfax) is acknowledged for his assistance in statistical analysis. We also thank Ben ftéma S and Kebsi S for their assistance in English revision of the manuscript.

References

Abdellaoui D, Jaballi Y (2005) Etude sédimentologique et géochimique des sédiments marins de la zone côtière de Sfax. Mémoire de projet de fin d'études en géologie d'environnement et d'aménagement. Faculté Des Sciences De Sfax

Amiard JC, Amiard-Triquet C, Ballan-Dufrançais C, Berthet B, Jeantet AY, Martoja R, Truchet M (1989) Study of the bioaccumulation at the molecular, cellular and organism levels of lead and copper transferred to the oyster *Crassostrea gigas* thumbing directly from water or via food. Polish Acad Sci 34:521–529

Amiard JC, Cosson RP (1997) Les métallothionéines. In: Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramad F (eds) Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspect fondamentaux. Masson, Paris, pp 53–66

Arjonilla M, Forja A, Gomez-Parra A (1994) Sediment analysis does not provide a good measure of heavy metal bioavailability to (*Cerastoderma glaucum*) (Mollusca: Bivalvia) in confined coastal ecosystems. Bull Environ Contam Toxicol 52:810–817

Bebianno MJ, Machado LM (1997) Concentrations of metals and metallothioneins in (*Mytilus galloprovincialis*) along the South Coast of Portugal. Mar Pollut Bull 34:666–671

Bebianno MJ, Serafim MA (1998) Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs (*Mytilus gallopronvincialis*) and (*Ruditapes decussates*). Sci Total Environ 214:123–131

Bocquené G, Galgani F (1998) Biological effect of contaminants: cholinesterases inhibition by organophosphate and carbamate compounds, ICES Tech. Mar Environ Sci 22:1–13

Bocquené G., Galgani F, Walker H (1997) Les cholinestérases, Biomarqueurs de neurotoxicité. In: Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (eds) Biomarqueurs en Ecotoxicologie-Aspects Fondamentaux. Masson, Paris, pp 209–240

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254

Carpené E (1993) Metallothionein in marine molluscs. In: Dalling R, Rainbow PS (eds) Ecotoxicoloy of metal in invertebrate. Lewis Publ, Boca Raton, pp 56–72

Cattani O, Serra R, Isani G, Raggi G, Cortesi P, Carpense E (1996) Correlation between metallothionein and energy metabolism in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to cadmium. Comp Biochem Physiol 113:193–199

Cavaletto A, Ghezzi B, Burlando B, Evangelisti V, Ceratto N, Viarengo A (2002) Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus golloprovincialis*. Comp Biochem Physiol 131:447–455

Chouba L, Zamouri-Langar N, El Abed A (1998) Le réseau de surveillance des contaminants nocifs: les métaux lourd dans la chaire de la clovisse. INSTM. Actes des Acquis de recherche agronomique et vétérinaire IRESAT, n°5

Cosson RP (2000) Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives. Cell Mol Biol 46:295–309

Cosson RP, Amiard JC (1998) Utilisation des métallothionéines comme biomarqueurs d'exposition aux métaux. In: Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (eds) Utilisation des Biomarqueurs pour la Surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier, Paris, pp 77–109

Cossu C, Doyotte A, Babut M, Exinger A, Vasseur P (2000) Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, Unito tumidus, in response to different contamination profiles of aquatic sediment. Ecotoxicol Environ Saf 45:106–121

Couillard Y, Campbell PGC, Tessier A (1993) Response of metallothionein concentration in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. Limnol Oceanogr 38:299–313

Ellman GL, Courtney KD, Andreas V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. Biochem Pharmacol 7:88–95

El Mnif-Triqui N (1995) La palourde *Ruditapes decassatus* (Linnee, 1758) des côtes Tunisiennes. Biométrie, reproduction et impact de l'environnement sur la bioaccumulation de métaux traces. Thèse de troisième cycle. Université de Tunis II,Tunisie

Flammarion P, Migeon B, Garric J (1996) Joint effect of copper sulfate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*) EROD and AChE activities. Bull Environ Contam Toxicol 56:440–445

Food and Drug Administration (1993) Guidance Document for Cadmium in Shellfish. Centre for Food Safety and Applied Nutrition: US/FDA, Washington, pp 31

Galgani F, Bocquené G (1989) A methods for routine detection of organophosphates and carbamates in sea water. Environ Technol Lett 10:311–322

Geret F, Serafim A, Barreira L, Bebianno MJ (2002) Effect of cadmium on antioxidant enzyme and lipid peroxidation in the gills of the clam (*Ruditapes decassatus*). Biomarkers 7:242–256

Geret F, Serafim A, Bebianno MJ (2003) Antioxidant enzyme activities, metollothioneins and lipid peroxidation as biomarker in (*Ruditapes decussates*)? Ecotxicol 12:417–426

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 cytosoic ligand and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. Aquat Toxicol 64:185–200

Guilhermino L, Barros B, Silva MC, Soares AMVM (1998) Should the use of inhibition of cholinesterase as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? Biomarkers 3:157–163

Hamilton SJ, Mehrle PM (1986) Metallothionein in fish: review of its importance in assessing stress from metal contamination. Trans Am Fish Soc 115:596–609

Hamza-Chaffai A, Cosson R.P., Amiard-Triquet C, El Abed A (1995) 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 cost: ecotoxicological consequences. Comp Biochem Physiol 111:329–341

Hamza-Chaffai A, Amiard-Triquet C, El Abed A (1997) Metallothionein-Like protein: is it an efficient biomarker of metal contamination? A case study based on fish from the Tunisian coast. Arch Environ Contam Toxicol 33:53–62

Hamza-Chaffai A, Roméo M, Gnassia-Barelli M, El Abed A (1998) Effect on copper and lindane on some biomarkers measured in the clam (*Ruditapes decussatus*). Bull Environ Contam Toxicol 61:397–404

Hamza-Chaffai A, Amiard JC, Pellerin J, Joux L, Berthet B (2000) The potential use of metallothionein in the clam (*Ruditapes decassatus*) 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 marine bivalve *Ruditapes decassatus* from the gulf of Gabès (Tunisia). Environ International 28:609–617

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

Langston WJ, Zhou M (1986) An evaluation of the significance of metal binding proteins in the gastropod, Littorina littorea. Mar Biol 92:505–515

Langston WJ, Bebianno MJ, Burt JR (1998) Metal handling strategies in molluscs. In: Langston WJ, Bebianno MJ (eds) Metal metabolism in aquatic environment. Chapman and Hall, London, pp 219–283

Machreki-Ajmi M (2002) Etude d'une contamination par le cadmium et le plomb chez le mollusque bivalve (*Cerastoderma glaucum*) issus de la région de Sfax: Etude *in situ* et *in vivo*. Diplôme d'études approfondies d'écologie générale. 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 3:529–537

Mouneyrac C, Amiard JC, Amiard-Triquet C (1998) Effect of natural factor (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters (*Crassostrea gigas*) from a polluted estuary. Mar Ecol Prog Ser 162:125–135

Mougraud Y, Martinez E, Geffard A, Andrai B, Stanisière JY, Amiard JC (2002) Metallothionein concentration in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. Biomarker 7:479–490

Najimi S, Bouhaimi A, Daubèze M, Zekhnini A, Pellerin J, Narbonne JF, Moukrim A (1997) Use of acetylcholinestérase in (*Perna perna*) and (*Mytilus galloprovincialis*) as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Marocco). Bull Environ Contam Toxicol 58:901–908

Phillips DJH (1990) Use of macroalgae and invertebrates as monitors of metal levels in estuaries and coastal water. In: Furness RW, Rainbow PS (eds) Heavy Metals in the Marine Environment. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 102–119

Roesijadi G (1992) Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Aquat Toxicol 22:81–114

Roesijadi G (1996) Metallothionein and its role in toxic metal regulation. Comp Biochem Physiol 113:117–123

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). Doctorat de spécialité, Université de Tunis II, Tunisie

Smaoui-Damak W, Hamza Chaffai A, Berthet B, Amiard JC (2003) Preliminary study of the clam (*Ruditapes decassatus*) exposed in situ to metal contamination and originating from the Gulf of Gabès, Tunisia. Bull Environ Contam Toxicol 71:961–970

Smaoui-Damak W, Hamza Chaffai A, Bebianno MJ, Amiard JC (2004) Variation of metallothioneins in gills of the clam (*Ruditapes decassatus*) from the Gulf of Gabès (Tunisia). Comp Biochem Physiol 139:181–188

Sokolova IM, Ringwood AH, Johnson C (2005) Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). Aquat Toxicol 74:218–228

Sunderman FW, Marzouk A, Hopfer SM, Zaharia O, Reid MC (1985) Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rat. Ann Clin Lab Sci 15:229–236

Szefer P, Szefer K (1985) Occurrence of ten metals in (*Mytilus edulis*) L. and (*Cardium glaucum*) from Gdansk Bay. Mar Poll Bull 16:446–450

Szefer P, Wolowcz M (1993) Occurrence of metal in the cockle (Cerastoderma glaucum) from different geographical regions in view of principal component analysis. Mar Poll 64:253–246

Szefer P, Wolowcz M, Kusak A, Deslous Poli JM, Czarnowski WK, Frelek MJ, Berlzunce M-J (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

Tort L, Kargacin B, Torres P, Giralt M, Hidalgo J (1996) The effect of cadmium exposure and stress on plasma cortisol, metallothionein levels and oxidative status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. Comp Biochem Physiol 114:29–34

Viarengo A (1989) Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. In: CRC Reviews in Aquatic Science, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 295–317

Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbari R (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. Mar Environ Reas 44:69–84

Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panfoli I (2000) Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. Cell Mol Biol 46:407–417

Widdows J, Nasci C, Fossato VU (1997) Effect of pollution on the scope for growth of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy. Mar Environ Res 43:69–79

Zairi M, Rouis MJ (1999) Impacts environnementaux du stockage du phosphogypse à Sfax (Tunisie). Bull Lab Ponts Chaussées 219:29–40

RÉSUMÉ

Ce travail consiste à étudier dans une première partie la répartition spatiale du cadmium dans une zone exposée à la pollution ainsi que l'évaluation de l'impact écotoxicologique de cette contamination par l'étude de quelques biomarqueurs tels que les métallothionéines (MTs), le malonedialdéhyde (MDA) et l'acétylcholinéstérase (AChE) au niveau d'un organisme bioindicateur (*Cerastoderma glaucum*). Les principaux résultats obtenus montrent que le site « Zarb El Ain » est largement contaminé par le cadmium et que cette contamination n'est pas stagnante mais elle migre principalement vers le sud par les courants de direction nord-sud. Les variations des teneurs en biomarqueurs étudiés reflètent l'état alarmant de cet écosystème. Une biosurveillance est désormais indispensable. Pour survivre dans de telles conditions, On pouvait se demander si les organismes ont développé des systèmes adaptatifs particuliers tels que «le système métallothionéine ». Nous avons donc entrepris une étude dont le but est de cloner l'ADNc codant pour la MT chez deux espèces largement réparties dans le golfe de Gabès qui sont *Cerastoderma glaucum* et *Ruditapes decussatus*. Contrairement à *R. decussatus*, aucune étude *in vivo* n'a été réalisée sur la coque *C. glaucum* et par conséquent aucune information n'a été disponible concernant les conditions d'induction du gène métallothionèine chez cette espèce. Il était donc nécessaire de déterminer les conditions optimales d'induction du gène MT chez *C. glaucum* avant d'entamer notre étude moléculaire. Dans cette étude préliminaire, les animaux ont été exposés à des concentrations différentes de $CdCl_2$ (50, 75, 100 et 150 µg/l) durant 5, 10, 15 et 20 jours. Les résultats du dosage des MTs, des protéines, du MDA ainsi que le test de stress on stress, ont montré qu'une exposition à 50 µg $CdCl_2$/l durant 15 jours entraine une induction maximale de synthèse des MTs sans trop stresser l'animal. Ces résultats nous ont servis pour réaliser notre étude moléculaire dont le but était de cloner les ADNc codant pour la métallothionéine chez *C. glaucum* et *R. decussatus* afin de pouvoir les utiliser comme sonde pour étudier l'induction du gène MT au niveau des tissus des animaux contaminés et témoins. Deux séquences d'ADNc MT ont été clonées. L'ADNc MT de *R. decussatus* a été utilisée comme sonde à fin d'estimer le niveau de transcription des gènes MT dans les branchies, manteau, muscle adducteur et pied. Les résultats ont prouvé l'induction des gènes MT par le cadmium au niveau des branchies de *C. glaucum* et *R. decussatus* et ont montré que le niveau d'ARNm de MT le plus important a été noté au niveau des branchies des animaux contaminés.

Lors de la dissection de nos échantillons nous avons remarqué la présence de deux phénotypes chez *C. glaucum* : des *C. glaucum* à pied jaune et d'autres à pied orangé. Pour répondre à la question : est ce que cette différence phénotypique est due à une divergence génétique ou pas ? et pour soulever la problématique de ségrégation entre C. *glaucum* et *C. edule* qui a été largement provoquée, une étude génétique a été réalisée. Pour cette raison des outils moléculaires tels que les séquences de 28S, d'ITS1 et de COI ont été utilisés. L'analyse des séquences de 28S de *C. glaucum* et de *C. edule* a montré la présence d'une divergence génétique ce qui justifie leurs appartenance à deux espèces différentes. L'analyse des séquences d'ITS1 et de COI ont permis d'étudier les divergences génétiques intra et interpopulationnelles de *C. glaucum* et *C. edule* et ont surtout montré la présence de deux groupes génétiquement différents au niveau de la population tunisienne de *C. glaucum*.

Mots clés : Cadmium, *Cerastoderma glaucum*, Répartition spatiale, Interpolation, Métallothionéines, Malonedialdéhyde, Acétylcholinéstérase, Stress on Stress, *Ruditapes decussatus*, cDNA, Niveau de transcription, Divergence génétique, ITS1, COI, 28S.