

MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE ET SUPERIEURE

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL

LABORATOIRE D'ECOBIOLOGIE DES MILIEUX
MARINS ET LITTORAUX (EMMAL)



MEMOIRE

En vue de l'obtention du

DIPLÔME DE MASTER RECHERCHE EN ANALYSE DES POPULATIONS DES ESPACES
FAUNIQUE ET HALIEUTIQUE (MFH2)

Spécialité: Analyse des populations des espaces halieutiques

THEME

**Teneur en métallothionéines chez la moule *Perna perna* exposée à
différentes concentrations de Plomb, cadmium et cuivre au golf
d'Annaba « Algérie »**

Présenté Par
BENSEDIRA Elouarda

Jury composé de:

Président : Pr Ouédraogo Georges Anicet

Directeur de mémoire: Pr André T. Kabré

Membre: Dr Pousga Salimata

Maitre de stage: Pr BENSOUILAH Mourad

N°.....-2014/MFH2

juin 2014

MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE ET SUPERIEURE
UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO
INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL **LABORATOIRE D'ECOBIOLOGIE DES MILIEUX**
MARINS ET LITTORAUX (EMMAL)



MEMOIRE

En vue de l'obtention du

DIPLOME DE MASTER RECHERCHE EN ANALYSE DES POPULATIONS DES ESPACES
FAUNIQUE ET HALIEUTIQUE (MFH2)

Spécialité: Analyse des populations des espaces halieutiques

THEME

**Teneur en métallothionéines chez la moule *Perna perna* exposée à
différentes concentrations de Plomb, cadmium et cuivre au golf
d'Annaba « Algérie »**

Présenté Par
BENSEDIRA Elouarda

Jury composé de:

Président : Pr Ouédraogo Georges Anicet

Directeur de mémoire: Pr André T. Kabré

Membre: Dr Pousga Salimata

Maitre de stage: Pr BENSOUILAH Mourad

Avant-propos

Avant-propos

Cette étude, proposée par le directeur du laboratoire d'écobiologie des milieux marins et littoraux (EMMAL), s'inscrit dans le cadre du mémoire de fin d'étude pour l'obtention du Master Recherche en Analyse des populations des espèces halieutiques. Elle a été réalisée sous la conduite de professeur Bensouilah Mourad, directeur de recherche et enseignant à l'Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie; avec la participation des enseignants chercheurs et doctorants.

Elle a pour thème: « Teneur des métallothionéines chez la moule *Perna perna* exposées à différentes concentrations de Plomb, cadmium et cuivre ».

Cette étude a pour objectif l'évaluation de la réponse biochimique de la moule *Perna perna* exposée à diverses doses de plomb, de cadmium et de cuivre à travers le dosage de la métallothionéine « MT », une protéine de faible poids moléculaire, riche en cystéine, complexant fortement les ions des métaux appartenant aux groupes IB et IIB.

Les moules utilisées dans le cadre de cette étude ont été prélevées dans le Golfe d'Annaba puis acheminées au laboratoire où l'expérimentation a été réalisée.

Le temps relativement court, et les moyens modestes dont nous avons disposé ont été un facteur limitant dans l'exploitation de cette ressource biologique ; face à toutes ces contraintes, la démarche adoptée s'est voulue la plus claire possible et nous estimons que nos résultats ne constituent qu'une approche de la réalité.

Nous espérons que l'entreprise d'études complémentaires répondra aux attentes de l'équipe de chercheurs en écotoxicologie du laboratoire EMMAL et fournira des éléments de réponses nécessaires pour une meilleure connaissance de la Métallothionéine et des effets des métaux lourds étudiés « Cuivre, Plomb et Cadmium » sur la moule *Perna perna* et l'exploitation de cet organisme dans le programme de biosurveillance du Golfe d'Annaba.

NB: la proposition de recherche doit plus s'orienter vers des concepts scientifiques tout en les appliquant à des réalités pratiques afin de permettre de mieux contribuer à la science.

Remerciements

Remerciements

A l'issue de ce travail, nous voulons témoigner ici notre totale gratitude à plusieurs personnes et institutions. Ce sont:

- ✦ L'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) qui m'a octroyé une allocation pour le financement de ce Master.
- ✦ L'Institut du Développement Rural (IDR) de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso (UPB) notamment le Directeur, le corps professoral et les enseignants chercheurs qui nous ont dispensé les cours.
- ✦ Le Directeur du laboratoire EMMAL qui m'a accueilli au sein de la structure de recherche qu'il dirige.

Mes remerciements particuliers vont à l'endroit de mes encadreurs qui m'ont témoigné beaucoup de leur attention et leur disponibilité. Il s'agit de :

- Pr. KABRE André T., Enseignant- Chercheur à l'IDR, Responsable de ce master de FAOD. Directeur du mémoire ;
- Pr BENSOUILAH Mourad, directeur du laboratoire EMMAL, enseignant à l'Université Badji Mokhtar-Annaba, Algérie ; encadreur du mémoire ;
- Dr. KADRI Skander, Chargé de Recherche et enseignant à l'Université Badji Mokhtar-Annaba pour sa participation effective à l'échantillonnage.
- Dr BAROUR Choukri et Dr KOUACHI Nouha enseignante au département de biologie à l'université de Souk Ahras (Algérie) pour leur aide au traitement statistique des données.
- Au membre de jury qui ont accepté de juger et de me fournir leur conseil et leur précieux temps :
 - **Pr Ouédraogo Georges Anicet (Président)**
 - **Dr Pousga Salimata (Membre)**

Mes remerciements à :

- KERDOUSSI Asma, doctorante de l'EMMAL, pour sa précieuse aide dans la réalisation de ce travail ;

Je remercie **ma mère et mon frère** pour leur soutien indéfectible;

Je remercie aussi tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à ce travail.

Sommaire

Sommaire

	Introduction.....	01
I.	Matériels et méthodes.....	04
I.1.	Présentation de la zone de prélèvement.....	04
I.2.	Identification, biologie et morphologie du modèle biologique	06
I.2.1.	Morpho anatomie de <i>Perna perna</i>	06
I.2.2.	Position systématique de la mole <i>Perna perna</i>	07
I.2.2	Position taxonomique des Mollusque	08
I.2.3.	Distribution géographique	08
I.2.4.	Ecologie	08
I.3.	Récolte et traitement des bivalves	09
I.3.1.	Matériels utilisés	09
I.3.2.	Récolte	15
I.3.3.	Protocole de traitement	15
I.3.4.	Dosage des métallothionéines.....	16
I.4.	Traitement statistique	17
II.	Résultat	18
II.1.	Effet du cuivre sur les teneurs en métallothionéines de la moule.....	18
II.1.1.	Moules provenant du site.	18
II.1.2.	Moules témoins.....	19
II.1.3.	Moules exposées à la faible dose de cuivre.....	19
II.1.4.	Moules exposées à la dose intermédiaire de cuivre.....	19
II.1.5.	Moules exposées à la forte dose de cuivre	19
II.1.6.	Analyse statistique des données.....	20
II.1.6.1.	Cuivre et glandes	20
II.1.6.2.	Cuivre et branchies	22
II.1.6.3.	Cuivre et corps	22

II.2.	Effet du cadmium sur les teneurs en métallothionéines de la moule ...	23
II.2.1.	Moules provenant du site	23
II.2.2.	Moules témoins.	23
II.2.3.	Moules exposées à la faible dose de cadmium	24
II.2.4.	Moules exposées à la dose intermédiaire de cadmium	24
II.2.5.	Moules exposées à la forte dose de cadmium	24
II.2.6.	Analyse statistique des données.....	25
II.2.6.1.	Cadmium et glandes	25
II.2.6.2.	Cadmium et branchies	26
II.2.6.3.	Cadmium et corps	26
II.3.	Effet du plomb sur les teneurs en métallothionéines de la moule	26
II.3.1.	Moules provenant du site	27
II.3.2.	Moules témoins	27
II.3.3.	Moules exposées à la faible dose de plomb	27
II.3.4.	Moules exposées à la dose intermédiaire de plomb	28
II.3.5.	Moules exposées à la forte dose de plomb	28
II.3.6.	Analyse statistique des données.....	29
II.3.6.1.	Plomb et glandes	29
II.3.6.2.	Plomb et branchies	32
II.3.6.3.	Plomb et corps	32
III.	Discussion	33
IV.	Conclusion	36
V.	Références bibliographiques	38
VI.	Annexe.....	49

Liste des Sigles
et
Abréviations

Liste des Sigles et Abréviations:

AUF: Agence Universitaire Francophone

FAO: Organisation des nations unies pour l'agriculture et l'alimentation

IDR: Institut du Développement Rural

UE: Union Européenne

UNESCO: Organisation des Nations unies pour l'éducation, la science et la culture

UPB: Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso

Gd: Glande digestive

Br; branchie

C: corps

MT: la métallothionéine

Pb: Plomb

Cd: Cadmium

Cu: Cuivre

EMMAL: Laboratoire d'écobiologie des milieux marins et littoraux

T°C: Température (en degré Celsius)

h: Heure

mn: Minute

Fig. : Figure

Tab: Tableau

et *al:* Et collaborateurs

PbCl₂: Chlorure de plomb

PbN₂ : Nitrate de plomb

CuSO₄ : Chlorure de cuivre

CdSO₄: Sulfate de cadmium

CdCl₂: Chlorure de cadmium

DTNB: {5, 5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acide benzoic)}

Mg: milligramme

Nmol: nanomol

Listes des :
Figures & Tableaux
& Photos

Listes des Figures et des Tableaux et des Photos:

I / Liste des figures:

N° Fig	Nomination	Page
Fig1	Le Golfe d'Annaba : (a) situation géographique ; (b) Image satellitaire montrant le golfe et le Cap de Garde (Google.2012 modifiée)	5
Fig 2	<i>Perna perna (linnaeus, 1758)</i> : face latérale (à gauche) et face ventrale (à droite)	6
Fig 3	Structure et anatomie d'une moule.	7
Fig 4	Teneurs médianes en métallothionéines (MTs) relevées chez des moules exposées, pendant 7j, à différentes concentrations de cuivre	20
Fig 5	Teneurs médianes en métallothionéines (MTs) relevées chez des moules exposées, pendant 7j, à différentes concentrations de cadmium	25
Fig 6	Teneurs médianes en métallothionéines (MTs) relevées chez des moules exposées, pendant 7j, à différentes concentrations de plomb	29

II/ Liste des Tableaux

N° Tab	Nomination	Page
Tab1	Teneurs médianes en métallothionéines (MTs) relevées chez des moules exposées pendant 7j à différentes concentrations de cuivre	18
Tab 2	Comparaison des teneurs en MTs des glandes exposées aux différentes doses de cuivre (D1, D2, D3) avec celles des glandes de Témoin (T), et même celles du témoin avec les glandes de moules avant traitement (A)	21
Tab 3	Comparaison des teneurs en MTs des glandes de moules exposées aux différentes doses de cuivre (D1, D2, D3) avec celles des glandes avant traitement (A),	21
Tab 4	Teneurs médianes en métallothionéines (MTs) en nmol/ml, relevées chez des moules exposées pendant 7j à différentes concentrations de cadmium	23
Tab 5	Teneurs médianes en métallothionéines (MTs) relevées chez des moules exposées pendant 6 jours à différentes concentrations de plomb	27
Tab6	Comparaison des teneurs en MTs des glandes exposées aux différentes doses de plomb (D1, D2, D3) avec celles des glandes de Témoin (T), et même celles du témoin avec les glandes de moules avant traitement (A)	30
Tab 7	Comparaison des teneurs en MTs des glandes de moules exposées aux différentes doses de cuivre (D1, D2, D3) avec celles des glandes avant traitement (A) et celles du témoin avec les glandes de moules avant traitement (A)	30
Tab 8	Comparaison des teneurs en MTs des glandes de moules témoins (T) avec celles des moules exposées aux différentes doses de plomb (D1, D2, D3) et avec celles des glandes de moules avant traitement (A)	31
Tab 9	Comparaison des teneurs en MTs des glandes de moules fraîchement cueillies (A) avec celles des moules exposées aux différentes doses de plomb (D1, D2, D3) et avec celles des glandes de moules témoins (T)	31

III / Liste des photos:

N° Phot	Nomination	Page
Phot 1	Balance de précision 10^{-6} gr	11
Phot 2	Centrifugeuse	12
Phot 3	Spectrophotomètre	12
Phot 4	Plaque chauffante ou agitateur	13
Phot 5	pH mètre	13
Phot 6	Vortex	14
Phot 7	électrophorèse	14
Phot 8	POLY TRON PT 2100	14

Résumé

Résumé:

Cette étude a pour objectifs de déterminer la réponse biochimique de la moule exposée à différentes concentrations de cuivre (10; 15 et 30 μ g de Cu/l), de plomb (0,25; 0,5 et 1 μ g de Pb/l) et de cadmium (50; 100 et 200 μ g de Cd/l); pour cela nous avons suivi l'évolution des teneurs en métallothionéines dans 3 organes différents de la moule *Perna perna* (la glande digestive, les branchies et le reste du corps).

Les résultats de cette expérimentation montrent que les différentes doses de plomb et de cuivre n'ont pas d'effet significatif sur l'induction de la métallothionéine au niveau des branchies et du corps des moules traitées; mais en revanche, un effet significatif est décelé au niveau de la glande de ces mêmes moules. Chez les moules exposées à différentes doses de cadmium, nous notons l'absence d'effet significatif sur l'induction de la métallothionéine au niveau des 3 organes étudiés (glandes, branchies et corps de moules).

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude mériteraient d'être complétés par la mise en place d'un protocole expérimental complémentaire.

Mots clés : branchies; glande digestive; corps; moule *Perna perna*; cadmium ; cuivre ; plomb ; métallothionéine ;

Abstract:

This study aims to determine the biochemical response of the mussel exposed to different concentrations of copper (10, 15 and 30 μ g Cu / L), lead (0.25, 0.5 and 1 .mu.g Pb / l) and cadmium (50; 100 and 200 mg of Cd / l); for this we followed the evolution of the levels of metallothionein in 3 different organs of the mussel *Perna perna* (digestive gland, gills and the rest of the body).

The results of this experiment show that the different doses of lead and copper have no significant effect on induction of metallothionein in the gills and the body of the treated mussels; but on the other hand, a significant effect is detected at the gland of the same mussels. In mussels exposed to different doses of cadmium, we note the lack of significant effect on induction of metallothionein in the 3 organs studied (glands, gills and body mussel).

The results obtained in this study deserve to be complemented by the establishment of a complementary experimental protocol.

Keywords: gills; digestive gland; body; mussel *Perna perna*; cadmium ; copper ; lead ; metallothionein

Introduction

Introduction

L'introduction et l'accumulation des polluants dans le milieu naturel constituent une préoccupation majeure dans la surveillance de l'environnement du fait que celui-ci subit en permanence des séries de contraintes liées aux activités humaines agricoles, urbaines et industrielles. Alors que de nombreuses molécules organiques peuvent être dégradées, les métaux lourds ne le sont pas et leur concentration augmente régulièrement dans les sols et les eaux.

Pour les mers fermées, les menaces sont inversement proportionnelles à leur dimension (Lacaze et Ramade, 1993), car leurs surfaces et leurs volumes sont limités et les brassages par les courants y sont faibles (Arrignon, 1991). Le milieu marin méditerranéen est particulièrement exposé au déversement de déchets agricoles, de particules en suspension dans l'air et d'eaux de ruissellement chargées d'agents pathogènes, de métaux lourds, de matières organiques polluantes, d'huiles et de substances radioactives, (MeHSIP, 2008), dont les origines sont les activités industrielles, les transports maritimes (30% du trafic maritime mondial) et les activités domestiques avec des rejets en mer estimés à 6.10^5 tonnes chaque année, soit l'équivalent de 30 catastrophes de type "Erika" (Gallini, 2008).

Le golfe d'Annaba connaît au même titre que le reste du littoral Algérien, les mêmes problèmes environnementaux; Il est exposé aux risques des différents types de pollutions d'origine anthropique qui ont un impact sur les organismes qui y vivent et sur l'homme.

En raison de leur capacité de filtration et d'accumulation importante des particules et polluants du milieu, les moules ont été retenues comme bio-indicateur de la contamination, par excellence (Jorgensen, 1960). La moule est une espèce modèle en écophysiologie ; Compte tenu de son mode de vie sédentaire et de son mode de nutrition par filtration, la moule a été retenue

comme modèle biologique dans de nombreux programmes de biosurveillance, tel que le « Mussel Watch » (Goldberg et al., 1978), (Goldberg et al., 2000) et le Réseau National d'observation (RNO) (Claisse et al., 1992), développés pour surveiller la qualité des eaux côtières.

Cette espèce est largement répandue dans le monde puisqu'on la rencontre sur les côtes Est et Ouest de l'Atlantique tropical et subtropical : Mauritanie, Sénégal, Congo, Angola, Amérique du Sud (Antilles, Guyane, Brésil) et sur les bords de la Méditerranée (côtes d'Afrique du Nord : Tunisie, Maroc, Algérie).

L'étude de la biologie de ces bivalves est utile à plus d'un titre du fait qu'elle représente le reflet d'une réponse plus globale de l'organisme et rendrait mieux compte des effets de la contamination sur l'organisme et potentiellement sur la population (Amiard et Amiard-Triquet, 2008).

La présente étude concerne une expérimentation au laboratoire. Le cuivre a été choisi comme modèle de métal car ses propriétés chimiques sont particulièrement intéressantes du fait qu'il participe à des cycles d'oxydoréductions dans la cellule, le cadmium étant donné qu'il possède la capacité de traverser les barrières biologiques, sa toxicité est attribuée principalement à la perturbation qu'il engendre en se substituant aux métaux essentiels tels que le zinc, le cuivre et le calcium.

Pour le plomb des études récentes, ont montré qu'il inhibe l'activité des enzymes impliquées dans le stress oxydatif (glutathione peroxydase, catalase et superoxyde dismutase) (Bolin *et al.*, 2006; Ercal *et al.*, 2001). D'autres études *in vitro* ont montré l'augmentation de la production des radicaux libres après traitement avec le Plomb inorganiques (Aykin-Burns *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 2003).

Cette étude a pour objectif l'évaluation de la réponse biochimique de la moule *Perna perna* exposée à diverses doses de plomb, de cadmium et de cuivre à travers le dosage de la métallothionéine « MT », une protéine de faible poids

moléculaire, riche en cystéine, complexant fortement les ions des métaux appartenant aux groupes IB et IIB.

I. Matériels

et

Méthodes

I. Matériels et Méthodes:

I.1 Présentation de la zone de prélèvement :

Le Golfe d'Annaba est situé dans le littoral Est Algérien ; il est limité à l'Est par le Cap Rosa ($8^{\circ} 15' E 36^{\circ} 58'N$) et à l'Ouest par le Cap de Garde ($57^{\circ} 16'E$ et $36^{\circ} 58'N$). La distance séparant les deux caps est d'environ 21.5 milles (40Km) avec une profondeur maximale des eaux de l'ordre de 65m. Le plateau continental est accidenté et nettement restreint au nord du Cap de Garde (4.5 milles), puis s'élargit dans le golfe jusqu'à 1405 milles (27 km) pour se rétrécir légèrement à l'Est au voisinage du Cap Rosa (Vaissaire et Fredj, 1963) (fig. 1).

Du point de vue sédimentologique, le fond marin débute, dans le secteur Ouest, par du sable fin qui se mélange, dans le secteur Est, avec de la vase fine. Une chaîne d'herbiers de posidonies, installées sur des substrats rocheux qui se continuent par des vases terrigènes molles mélangées à du sable ou des débris coquilliers (Maurin, 1961).

La température varie entre $16^{\circ}C$ en hiver et $28.8^{\circ}C$ en été avec une amplitude de $12.8^{\circ}C$ (Frehi, 1998) ; la température joue un rôle important dans les variations de densité de l'eau. Ounissi et al. (1998) rapportent que l'écart de la température, entre l'eau de surface et celle se trouvant à 50m, dépasse $4^{\circ}C$; quant à la salinité, la différence entre l'eau de surface et celles des profondeurs, n'excède pas 1‰.

Les moules utilisées dans le cadre de cette étude ont été prélevées au niveau du Cap de Garde; le choix de ce site est motivé par le fait que ce dernier est supposé n'être exposée à aucune source de pollution du fait de sa localisation assez éloignée des divers rejets, à l'exception de la présence de quelques habitations, non reliées au réseau d'assainissement ainsi que son accessibilité en saison estivale aux baigneurs, pêcheurs ... (fig.1).



Figure 1: Le Golfe d'Annaba: (a) situation géographique; (b) Image satellitaire montrant le golfe et le Cap de Garde (Google.2012 modifiée)

I.2 Identification, biologie et morphologie du modèle biologique:

I.2.1 Morpho anatomie de *Perna perna*

La moule africaine *Perna perna* (Lamarck, 1758) est un mollusque bivalve de forme allongée qui possède une charnière munie d'une ou deux dents; fréquemment une dans la valve gauche et deux dans la valve droite (fig. 3).

Les muscles rétracteurs du pied et du byssus forment une empreinte médiodorsale sur la coquille; le muscle rétracteur postérieur du byssus a une empreinte bien visible et adjacente à celle de l'adducteur postérieur. L'intérieur des valves est nacré, blanc rosé.

En méditerranée la taille maximale des moules est de 90mm ; quant à la taille moyenne, elle varie de 50 à 60mm (Fisher *et al.*, 1987). Elle peut atteindre une longueur maximale de 18cm.

La couleur du manteau permet de distinguer les deux sexes: chez les mâles, la couleur est blanchâtre et chez les femelles, elle est rose saumon à orange. (fig. 2 et 3)



Figure 2: *Perna perna* (Linnaeus, 1758) : face latérale (à gauche) et face ventrale (à droite)

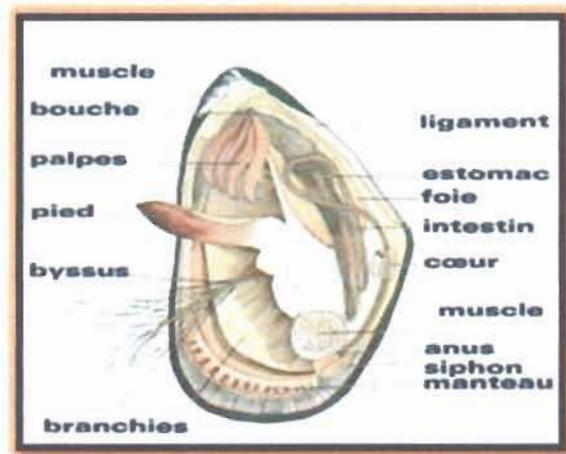


Figure 3: Structure et anatomie d'une moule.

Elle se distingue de *Mytilus galloprovincialis* par la coloration verte, mélangé de brun, de la face externe de ses valves (au lieu de brun foncé chez *M. galloprovincialis*), par la coloration blanc jaunâtre de la face interne des valves (au lieu de bleuté à presque noir chez *M. galloprovincialis*), par la séparation d'une des trois empreintes musculaires (au lieu que les trois empreintes soient contiguës chez *M. galloprovincialis*) et enfin par sa charnière à une seule dent sur chaque valve (au lieu de trois dents sur chaque valve chez *M. galloprovincialis*) (Abada-Boudjema, 1996).

I.2.2 Position systématique de la moule *Perna perna* :

Embranchement:	Mollusques
Classe:	Bivalves
Sous-classe:	Ptériomorpha (Beurlen, 1944)
Ordre:	Mytiloida (Ferussac, 1822)
Famille:	Mytilidae (Rafinesque, 1815)
Genre:	<i>Perna</i> (Philipsson, 1788)

Espèce: *perna* (Linnaeus, 1758).

I.2.2 Composition taxonomique des mollusques

Classe	Famille	Espèce
Bivalves	Mytilidae (Rafinesque, 1815)	<i>Perna perna</i> (Philipsson, 1788 Linnaeus, 1758).

I.2.3 Distribution géographique:

Perna perna est une espèce largement répandue dans le monde puisqu'on la rencontre sur les côtes Est et Ouest de l'Atlantique tropical et subtropical, en Amérique du Sud et sur les bords de la Méditerranée (Afrique du Nord: Algérie, Tunisie, Maroc). Selon certains auteurs, elle fréquenterait le même biotope que l'autre espèce de moule *Mytilus galloprovincialis* (Abada-Boudjema et Dauvin, 1995; Abada-Boudjema, 1996).

I.2.4 Ecologie:

La moule *Perna perna* est rencontrée sur les substrats durs de l'étage infralittoral et jusqu'à 100m de profondeur. Elle est largement rencontrée dans les eaux saumâtres des lagunes côtières. Selon Lubet et Chappuis, (1966), c'est une espèce qui se caractérise par une forte tolérance vis-à-vis des conditions du milieu ; elle est capable de supporter des températures de 13°C en hiver et entre 27 et 28°C en été et des salinités comprises entre 7 et 40 ‰. Elle résiste à l'émersion, pendant plus de 12 jours et elle est aussi capable de résister à des modifications du métabolisme, à l'anoxie et l'hypercapnie.

Les moules disposent d'un système digestif, d'un système circulatoire ouvert, d'organes reproducteurs et d'un système nerveux élémentaire.

I.3 Récolte et traitement des bivalves :

La récolte était faite à la main par un plongeur, les bivalves (les moules) étaient prises dans une glacière jusqu'au laboratoire (EMMAL).

I.3.1. Matériel utilisé : Le matériel utilisé pour cette expérience est composé de :

A/ Matériel pour dissection :

✓ **Une trousse à dissection complète comprenant :** composée de (1 paire de ciseaux forts embouts pointu/arrondi ou pointu/pointu (selon disponibilité), 1 paire de ciseaux fins 11cm embouts pointu/pointu, 1 pince Dumont n°5 ultra fine, 1 pince fine courbe, 1 pince forte, 1 manche de scalpel, sonde cannelée, 3 lames de scalpel stériles).

✓ **Verrerie :** composée de (bêcher, boîte de pétrie, tube à essai, pipette graduée, erlenmeyer, flacon-pilulier, ...)

B/ Matériels utilisés à la métalothionéine :

✓ **Une balance électronique (Photo 1)** qui assure une meilleure performance de pesage et fonctionnement par écran tactile intuitif pour des résultats rapides et fiables dans tous les espaces de travail Précision d'affichage : $1/10^6$ mg à 10 mg. Pour effectuer le pesage des organes (les branchies, les glandes digestives et le corps) et des produits utilisés comme ARN et métaux lourds ;

✓ **Une centrifugeuse photo 2 : Centrifugeuse 2-16P / 2-16KL/KHL Sigma** Pour la purification et la remise en suspension de la métallothionéines et Centrifuger l'homogénat des différents composants des expériences, pour la séparation du composant de cet homogénat et la récupération des surnageant ou du

culot ; un poids pendant un temps donné à une température donnée mais par précision (g/min/ °C)

a-Centrifuger l'homogénat à 30 000g pendant 20minutes à 4°C.

b- Centrifuger à 6000g pendant 10minutes à 4°C

c- la séparation des composants : culot, surnageant,...

✓ **Un spectrophotomètre (Photo 3) :** Pour déterminer la densité optique des échantillons préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de la substance à étudier et analyse l'énergie lumineuse réfléchié ou transmise d'une molécule, possède un système qui sépare les différentes longueurs d'onde d'un faisceau lumineux, Dans notre étude, on a fait une analyse spectrophotométrique de la métallothionéines ; Pour La lecture de la densité optique à une longueur d'onde 412nm. La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution;

✓ **Plaque chauffante ou agitateur (photo 4) :** pour réchauffer le produit à la température demander.

✓ **pH mètre (photo 5) :** mesure du Ph des produits utilisés.

✓ **Vortex (photo 6) :** Mélanger et Agiter au vortex pendant quelque secondes, jusqu'à la remise en suspension complète de l'échantillon.

✓ **électrophorèse (photo7) :** agitation jusqu'au la remise en suspension complète de l'échantillon.

✓ **POLY TRON PT 2100 (photo 8) :** Agiter au vortex pendant quelque secondes, jusqu'à la remise en suspension complète de l'échantillon.

C/ les produits chimiques suivants :

✓ Éthanol ,

✓ Chloroforme,

- ✓ ARN,
- ✓ HCl,
- ✓ Chloroforme,
- ✓ NaCl,
- ✓ EDTA,
- ✓ Réactif d'Ellman,

- ✓ Nitrates de Plomb,
- ✓ Sulfates de Cuivre,
- ✓ Sulfates de Cadmium

D/ Produits biologiques:

- ✓ la moule *Perna perna*
- ✓ ARN

E/ Photos des matériels utilisés :

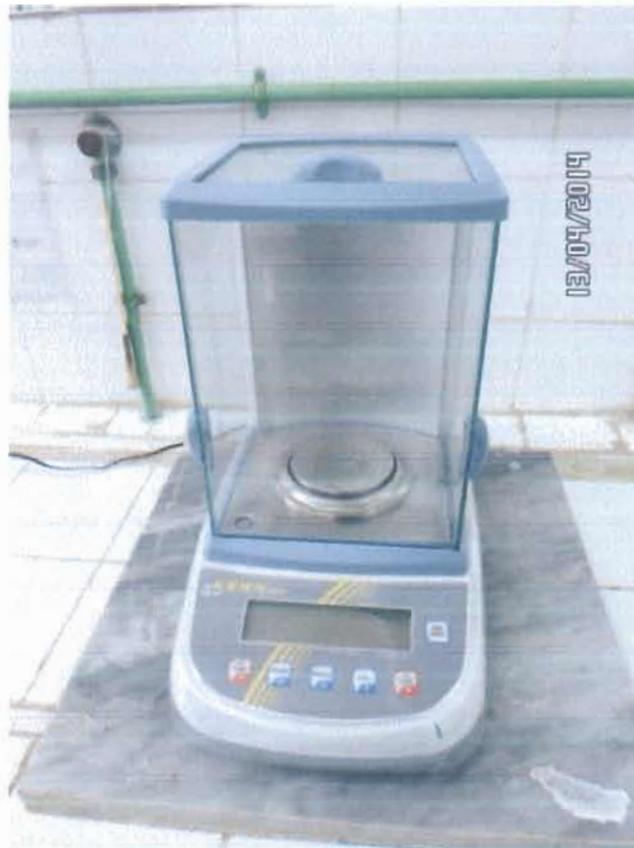


Photo 1: Balance de précision 10^{-6} gr



Photo 2: Centrifugeuse



Photo 3 : Spectrophotomètre



Photo 4 : Plaque chauffante ou agitateur



photo 5 : pH mètre



Photo 6 : Vortex

Photo 7 : électrophorèse



Photo 8: POLY TRON PT 2100

I.3.2 Récolte:

L'échantillonnage est réalisé au niveau du Cap de garde. La récolte de la moule *Perna perna* est effectuée à la main; les spécimens récoltés (plus d'une centaine) sont transportés dans un sac -contenant de l'eau provenant du site- jusqu'au laboratoire pour être répartis sur dix (10) bacs à raison de 10 individus/bac; chaque bac contient quatre (4) litres d'eau de mer qu'il faut renouveler toutes les 48h pendant une durée de 6 jours (le temps que dure l'expérience).

I.3.3 Protocole de traitement:

Après une durée d'acclimatation de 72h, les lots de bivalves sont exposés à différentes concentrations:

- de nitrates de Plomb : une faible dose de l'ordre de 0,25 µg de Pb/l, une dose intermédiaire de l'ordre de 0,5 µg de Pb/l et une forte dose de l'ordre de 1µg de Pb/l.
- de sulfates de cuivre : une première dose de 10µg de Cu/l, une deuxième dose de 15 de Cu/l et une troisième dose de 30µg de Cu/l ;
- de sulfates de cadmium aux doses de 50µg de Cd/l (la plus faible), de 100 µg de Cd/l (dose intermédiaire) et de 200µg de Cd/l (dose élevée) ;
- Un bac a servi comme témoin de l'expérience de contamination; les moules de ce bac n'ont pas été exposées aux doses de plomb; mais l'eau du bac a été changée toutes les 48h.
- Dès leur arrivée au laboratoire, certaines moules (5 individus) ont servi au dosage des métallothionéines; Les teneurs enregistrées représenteront le niveau de métallothionéines contenu dans des moules prélevées dans leur milieu naturel.

Après les six jours d'exposition aux différents métaux lourds, nous avons prélevé 5 individus de chaque bac que nous avons disséqué afin de prélever les branchies, la glande digestive et le corps ; ce dernier est nommé ainsi du fait qu'il comporte le manteau, le pied, la masse viscérale, les palpes labiaux, les reins, le cœur et les muscles.

Remarque: Afin de minimiser l'influence de la matière particulaire ingérée sur le contenu en contaminant du corps (Hare *et al.*, 1989), les contenus des tractus digestifs sont évacués par un jet d'eau désionisée appliqué aux ouvertures.

I.3.4 Dosage des métallothionéines :

Les métallothionéines sont des protéines solubles trouvées dans le cytosol (Cherian et Goyer, 1978). Elles ont un taux de renouvellement rapide dans les tissus et peuvent être accumulées en grandes quantités dans les lysosomes tertiaires. Ces lysosomes sont des vésicules membranaires à temps de vie biologique variable et sont reconnus dans les tissus sous forme de granules riches en métaux. La séquestration des éléments trace accumulés est d'une importance majeure dans le mécanisme de détoxification. Ces métalloprotéines riches en groupes sulfhydriles fixent principalement le zinc, le cuivre, le cadmium, le mercure et le plomb (Bouquegneaux et Noël-Lambot, 1978; Kohler et Riisgard, 1982; Depledge et Rainbow, 1990).

La méthode de dosage des métallothionéines que nous utilisons dans le cadre de ce travail est la colorimétrie.

✦ **Principe:** 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).

I.4. Traitement statistique

Le traitement statistique de l'ensemble des données obtenues a nécessité l'application de plusieurs tests (tableur Excel, test de Chi deux, analyse de variance (ANOVA), Kruskal Wallis; les tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel *R.3.0.3*

II. Résultats

II. Résultats

II.1 Effet du cuivre sur les teneurs en métallothionéines de la moule :

Les résultats du dosage des métallothionéines chez les moules traitées au cuivre sont consignés dans le tableau 1 ; Les données obtenues montrent des différences assez nettes d'un lot à l'autre.

Tableau 1: Teneurs médianes en métallothionéines (MTs) relevées chez des moules exposées pendant 7j à différentes concentrations de cuivre

Lots de moules	Teneurs en MTs (nmol/ml)		
	Glande	Branchies	Corps
Provenant du site (A)	2,01979995	1,06889757	1,11748382
Témoins (non traitées) (T)	6,35785825	1,41594223	0,4164536
Exposées à 10 µg de cuivre/L (D3)	0,38869002	0,54138968	5,9969318
Exposées à 15 µg de cuivre /L (D2)	0,33316288	0,97172506	1,05501578
Exposées à 30 µg de cuivre /L (D1)	1,45758759	1,54087831	0,65244397

A: moule provenant du site; **T:** moule témoin; **D3:** 10 µg de cuivre/L;

D2: 15 µg de cuivre /L ; **D1:** 30 µg de cuivre /L

II.1.1 Moules provenant du site

Chez le lot de moules provenant directement du site, c'est la glande qui montre les teneurs en MTs les plus élevées; elles font le double de celles relevées dans les branchies et le corps.

II.1.2 Moules témoins

Chez les moules du lot témoin, c'est toujours la glande qui montre les teneurs en MTs les plus élevées; les valeurs relevées sont 4 et 12 fois celles notées dans les branchies et le corps respectivement.

II.1.3 Moules exposées à la faible dose de cuivre

Chez le lot de moules exposées à la plus faible dose de cuivre, c'est le corps qui présente la plus forte teneur en MTs ; cette valeur représente 12 fois celle notée chez le témoin pour le même organe. Au niveau branchial, la teneur en MTs baisse de 62% par rapport à celle relevée chez le témoin. Au niveau de la glande, nous notons une baisse très importante de la teneur en MTs chez le lot traité par rapport au lot témoin (le 1/16^{ème} de la teneur en MTs enregistrée chez le témoin).

II.1.4 Moules exposées à la dose intermédiaire de cuivre

Chez le lot de moules exposées à la dose intermédiaire (15 µg de cuivre/L), les teneurs en MTs montrent une baisse par rapport à celles relevées dans le lot de moules exposées à 10µg de cuivre/L. Nous notons, par ailleurs, qu'à cette dose la teneur en MTs atteint le 1/5^{ème} de la valeur relevée dans la glande de moules exposées à la faible dose ; au niveau des branchies, la teneur en MTs baisse de 30% par rapport à celle relevée chez les moules témoins et celles traitées à la dose de 10µg/L. Il est toutefois noté une légère hausse de la teneur en MTs dans le corps par rapport à la valeur enregistrée chez les moules exposées à la faible dose.

II.1.5 Moules exposées à la forte dose de cuivre

A forte dose, les teneurs en MTs relevées dans les glandes ne montrent pas de grosses différences avec celles du lot de moules exposées à la dose intermédiaire. Au niveau des branchies les teneurs en MTs baissent de moitié par rapport à celle

relevées chez les moules exposées à la dose intermédiaire. Mais c'est en revanche, dans le corps que la teneur en MTs est la plus élevée; elle représente 6 fois celle relevée dans le corps des moules exposées à la dose intermédiaire.

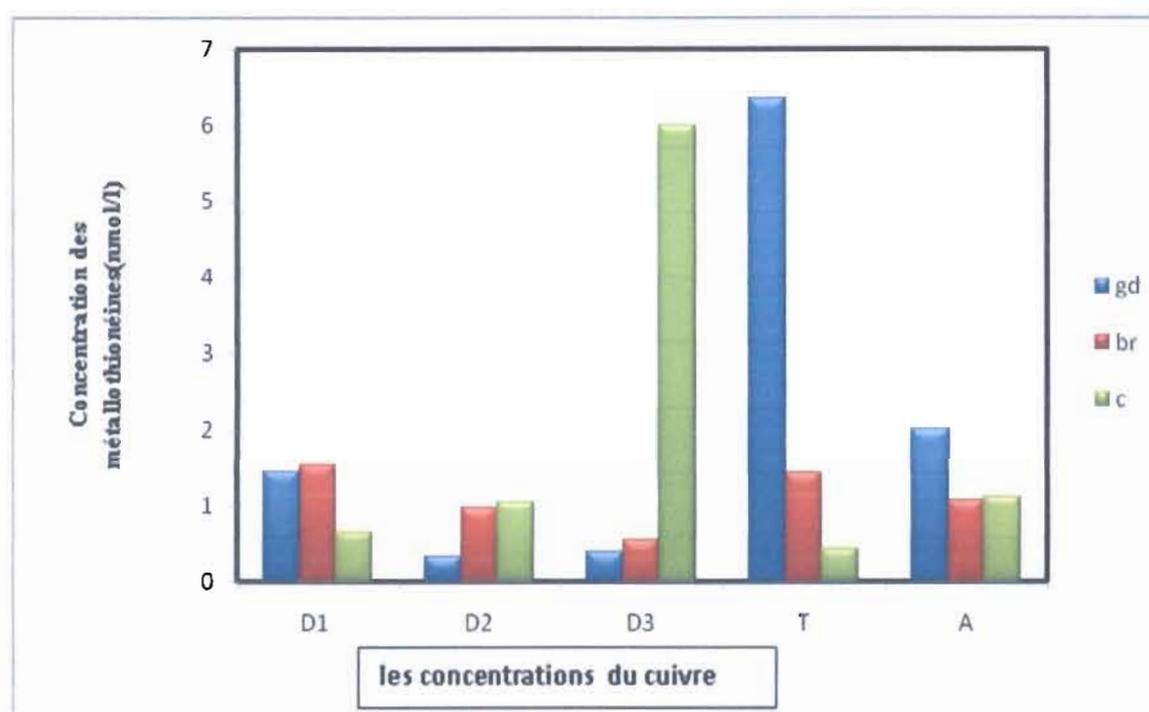


Figure 4: Teneurs médianes en métallothionéines (MTs) relevées chez des moules exposées, pendant 7j, à différentes concentrations de cuivre

II.1.6 Analyse statistique des données:

II.1.6-1 Cuivre et glandes:

L'application du test de Kruskal-Wallis sur les teneurs en MTs des glandes exposées aux différentes doses de cuivre montre une différence significative (effet sur le rang « le rang étant la médiane des teneurs »). *Les glandes exposées aux différentes doses de cuivre d'après Kruskal-Wallis chi-squared (10.3429, df = 4, p-value = 0.03503).

Selon le tests de Dunnett: «Frank Konietzschke (2012). N par comp = reference »

Tableau 2 : Comparaison des teneurs en MTs des glandes exposées aux différentes doses de cuivre (D1, D2, D3) avec celles des glandes de Témoin (T), et même celles du témoin avec les glandes de moules avant traitement (A)

	comparaison	Lower (plus bas ou inférieur)	Intervalle de différence	Valeur du test	p- Value
1	P (T, A)	-0.001	0.003	-590.424762	0 (S)
2	P (T, D1)	-0.280	0.503	-2.474874	0.5225689
3	P (T, D2)	-0.001	0.003	-590.424762	0 (S)
4	P (T, D3)	-0.001	0.003	-590.424762	0 (S)

P (T, A): comparaison entre les moule T (témoin) et les moule A (avant traitement); **P (T, D1):** comparaison entre les moule T (témoin) et les moule D1(**D1: 30 μg de cuivre /L**); **P (T, D2):** comparaison entre les moule T (témoin) et les moule D2; (**D2: 15 μg de cuivre /L.**) ; **P (T, D3):** comparaison entre les moule T (témoin) et les moule D3; (**D3: 10 μg de cuivre /L**) ;

Tableau 3 : Comparaison des teneurs en MTs des glandes de moules exposées aux différentes doses de cuivre (D1, D2, D3) avec celles des glandes avant traitement (A),

	comparaison	Lower (plus bas ou inférieur)	Intervalle de différence	Valeur du test	p- Value
1	P (A, D1)	-0.497	1.164	-0.5000	0.9784992
2	P (A, D2)	-0.001	0.003	-590.4248	0 (S)
3	P (A, D3)	-0.001	0.003	-590.4248	0 (S)
4	P (A, T)	0.997	1.001	590.4248	0 (S)

P (A, D1): comparaison entre les moule A (avant traitement) et les moule D1; (**D1: dose1: 30 μg de cuivre /L**) ; **P (A, D2):** comparaison entre les moule A (avant traitement) et les moule D2; **D2: dose2: 15 μg de cuivre /L.)** **P (A, D3):** comparaison entre les moule A (avant traitement) et les moule (**D3: dose3: 10 μg de cuivre /L**) ; **P (A, T):** comparaison entre les moule A (avant traitement) et les moule T (témoin). S : significatif

Il ressort de l'application du test de Dunnett que les teneurs en MTs des glandes exposées aux différentes doses de cuivre montrent des différences significatives.

II.1.6-2 Cuivre et branchies:

L'application du test Kruskal-Wallis (le test multiple) montre qu'il n'existe pas de différences significatives (ns) entre les teneurs en MTs relevées au niveau des branchies des moules traitées au cuivre; cela veut dire qu'il n'y a pas d'effets des différentes doses de cuivre sur les teneurs en MTs des branchies.

*Les teneurs en MTs des branchies exposées au Cuivre, d'après Kruskal-Wallis chi-squared (5.5714, df = 4, p-value = 0.2335).

II.1.6-3 Cuivre et corps

D'Après le test Kruskal-Wallis (le test multiple) il n'existe pas de différences significatives (ns), entre les teneurs en MTs relevées au niveau du corps des moules traitées au cuivre; ce qui veut dire qu'il n'y a pas d'effets des différentes doses de cuivre sur les teneurs en MTs du corps.

* Les teneurs en MTs du corps exposé au Cuivre, d'après Kruskal-Wallis chi-squared (5.9238, df = 4, p value = 0.2049).

En conclusion, il ressort de cette expérimentation que les différentes doses de cuivre n'ont pas d'effet significatif sur l'induction de la métallothionéine au niveau des branchies et du corps des moules traitées; mais en revanche, un effet significatif est décelé au niveau de la glande de ces mêmes moules.

II.2 Effet du cadmium sur les teneurs en métallothionéines de la moule:

Les résultats du dosage de la métallothionéine sont collectés dans le tableau 2 ;

Il ressort de ce tableau que Les teneurs en MTs varient d'un lot à l'autre et d'un organe à l'autre :

Tableau 4: Teneurs médianes en métallothionéines (MTs) en nmol/ml, relevées chez des moules exposées pendant 7j à différentes concentrations de cadmium

Lots de moules	Teneurs en MTs (nmol/ml)		
	Glande	Branchies	Corps
Provenant du site (A)	2,01979995	1,06889757	1,52699652
Témoins (non traitées) (T)	6,35785825	1,41594223	0,38174913
Exposées à 50 µg de cadmium/L (D1)	3,19281092	4,30335384	3,43574218
Exposées à 100 µg de cadmium/L (D2)	2,70000749	0,85372988	1,52005563
Exposées à 200 µg de cadmium/L (D3)	1,74216422	16,3110993	2,67224392

A: moule provenant du site; **T:** moule témoin; **D1:** dose1: 50 µg de cadmium/L ;
D2: dose2: 100 µg de cadmium/L; **D3:** dose3: 200 µg de cadmium/L;

II.2.1 Moules provenant du site:

Chez le lot de moules fraîchement cueillies (provenant directement du site), c'est la glande digestive qui enregistre les teneurs en MTs les plus élevées ; elles font le double de celles relevées dans les branchies.

II.2.2 Moules témoins:

Chez les moules du lot témoin, c'est toujours la glande qui montre les teneurs en MTs les plus élevées; les valeurs relevées font plus de 4 et 16 fois celles notées dans les branchies et le corps respectivement. Au niveau de la glande de moules témoins la teneur en MTs est multiplié par un facteur 3 par rapport à celle des moules fraîchement cueillies. Dans les branchies des moules témoins, il est aussi notée une légère hausse des teneurs en MTs par rapport à celles des moules

fraîchement cueillies. En ce qui concerne le corps, la teneur en MTs, chez les moules témoins, représente le $\frac{1}{4}$ de celle notée chez les moules fraîchement cueillies.

II.2.3 Moules exposées à la faible dose de Cadmium:

Chez le lot de moules exposées à la plus faible dose de cadmium, la teneur en MTs de la glande montre, par rapport au témoin une baisse de 50% ; mais au niveau des branchies et du corps les teneurs relevées font respectivement 3 et 9 fois les valeurs enregistrées chez les moules du lot témoin. Ceux sont toutefois les branchies qui présentent les plus fortes teneurs en MTs.

II.2.4 Moules exposées à la dose intermédiaire de Cadmium:

Chez le lot de moules exposées à la dose intermédiaire de 100 μg de cadmium/L, les teneurs en MTs montrent une baisse par rapport à celles relevées dans le lot de moules exposées à 50 μg de cadmium/L. C'est au niveau de la glande que la teneur en MTs est la plus élevée par rapport à la branchie et au corps. Nous notons, par ailleurs, qu'à la dose intermédiaire, la teneur en MTs des branchies représente le $\frac{1}{4}$ de celle relevée chez les moules traitées à la faible dose. Quant à la teneur en MTs relevée dans le corps, à cette dose, elle baisse de moitié.

II.2.5 Moules exposées à la forte dose de Cadmium:

A forte dose, les teneurs en MTs relevées dans les branchies montrent une forte hausse; les valeurs relevées font plus de 4 fois celles notées chez le lot de moules exposées à la faible dose (50 μg de cadmium/l). Dans la glande, la teneur en MTs baisse jusqu'à atteindre sa valeur la plus basse. Dans le corps, les teneurs en MTs montrent une hausse par rapport à celles du lot témoin

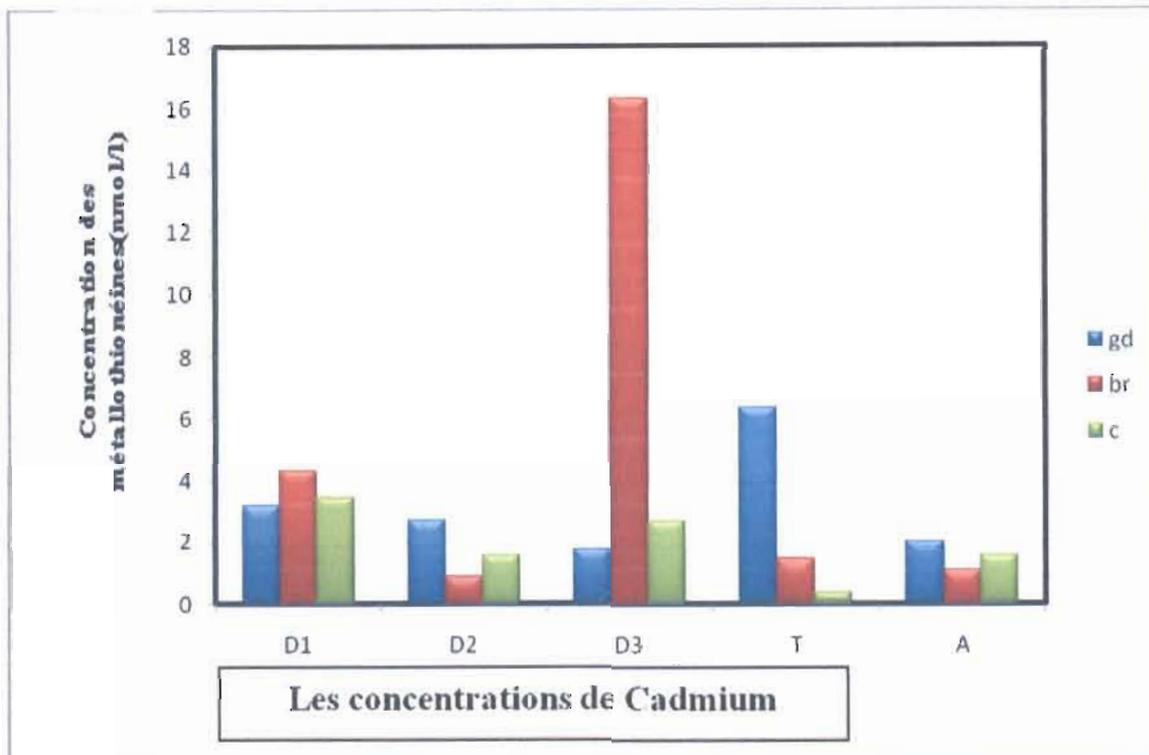


Figure 5: Teneurs médianes en métallothionéines (MTs) relevées chez des moules exposées, pendant 7j, à différentes concentrations de cadmium

II.2.6 Analyse statistique des données:

II.2.6-1 Cadmium et glandes:

L'application du test de Kruskal-Wallis sur les teneurs en MTs des glandes exposées aux différentes doses de cadmium ne montre pas de différence significative (effet sur le rang « le rang étant la médiane des teneurs »). cela signifie qu'il n'y a pas d'effet dose du cadmium sur les glandes.

*Les glandes exposées aux différentes doses de cadmium d'après Kruskal-Wallis chi-squared (6.2182, df = 4, p-value = 0.1834).

II.2.6-2 Cadmium et branchies:

L'application du test Kruskal-Wallis (le test multiple) montre qu'il n'existe pas de différences significatives (ns) entre les teneurs en MTs relevées au niveau des branchies des moules traitées au cadmium; cela veut dire qu'il n'y a pas d'effets des différentes doses de cadmium sur les teneurs en MTs des branchies.

*Les teneurs en MTs des branchies exposées au Cadmium, d'après Kruskal-Wallis chi-squared (8.9346, df = 4, p-value = 0.0676).

II.2.6-3 Cadmium et corps

D'Après le test Kruskal-Wallis (le test multiple) il n'existe pas de différences significatives (ns), entre les teneurs en MTs relevées au niveau du corps des moules traitées au cadmium; ce qui veut dire qu'il n'y a pas d'effets des différentes doses de cadmium sur les teneurs en MTs du corps.

* Les teneurs en MTs du corps exposé au Cadmium, d'après Kruskal-Wallis chi-squared (9.0909, df = 4, p-value = 0.05887).

En conclusion, il ressort de cette expérimentation que les différentes doses de cadmium n'ont pas d'effet significatif sur l'induction de la métallothionéine au niveau des glandes, des branchies et du corps de moules.

II.3 Effet du plomb sur les teneurs en métallothionéines de la moule:

Les résultats du dosage des MTs relevées chez les moules traitées par différentes doses de plomb montrent des différences d'un lot à l'autre (tab. 3); C'est dans la glande digestive que ces différences sont plus prononcées.

Tableau 5: Teneurs médianes en métallothionéines (MTs) relevées chez des moules exposées pendant 6 jours à différentes concentrations de plomb

Lots de moules	Teneurs en MTs (nmol/ml)		
	Glande	Branchies	Corps
Provenant du site (A)	0,43033538	0,29845841	0,33316288
Témoins (non traitées) (T)	0,70797112	0,31928109	0,31928109
Exposées à 0,25 µg de plomb/L (D1)	0,16658144	0,48586253	0,34704466
Exposées à 0,50 µg de plomb/L (D2)	0,18046323	0,65244397	0,3053993
Exposées à 1 µg de plomb/L (D3)	0,24987216	0,3053993	0,49974432

A: moule provenant du site; **T:** moule témoin; **D3:** dose 3 : 1 µg de plomb/L;

D2: dose2: 0,50 µg de plomb/L; **D1:** dose1: 0,25 µg de plomb/L

II.3.1 Moules provenant du site:

Chez le lot de moules provenant directement du site, c'est la glande qui montre les teneurs en MTs les plus élevées puis viennent le corps et les branchies.

II.3.2 Moules témoins:

Chez les moules du lot témoin, la glande montre une hausse des teneurs en MTs de 60% par rapport au lot de moules fraîchement cueillies. Les valeurs relevées dans les branchies et le corps restent assez proche de celles notées dans ces mêmes organes du lot de moules fraîchement cueillies.

II.3.3 Moules exposées à la faible dose de plomb:

Chez le lot de moules exposées à la plus faible dose de plomb, la glande montre une importante baisse de ses teneurs en MTs ; ces dernières représentent

moins du $\frac{1}{4}$ de celles des moules témoins. Au niveau branchial, la teneur en MTs montre une hausse de 35% par rapport à celle du lot témoin. Au niveau du corps, les teneurs en MTs ne montrent de grosses variations entre les lots de moules témoins et celles fraîchement cueillies.

II.3.4 Moules exposées à la dose intermédiaire de plomb:

Chez le lot de moules exposées à la dose intermédiaire de 0.50 μg de plomb/L, les teneurs en MTs de la glande restent assez proche de celles relevées dans la glande du lot de moules exposées à la plus faible dose de plomb (0.25 μg de plomb/L). Nous notons, par ailleurs, qu'à cette dose la teneur en MTs dans les branchies a encore augmenté ; elle fait plus du double de la valeur relevée chez le lot de moules témoins. En ce qui concerne le corps, la teneur en MTs montre une légère baisse par rapport à celle du lot exposé à la faible dose de plomb mais reste proche de celle du lot témoin.

II.3.5 Moules exposées à la forte dose de plomb:

A forte dose (1 μg de plomb/L), les teneurs en MTs relevées dans les glandes montrent une légère hausse par rapport à celles enregistrées chez les moules exposées à une faible concentration de plomb. Au niveau branchial, la teneur en MTs chute de moitié par rapport à celle du lot traité à la dose intermédiaire. C'est dans le corps que la plus forte teneur en MTs est la plus élevée ; nous notons, en effet, que la teneur en MTs, dans cette partie de l'organisme de la moule, montre une augmentation de 60% par rapport à la teneur relevée chez les moules traitées à la dose intermédiaire.

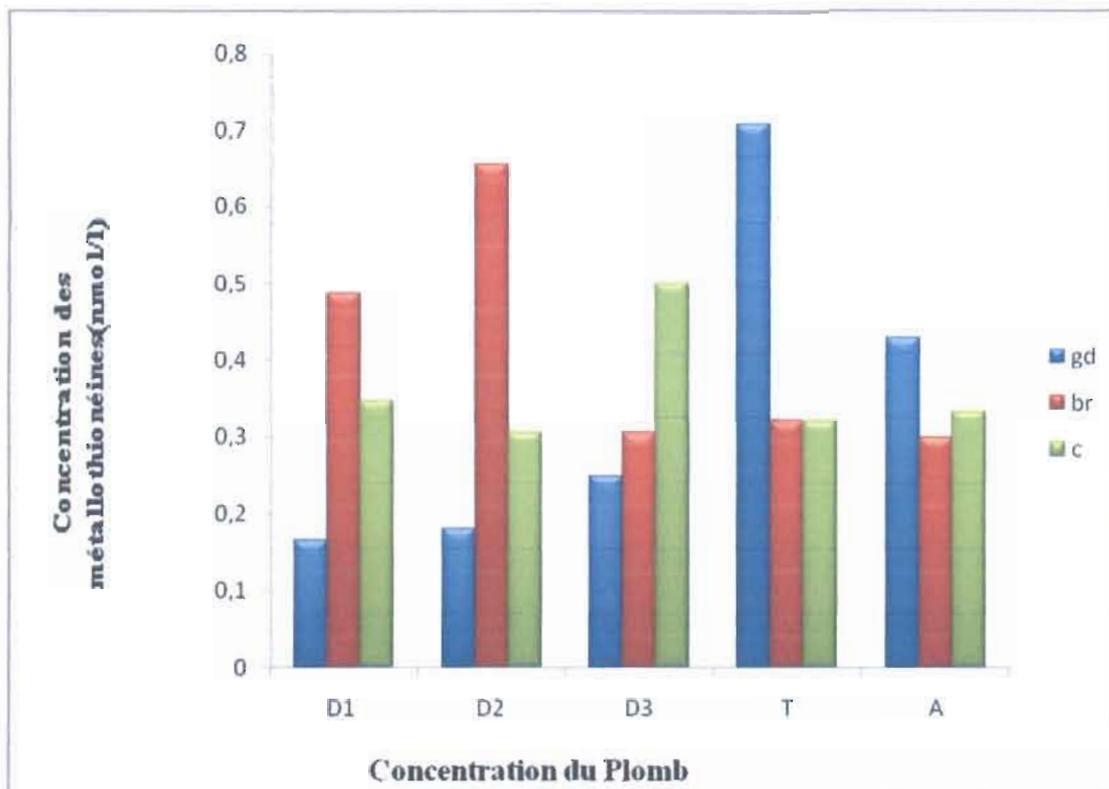


Figure 6: Teneurs médianes en métallothionéines (MTs) relevées chez des moules exposées, pendant 7j, à différentes concentrations de plomb

II.3.6- Analyse statistique des données:

II.3.6-1 Plomb et glandes:

L'application du test de Kruskal-Wallis sur les teneurs en MTs des glandes exposées aux différentes doses de plomb montre l'existence d'une différence significative (effet sur le rang « le rang étant la médiane des teneurs »).

A partir de cela nous passons au test de comparaison des teneurs en MTs de la glande de moules traitées à différentes doses de plomb avec celles des moules témoins et fraîchement cueillies.

Tableau 6 : Comparaison des teneurs en MTs des glandes exposées aux différentes doses de plomb (D1, D2, D3) avec celles des glandes de Témoin (T), et même celles du témoin avec les glandes de moules avant traitement (A)

	comparaison	P.Bonf	P.Holm
1	F(A)- F(T)	0.712	0.0356 (S)
2	F(D1)- F(T)	0.1061	0.0356 (S)
3	F(D2)- F(T)	0.0050 (s)	0.0050(S)
4	F(D3)- F(T)	0.0364 (s)	0.0273(S)

A: moule provenant du site; **T:** moule témoin; **D3:** dose 3 : 1 µg de plomb/L;
D2: dose2: 0,50 µg de plomb/L; **D1:** dose1: 0,25 µg de plomb/L ; **S:** Significatif

Tableau 7 : Comparaison des teneurs en MTs des glandes de moules exposées aux différentes doses de cuivre (D1, D2, D3) avec celles des glandes avant traitement (A) et celles du témoin avec les glandes de moules avant traitement (A)

	comparaison	P.Bonf	P.Holm
1	F(D1)- F(A)	0.2285	0.0992
2	F(D2)- F(A)	0.0193 (S)	0.0193 (S)
3	F(D3)- F(A)	0.1984	0.0992
4	F(T)- F(A)	0.0712	0.0534

A: moule provenant du site; **T:** moule témoin; **D3:** dose 3 : 1 µg de plomb/L;
D2: dose2: 0,50 µg de plomb/L; **D1:** dose1: 0,25 µg de plomb/L ; **S :** significatif

La comparaison entre organe par Kruskal-Wallis était non paramétrique ou non significative du fait que l'échantillonnage est faible.

*Pour la comparaison post-Hoc, comparaison deux à deux (T) et (A) qui sont deux témoins par rapport aux différents organes par le package n par comp

(comparaison non paramétrique), le test Kruskal-Wallis mène au rejet de l'hypothèse ce qui nous amène à utiliser le test de Dunnett

Tableau 8: Comparaison des teneurs en MTs des glandes de moules témoins (T) avec celles des moules exposées aux différentes doses de plomb (D1, D2, D3) et avec celles des glandes de moules avant traitement (A)

	comparaison	Lower (plus bas ou inférieur)	Intervalle de différence	Valeur du test	p- Value
1	P (T, A)	-0.001	0.003	-611.1477	0 (S)
2	P (T, D1)	-0.001	0.003	-611.1477	0 (S)
3	P (T, D2)	-0.001	0.003	-611.1477	0 (S)
4	P (T, D3)	-0.001	0.003	-611.1477	0 (S)

A: moule provenant du site; **T:** moule témoin; **D3:** dose 3 : 1 µg de plomb/L; **D2:** dose2: 0,50 µg de plomb/L; **D1:** dose1: 0,25 µg de plomb/L ; **S :** significatif

Tableau 9 : Comparaison des teneurs en MTs des glandes de moules fraîchement cueillies (A) avec celles des moules exposées aux différentes doses de plomb (D1, D2, D3) et avec celles des glandes de moules témoins (T)

	comparaison	Lower (plus bas ou inférieur)	Intervalle de différence	Valeur du test	p- Value
1	P (A, D1)	-0.001	0.003	-611.1477	0 (S)
2	P (A, D2)	-0.001	0.003	-611.1477	0 (S)
3	P (A, D3)	-0.001	0.003	-611.1477	0 (S)
4	P (A, T)	0.997	1.001	611.1477	0 (S)

A: moule provenant du site; **T:** moule témoin; **D3:** dose 3 : 1 µg de plomb/L; **D2:** dose2: 0,50 µg de plomb/L; **D1:** dose1: 0,25 µg de plomb/L ; **S :** significatif

Il ressort de l'application du test de Dunnett que les teneurs en MTs des glandes exposées aux différentes doses de plomb montrent des différences significatives.

II.3.6-2 Plomb et branchies:

L'application du test Kruskal-Wallis (le test multiple) montre qu'il n'existe pas de différences significatives (ns) entre les teneurs en MTs relevées au niveau des branchies des moules traitées au plomb; cela veut dire qu'il n'y a pas d'effets des différentes doses de plomb sur les teneurs en MTs des branchies.

*Les teneurs en MTs des branchies exposées au plomb, d'après Kruskal-Wallis chi-squared (0.4683, df = 4, p-value = 0.1692).

II.3.6-3 Plomb et corps:

D'Après le test Kruskal-Wallis (le test multiple) il n'existe pas de différences significatives (ns), entre les teneurs en MTs relevées au niveau du corps des moules traitées au plomb; ce qui veut dire qu'il n'y a pas d'effets des différentes doses de plomb sur les teneurs en MTs du corps.

* Les teneurs en MTs du corps exposé au plomb, d'après Kruskal-Wallis chi-squared (0.4683, df = 4, p-value = 0.9765).

En conclusion, il ressort de cette expérimentation que les différentes doses de plomb n'ont pas d'effet significatif sur l'induction de la métallothionéine au niveau des branchies et du corps des moules traitées; mais en revanche, un effet significatif est décelé au niveau de la glande de ces mêmes moules.

II. Discussion

II. Discussion

Les résultats de notre expérimentation montrent que l'exposition des moules à différentes doses de métaux différents est à l'origine de l'induction de la métallothionéine à des teneurs variants en fonction de l'organe ou la partie du corps.

Dans le cadre de l'exposition des moules à différentes doses de cuivre, nous notons que les teneurs en MTs varient en fonction de l'organe. Nos résultats montrent que plus la dose de cuivre augmente et plus les teneurs en MTs baissent au niveau de la glande digestive et des branchies. Nous notons néanmoins une très forte concentration des MTs au niveau du corps des moules exposées à la plus forte dose. Khati et al., (2012) rapportent que plus la dose de cuivre est élevée et plus la teneur en MT est élevée, ceci aussi bien dans la glande digestive que dans les branchies. De nombreux auteurs s'accordent à dire que les fortes teneurs en MT sont généralement rencontrées dans la glande digestive des bivalves (Mouneyrac et al., 1998 ; Raspor et al., 1999a ; Geffard et al., 2001 ; Geffard et al., 2002a). Par ailleurs, il semble que l'augmentation de la teneur en MT serait en relation avec celle de l'accumulation de cuivre dans l'organe.

Les résultats de l'exposition des moules au cadmium montrent que les teneurs en MTs varient d'un lot à l'autre. Chez le lot de moules fraîchement cueillies (provenant directement du site) ainsi que les moules du lot témoin, c'est la glande digestive qui enregistre les teneurs en MTs les plus élevées. Chez le lot de moules exposées à la plus faible dose de cadmium, ce sont les branchies qui présentent les plus fortes teneurs en MTs; la glande montre, par rapport au témoin une baisse des teneurs en MTs. A la dose intermédiaire (100 µg de cadmium/L), C'est toujours au niveau des branchies que la teneur en MTs est la plus élevée par rapport à la glande et au corps. L'exposition des moules à la dose de 200µg de Cadmium/L, engendre l'induction de fortes teneurs en MTs dans les branchies (plus de 4 et 20 fois celles notées chez le lot 1 et le lot témoin respectivement) et la forte baisse de la teneur en

MTs dans la glande (atteinte de sa valeur la plus basse). Khati et *al.*, (2012), rapportent que le cadmium n'a aucun effet sur les teneurs en MT des branchies ; mais en revanche les teneurs en MT relevées dans la glande sont élevées par rapport au témoin. Selon Khati et *al.*, (2012), le cadmium induirait la synthèse de MT dans la glande digestive; d'autres auteurs rapportent que l'accumulation de cadmium dans les branchies n'entraîne aucune variation des teneurs en MT par rapport au témoin (Amiard et al., 2006). Selon Khati et *al.*, (2012), les teneurs en MTs sont plus élevées dans la glande que dans les branchies; ces auteurs rapportent qu'au niveau branchial le cadmium n'a aucun effet sur les teneurs en MT, mais en revanche le cuivre provoque une hausse significative de cette dernière par rapport au témoin ; Par ailleurs, ces auteurs signalent que cette hausse de MT au niveau des deux organes (branchie et glande) dépendrait de l'importance de la bioaccumulation du cuivre

Les résultats de l'exposition des moules à différentes doses de plomb fait apparaître que les teneurs en MTs montrent des différences plus prononcées dans la glande digestive que dans les autres parties du corps. Nous notons que les teneurs en MTs les plus élevées sont rencontrées dans la glande digestive; dans cet organe la teneur en MTs est maximale chez le témoin, puis baisse de moitié chez la moule exposée à la faible et la forte dose ; c'est à la dose intermédiaire, que la teneur en MTs est la plus basse. Au niveau branchial, c'est chez la moule exposée à la faible dose et à la dose intermédiaire de plomb qu'une hausse de la teneur en MTs est relevée. Les teneurs en MTs notées dans le corps des moules exposées au plomb ne montrent pas de grosses variations, sauf chez les moules traitées à la plus forte dose.

Notre analyse statistique fait apparaître l'absence de différence significative entre les teneurs en MTs relevées chez les branchies et corps des moules exposées à différentes doses de plomb, de cuivre et de cadmium; cela veut dire que ces métaux n'ont pas d'effet dose sur les branchies et le corps des moules traitées. En ce

qui concerne la glande, les teneurs en MTs relevées semble être induites par le plomb et par le cuivre mais pas par le cadmium ; ceci tient au fait que des différences significatives sont décelées dans la glande des moules exposées à différentes doses de plomb et de cuivre.

La métallothionéine jouerait un rôle primordial dans le métabolisme de métaux essentiels présents en excès dans la cellule en bloquant la réaction de Fenton qui mènerait à la réduction du stress oxydatif par le captage de métaux de transition tels que le fer et le cuivre (Valavanidis et *al.*, 2006).

Serra et *al.*, (1999) montrent que ce sont les branchies qui accumulent préférentiellement le cadmium chez *Mytilus galloprovincialis*, par contre Amiard et *al.*, (1986) ne notent pas de différences significatives d'accumulation de cadmium entre les différents organes de cette même moule.

III Conclusion

et

Perspectives

III Conclusion

Il ressort de cette expérimentation que d'une part les différentes doses de plomb et de cuivre n'ont pas d'effet significatif sur l'induction de la métallothionéine au niveau des branchies et du corps des moules traitées et que d'autre part en revanche, un effet significatif est décelé au niveau de la glande de ces mêmes moules. Dans le même sens les analyses indiquent que les différentes doses de cadmium n'ont pas d'effet significatif sur l'induction de la métallothionéine au niveau des glandes, des branchies et du corps des moules traitées.

Il est actuellement bien établi que les bivalves représentent d'excellents bio indicateurs de pollution. Par ailleurs le système de détoxification de ces organismes présente des variations en fonction de l'organe et du métal considéré; cette sensibilité confirme leur utilité dans les études de biosurveillance et la détermination de l'état de santé des écosystèmes.

En perspectives il serait intéressant:

- De prolonger la durée d'exposition au polluant afin de percevoir la réversibilité ou non des effets dans les organismes exposés.

- D'utiliser d'autres métaux tels que Zn, Cr, Hg...

- D'entreprendre le dosage de métaux lourds chez la moule exposée pour mieux expliquer les différentes réponses de l'organisme lors d'une expérimentation en milieu contrôlé.

- D'entreprendre une expérimentation de contamination/décontamination des bivalves pour mieux comprendre le processus de détoxification de ces organismes sentinelles.

- D'utiliser des mélanges de polluants lors d'expérimentation au laboratoire pour se rapprocher un peu plus du milieu naturel.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Abada-Boudjema Y-M., 1996.** Cinétique, croissance, production et composition biochimique de deux bivalves mytilidés, *Perna perna* (L.) et *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) du littoral algérois. Thèse Doct. Muséum National Hist. nat. Paris, Fr. : i-iv + 1-243.
2. **Abada-Boudjema Y-M., Dauvin J-C., 1995.** Recruitment and life-span of two natural mussel populations *Perna perna* (Linnaeus) and *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck) from the Algerian coast. *J. Moll. Stud.*, 61 : 467-481.
3. **Geffard ,J. C. Amiard and C. Amiard-Triquet ; 2002** Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations; 2002, Vol. 7, No. 2 , Pages 123-137
4. **Amiard J-C., et Amiard-Triquet C., 2008.** Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier Tec & Doc, Paris, 375p.
5. **Amiard et al., (1986)** Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers.
6. **Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rain-bow PS (2006):** Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use, as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160–202.

7. **Arrignon J., 1991.** Aménagement piscicole des eaux douces. 4^{ème} édition. pp34, 35, 36, 49,348.
8. **Aykin-Burns N et Al. , (2001).** Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage, *Curr. Top. Med. Chem.* 1:529-539.
9. **Baer, K.N. and Thomas, P. 1990.** Influence of capture stress, salinity and reproductive status on zinc associated with metallothionein-like proteins in the livers of three marine teleost species. *Mar. Environ. Res.* 29:277-287.
10. **Beeby, A.1991:** Toxic metal uptake and essential metal regulation in terrestrial invertebrates: a review. Dans: Newman, M .C. et A.W. McIntosh [éds].*Metal ecotoxicology- concepts and applications* Lewis Publishers, Chelsea, MI. chap.3 : 65-89
11. **Beeby, A.2001, what do sentinels stand for? Environnemental pollution 1.12:285-298.**
12. **Boening, D.W. 1999.A.** evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marines waters *environnemental Monitoring and assessment:* 55:459-470.
13. **Bernhard WR, Kagi JHR (1987)** Purification and characterization of a typical cadmium binding polypeptides from *Zea mays*. In JHR Kagi, Y Kojima, Eds, *Metallothionein II: Proceedings of the "Second international meeting on metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins"*, Zürich, August 21-24, 1985. Birkhäuser, Basel, pp 309-315.
14. **Bolin CM, Basha R, Cox D, Zawia NH, Maloney B, Lahiri DK, Cardozo Pelaez F (2006).** Exposure to lead and the developmental origin of oxidative DNA damage in the aging brain, *Faseb. J.*, 20: 788-790.
15. **Cherian MG, Goyer RA (1978)** métallothionéines et leur rôle dans le métabolisme et la toxicité des métaux. *Vie Sc* 23:1-10

16. **Chen L, Yang X, Jiao H, Zhao B (2003).** Tea catechins protect against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction, and calcium dysregulation in PC12 cells, *Chem. Res. Toxicol.* 16:1155-1161.
17. **Dysregulation in PC12 cells, Chem. Res. Toxicol.** 16:1155-1161.
18. **Claisse D., Joanny M., Quintin J-Y., 1992.** Le réseau national d'observation de la qualité du milieu Marin. *Analysis* 20: 19-22.
19. **Daby, D. (2006).** Coastal pollution and potential biomonitors of metals in Mauritius. *Water, Air and soil pollution* 174, 63-91.
20. **Directive européenne, 1975.** Directive du conseil fixant les règles régissant les eaux de baignade, reprise par le décret exécutif n° 91-980 du 20 septembre 1991. *J.Off.Comm.Europ* et par le décret exécutif N° :93-164 du 10 juillet 1993. *JORA* N° 46.
21. **Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N (2001).** Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage, *Curr. Top. Med. Chem.* 1:529-539.
22. **Fowler, A.D., Jensen, L.S. and P61oquin, A.S. 1987.** Varivols in Archean basalts: Products of spherulitic crystallization. *Can. Mineral.*, 25, 275-89.:
23. **Frihi H., 1998.** Etude de la structure et du fonctionnement du système phytoplanctonique dans un système marin côtier: eutrophisation de la baie d'Annaba. Thèse de magister. Université Badji Mokhtar, 99p.
24. **Fisher R-W., & Schneider M., & Bauchot M-L., 1987.** Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche méditerranée et mer noir. Zone de pêche 37 –Révision 1: Végétaux et invertébrés. Publication préparée par le FAO. (Projet. GCP/JNT/422/EEC) Rome 1987. Vol 7. p317-
25. **Gaitonde et al., 2006;** Gaitonde, V.N., S.R. Karni, J.C. Rubio, A.E. Correia, A.M. Abrao and J.P. Davim, 2008. Analysis of Parametric Influence on

- Delamination in High-Speed Drilling of CFRP composites. *J. Mater. Process.*
26. *Technol.*, 203: 431-438. DOI: 10.1016/j.jmatprotec.2007.10.050
27. **Grill E., (1987):** Phytochelatins, the heavy metal binding peptides of plants: characterization and sequence determination *Experientia. Supplementum*, (52)317-322
28. **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 metal-rich sites. *Biomarkers* 6 (2), 91–107.
29. **Geffard, A., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., 2002a.** Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers* 7 (2), 123–137.
30. **Goldberg E-D., Bowen V-T., Farrington J-W., Harvey G., Martin J-H., Parker P-L., Risebrought R-W., Robertson W., Schneider E., Gamble E., 1978.** The mussel Watch. *Environmental Conservation* 5, 101-125.
31. **Guallini P., 2008.** La Méditerranée menacée par la pollution. Article de la Provence presse. Octobre 2008.
32. **Hare, L., P. G. C. Campbell, A. Tessier & N. Belzile, 1989.** Gut sediments in a burrowing mayfly (Ephemeroptera: *Hexagenia limbata*): their contribution to animal trace element burdens, their removal, and the efficacy of a correction for their presence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*
33. **Hayashi Y, Nakagawa CW, Murasugi A (1986);** Unique properties of Cd-binding peptides induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Environmental Health Perspectives*, (65)13-19.
34. **Huang, H., Wu, J.Y. et Wu, J.H. (2007).** Heavy metal monitoring using bivalved shellfish from Zhejiang coastal waters, East China Sea.
35. *Environmental monitoring and assessment* 129, 315-320.

36. **Jorgensen C-B., 1960.** Efficiency of particle retention and rate of water transport in undisturbed lamellibranchs. *Cons. Perm. Int. Expl. Mer.*, 29 : 96-116.
37. **Kagi JHR, Himmelhoch SR, Whanger PD, Bethune JL, Vallee BL (1974)** Equine hepatic and renal metallothioneins. Purification, molecular weight, amino acid composition, and metal content; *The Journal Of Biological Chemistry*, (249)11:3537-3542.
38. **Kagi, JHR, Nordberg M (1979).**, International Meeting on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metal Binding Proteins. Basel, Switzerland: Birkhauser.
39. **Kagi JHR, Vasak M, Lerch K, Gilg DE, Hunziker P, Bernhard WR, Good Mb (1984).**, Structure of mammalian metallothionein. *Environmental Health Perspectives*, (54)93-103.
40. **Khati et al (W. Khati, K.Ouali, C.Mouneryrac, Ali Bananoui.) 2012,** Metallothioneins in aquatic invertebrate; Their role in metal detoxification and their use in biomonitoring
41. **Köhler, K., Riisgård, H.U. (1982).** Formation of metallothioneins in relations to accumulation of cadmium in the common mussel, *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 66, 53-58.
42. **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*, (73)10:3413-3417.
43. **Lacaze J-C., et Ramade F., 1993.** La dégradation de l'environnement côtier, conséquences écologiques. Edition Masson. Paris. p129.

44. **Lagadic, L., T. Caquet and F. Ramade. 1994.**, The role of biomarkers in environmental assessment. Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology*, 3, 193-208 (1994).
45. **Lagadic, L., T. Caquet, J.-C. Amiard & F. Ramade eds. , 1997.** Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Collection Écologie, Paris, Masson, 419 pp.
46. **Lagadic L., Caquet T., Amiard J-C., et Ramade F., 1997.** Intérêt d'une approche multiparamétrique pour le suivi de la qualité de l'environnement: 393-401. In: Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Edt. Masson. : 419p.
47. **Liehr, G.A., Zettler, M.L., Leipe, T. et Wilt, G. (2005).** The ocean quahog *Arctica islandica* L. : a bioindicator for contaminated sediments. *Marine biology* 147, 671-679.
48. **Linnaeus, 1758.** Gulf States Marine Fisheries Commission. Retrieved on 2007-12-15.
49. **Lubet P., et Chappuis J-G., 1966.** Nutrition des Lamellibranches. *Océanis* 4(1), 23-24. Paris. 158 (II) : 2125-2128.
50. **Lubet, P., 1981.** Action de la température sur le cycle de reproduction des Lamellibranches. *Bull. Soc. Zool. France*, 106, 288-292.
51. **Lubet, P., et Mann, R., 1987.** Les différentes modalités de la reproduction chez les mollusques bivalves. *Haliotis*, 16, 181-195.
52. **Lubet, P., Besnard, J.Y., et Faveris, R., 1987.** Compétition énergétique entre tissu musculaire et gonadique chez la coquille St Jacques (*Pecten maximus* L.). *Haliotis*, 16, 173-180.
53. **Lubet, P., 1981.** Action de la température sur le cycle de reproduction des Lamellibranches. *Bull. Soc. Zool. France*, 106, 288-292.
54. **Maliuga, D.P., 1941.** Cadmium in organisms: *Acad. Sci. U.R.S.S. Comptes rendus*, V. 31, p. 145-147.
55. **Margoshes M, Vallee BL. 1957.** A Cadmium protein from renal cortex. *J Am Chem Soc* 79: 4813-4814

56. **MeHSIP. 2008.** Elaboration of a Mediterranean Hot Spot Investment Programme. Final report for contact reg/2006/02 fwc beneficiaries europeaid/11860/c/multi lot n°2: transport and infrastructures; horizon.
57. **Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., 1998.** Effects of natural factors (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. Progr. Ser.* 162, 125–135.
58. **Maurin, 1961.** Etude des fonds chalutables de la Méditerranée occidentale (écologie et pêche). Résultats des campagnes des navires océanographiques : Président-Théodore-Tissier p191-195p.
59. **Noel-Lambot, F., Bouquegneau, J. M., Frankenne, F., Dist Disteche A. (1978a).** Le rôle des métallothionéines dans le stockage des métaux lourds chez les animaux marins. *Revue int. Océanogr. méd.* 49: 13-20
60. **Noel-Lambot, F., Bouquegneau, J.M., Frankenne, F., Dist " eche, A., '1978.** Le rôle des m ^ etallothion ' eines dans le stockage des m ' etaux ' lourds chez les animaux marins. *Rev. Int. Oceanogr. M ' ed.* 49, '13–20.
61. **Nemer M, Wilkinson DG, Travaglini EC, Sternberg EJ, Butt TR (1987)** Sea urchin metallothionein sequence: key to an evolutionary diversity. *Proceedings Of The 154National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, (82)15:4992-4994
62. **Olsson, P-E and Hogstrand, C.1987** subcellular distribution and binding of cadmium to metallothionein in tissues of rainbow trout exposure to ¹⁰⁹Cd in water. *Environ. Toxicol. Chem* 6, 867-874.

63. **Olson, P.F., Fessler, L.I., Nelson, R.E., Sterne, R., Campbell, A.G., Fessler, J.H. (1990).**, Glutactin, a novel Drosophila basement membrane-related glycoprotein with sequence similarity to serine esterases. *EMBO J.* 9(4): 1219--1227. ([Export to RIS](#))
64. **Oehlmann J et Schulte-Oehlmann U, 2003,** Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U. Endocrine disruption in invertebrates. *Pure Appl Chem.* 2003;75:2207–2218
65. **Overnell, J. (1984a).** Use of 2-mercaptoethanol during chromatography of crab (*Cancer pagurus*) metallothionein on DEAE cellulose. *Compo Biochem. Physiol.* 77C, 245-248.
66. **Overnell, J. (1984b).** The partition of copper and cadmium between different charge-forms of metallothionein in the digestive tubules of the crab, *Cancer pagurus*. *Compo Biochem. Physiol.* 77C, 237-243.
67. **Ouinissi M., Frehi H., Khelifi M., et Touhami M., 1998.** Composition et abondance du zooplancton en situation d'eutrophisation dans un secteur côtier du golfe d'Annaba (Algérie). *Ann. Ins. Oceanographie* ., Paris, 74(1):13-28p
68. **Rainbow, P.S., Phillips, D., Depledge, M., 1990.** The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. *Mar. Pollut. Bull.* 21 (7), 321–324.
69. **Raspor B., Pavicic J. & Branica M. (1989)** Cadmium -induced proteins from *Mytilus galloprovincialis* characterization and study of their interaction with cadmium. *Mar. Chem.* 28 (1/3) : 199-214
70. **Raspor B. & Pavicic J. (1992)** Complexing properties of metallothionein-like proteins. *Chem. Speciat. Bioavail.*, 3 (Suppl.) : 201-206
71. **Raspor, B., Pavicic, J., Kozar, S., Kwokal, Z., Paic, M., Odzak, N., Ujevic, I., Kjakovic, Z., 1999a.** Assessment of metal exposure of marine

- edible mussels by means of a biomarker. In: Klaassen, C. (Ed.), *Metallothionein IV*. Birkhauser, Basel, pp. 629–632.
72. **Rauser, W.E. 1990.** Phytochelatins. *Annu. Rev. Biochem.*, **59**:61-86.
73. **Robinson NJ, Evans IM, Cheeks C, Jackson PJ (1993)** Plant metallothioneins. *Biochemistry Journal* (295)1-10.
74. **Roesijadi G.. (1992).** Metallothioneins in Metal Regulation and Toxicity in Aquatic Animals. *Aquat. Toxicol.*, **22** 81- 114
75. **Serra R., Isani G., Tramontano G. et Carpena E., 1999.** Seasonal dependence of cadmium accumulation and Cd-binding proteins in *mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Com. Biochem et Physiol.*, **123C**, 165-174.
76. **Stone and Overnell 1984:** Stone, H.C., Wilson, S.B. and Overnell, J. (1986). Cadmium binding components of scallop (*Pecten maximus*) digestive gland. Partial purification and characterization. *Compo Biochem. Physiol.* **85C**, 259-268.
77. **Smolders et al. 2003, Wetlands Ecology & Management 11: 403-418; mechanisms involved in the re-establishment of sphagnum-dominated vegetation in rewetted bog remnants.**
78. **Valavanidis, A., T. Vlahogianni, M. Dassenakis and M. Scoullis (2006).** Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **64**, 178–189.
79. **Viarengo A., 2000.** The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a partial approach. *Sci. of the total Environ.* **247**: 295-311.

80. **Vaissaire et Fredj, 1963.** Contribution à l'étude de la faune benthique de plateau continental de l'Algérie. *Bull. Inst. Océanogr. Monaco*, 60: 38p; 5cartes.
81. **Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., & Fabbri, R., 1997.** Simple
82. methods for métallothionéine evaluation in the tissues of marine invertebrates such as Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Marine Environmental Research*, 44, 69-84.
83. **Winge DR, Nielson KB, Gray WR, Hamer DH., 1985.** Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *J Biol Chem.* 1985 Nov 25; 260(27):14464-70.
84. **W. Khati, K.Ouali, C.Mouneryrac, Ali Bananoui., 2012,** Metallotheioneins in aquatic invertebrate; Their role in Metaldetoxification and their use in biomonitoring
85. **Zhao, C., Qi, J., and Meng, A.;** Characterization and expression pattern of two zebrafish atf7 genes
86. **Sites internet :**
87. **Google, 2008.** Google earth programme
88. http://www.asef-asso.fr/attachments/457_Synthese_pollution_eau.pdf
89. <http://pagesperso-orange.fr/gonzales.manuel/textes/la%20mer/Faune/moule.html>.
90. <http://books.google.fr/books?id=yehhAQAAQBAJ&pg=PA256&lpg=PA256&dq=l'effet+de+l'exposition+du+la+moule+perna+perna+à+>
91. [1/google :](#)
92. [+l'effet de l'exposition du la moule perna perna à differentes concentration de plomb](#)

93. <http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Métallothionéine&oldid=86470447>
94. <http://pagesperso-orange.fr/gonzales.manuel/textes/la%20mer/Faune/moule.html>
95. http://en.wikipedia.org/wiki/Pteriomorpha#cite_note-3 voir wikipédia Ptériomorpha
96. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X05003279>
97. <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/13547500110091292?journalCode=bmk>
98. Depledge et Rainbow, 1990.
www.researchgate.net/.6941956_Bioaccumulation
99. http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Microbiology/Prepared_Slides/Proteus_vulgaris_flagella_P7311251.JPG.
100. www.cfkeep.org/html/stitch.php?s=159967283867
101. <http://pagesperso-orange.fr/gonzales.manuel/textes/la%20mer/Faune/moule.html>.
102. <http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Métallothionéine&oldid=86470447>
103. <http://books.google.fr/books?id=9K5I0ZPQd54C&pg=PA334&lpg=PA334&dq=Olsson+et+al.+1987&source=bl&ots=qXFzoXYmap>
104. <http://books.google.fr/books?id=yehhAQAAQBAJ&pg=PA256&lpg=PA256&dq=l'effet+de+l'exposition+du+la+moule+perna+perna+à>
105. 1-google :
106. + l'effet de l'exposition du la moule perna perna à différentes concentrations de plomb
107. <http://books.google.fr/books?id=9K5I0ZPQd54C&pg=PA334&lpg=PA334&dq=Olsson+et+al.+1987&source=bl&ots=qXFzoXYmap&sig=PLSx-NnBiSpQuP>

Annexe

Annexe

1. Généralités:**1.1- Position systématique et répartition géographique de l'espèce:**

La moule *Perna perna* est depuis longtemps signalée, sur les cotes d'Afrique du Nord, sous les noms de *Mytilus africanus* (Chenmitz, 1785) ou *Mytilus pictus* (Born.). SOOT-RYEN sépare, en 1955, le genre *Perna* (Hetzeius, 1735) du genre *Mytilus* (Linné, 1758), ces deux genres ayant des caractéristiques bien différentes; le genre *Perna* ne possède, en effet, pas de muscles adducteurs antérieurs, n'a que 2 dents cardinales (au lieu de 3 ou 4 pour le genre *Mytilus*), de plus les insertions des muscles retracteurs du pied et du byssus sont adjacentes entre elles, mais séparées de celles de l'adducteur postérieur et des retracteurs postérieurs du byssus. P. LUBET (1972) n'a pu., trouver de différence entre les espèces *Perna perna* d'Amérique du Sud et *Mytilus africanus* d'Afrique. Ces populations semblent donc appartenir à la même espèce: *Perna perna* (Linné, 1758). Espèce largement répandue dans le monde puisqu'on la rencontre sur les cotes est et ouest de l'Atlantique tropical et subtropical : Mauritanie, Sénégal, Congo, Angola, Amérique du Sud (Antilles, Guyane, Brésil) et sur les bords de la Méditerranée (cotes d'Afrique du Nord : Tunisie, Maroc)

❖ *Perna perna*

Synonyme: *Perna picta*

Perna (perna) picta

Caractères distinctifs: Charnière avec une ou deux dents; fréquemment une dans la valve gauche et 2 dans la valve droite. Muscles rétracteurs du pied et muscles rétracteur du byssus formant une empreinte médio-dorsale sur la coquille, muscle rétracteurs postérieurs du byssus à empreinte bien visible et adjacente à celle de l'adducteur postérieur. Periostracum brun-fauve avec

reflets verdâtres dans la région postérieure. Intérieure des valves nacré, blanc-rosé.
Taille: maximum 15 cm. Substrat dur de l'étage infralittoral et jusque vers 100 m de profondeur.

Pêche: Espèce pêchée occasionnellement par plongée au plages rocheuses. La pêche est effectuée jusque vers 20 m profondeur.

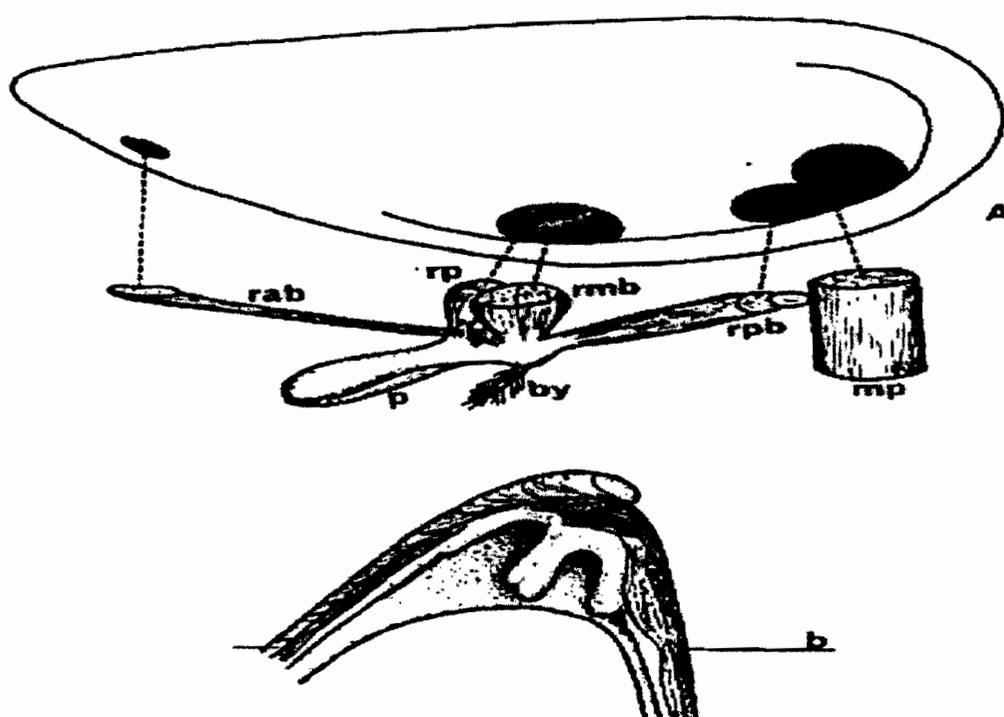


Fig. 1 : *Perna perna* (Linné,1758).

A°- Disposition des insertions musculaires sur la coquille.

mp = muscle adducteur postérieur.

rab = rétracteur antérieur du byssus.

rmb = rétracteurs moyens du byssus.

rpb = rétracteurs postérieurs du byssus.

rp = rétracteur du pied.

b°- = Charnières de la valve gauche.

1.2.1- Intérêts des bivalves:

Les bivalves sont des mollusques caractérisés par la présence d'une coquille composée de deux parties (deux valves), et un mode de vie presque exclusivement sessile. En tant que filtreurs, les bivalves sont réputés être de bons indicateurs de pollution et leur utilisation comme bioindicateur remonte au milieu des années 1970 avec la mise en place du premier programme de biomonitoring international : le Mussel Watch Program (Gaitonde *et al.*, 2006; Smolders *et al.*, 2003). Il s'agit du groupe d'organismes de loin le plus étudié dans le domaine de l'évaluation de la contamination du milieu marin par les métaux lourds et certains groupes comme les moules, les huîtres et les palourdes ont fait l'objet de nombreuses recherches et sont utilisés partout à travers le monde dans les programmes de biomonitoring (Oehlmann et Schulte-Oehlmann, 2003). La grande majorité des recherches impliquant les bivalves en milieu marin concernent la bioaccumulation des métaux lourds par ces derniers. Ces organismes, en raison de leur mode de vie sédentaire, de leur large distribution, de leur espérance de vie relativement grande et de leur capacité à accumuler les polluants, sont considérés comme d'excellents bioindicateurs et sont d'une grande utilité dans les programmes de biomonitoring des métaux lourds (Huang *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2005). Ils sont principalement reconnus pour leur capacité à accumuler des métaux comme l'arsenic, le cadmium, le cuivre, le plomb, le mercure l'argent et le zinc (Boening, 1999) et de nombreuses espèces appartenant aux genres *Mytilus*, *Perna*, *Crassostrea*, *Saccostrea* et *Ostrea* ont récemment fait l'objet d'études un peu partout à travers le monde (Daby, 2006).

En raison de leur mode d'alimentation particulier, les bivalves accumulent les métaux lourds présents dans le milieu marin à partir de trois principales formes différentes: la forme dissoute contenue dans l'eau filtrée, la forme organique

contenue dans la nourriture ingérée et la forme inorganique particulaire en suspension dans la colonne d'eau (Huang *et al.*, 2007). Ainsi, l'information recueillie à partir de l'étude des bivalves reflète davantage le taux de contamination de la colonne d'eau que celui des sédiments et ce, malgré que le comportement fouisseurs de certains d'entre eux tend à augmenter la quantité de métaux lourds de la couche d'eau superficielle par la remise en suspension de sédiments. (Boening, 1999; Liehr *et al.*, 2005).

1.3- Les métallothionéines:

1.3.1- Définition:

En 1957, Margoshes et Vallee ont isolé du cortex rénal du cheval, une protéine inhabituelle complexant le cadmium. Cette dernière, purifiée, fut nommée métallothionéine (MT) en fonction de son haut contenu en métal et en soufre (Kägi *et al.* 1974). Sa séquence protéique fut déterminée quelques années plus tard (Kojima *et al.* 1976). Des MTs, ainsi que d'autres protéines présentant beaucoup de similarités avec les MTs de cheval, ont maintenant été isolées chez une grande quantité d'organismes, incluant les procaryotes, les levures, les champignons, les métaphytes, les mollusques, les crustacés et les vertébrés.

Il a été proposé par Kägi et Nordberg en 1979 que les protéines ayant les mêmes propriétés physiques et chimiques que les MTs de cheval seraient appelées elles-mêmes MTs.

Les propriétés les plus importantes sont:

1 – Un poids moléculaire de 6000 à 7000 Dalton, (lors d'une chromatographie d'exclusion le poids moléculaire apparent est de plus ou moins 10000 Dalton,)

- 2 – Un haut contenu en métal (sept atomes de cadmium ou de zinc par molécule, douze de cuivre),
- 3 – Un taux caractéristique en certains acides aminés (un haut contenu en cystéine (33%) et pas d'acides aminés aromatiques ou d'histidine), et une séquence unique incluant une distribution fixe des cystéines,
- 4 – Une absorption caractéristique du complexe SH-cadmium à 250 nm,
- 5 – Une résistance à la chaleur.

Pour certains groupes d'organismes, la structure des MTs a été étudiée par un ensemble varié de techniques biophysiques et biochimiques incluant l'absorption ultraviolette, la résonance magnétique nucléaire, le séquençage d'acides aminés et la cristallographie (Kägi et al. 1984).

Chez les vertébrés, les MTs sont composées de 60 à 68 acides aminés. Elles contiennent 20 cystéines (parfois 21), 19 sont conservées. La séquence de la protéine est divisée en deux domaines, contenant 9 et 11 cystéines, toutes pouvant se lier à respectivement 3 et 4 ions métalliques bivalents. Le gène est quant à lui composé de 3 exons, 2 introns et les sites d'épissage semblent conservés (Roesijadi 1992).

Les MTs sont classifiées en classe I, II ou III en fonction de la localisation des cystéines et de leur mode de synthèse (Fowler et al. 1987) :

- **Classe I:** Polypeptides dont la position des cystéines est similaire aux MTs du rein de cheval.
- **Classe II:** Polypeptides dont la position des cystéines est différente de celle des MTs du rein de cheval.
- **Classe III:** Polypeptides complexant des métaux via des groupes thiols, mais n'étant pas synthétisés par un processus de traduction d'ARN messenger. Il s'agit de la cadystine, les phytochélatines, les phytochélatines, et la γ -

glutamylcysteinyl-glycine. Ces substances ont été identifiées chez les plantes et certains champignons.

A ce niveau, il faut noter que de nombreux invertébrés produisent diverses petites protéines, complexant spécifiquement certains métaux et ayant parfois de subtiles différences avec les MTs. Ces protéines ne sont pas encore bien connues et sont parfois difficilement séparables des MTs (Stone and Overnell 1984).

1.3.2- Régulation et aspects génétiques:

Plusieurs facteurs, incluant métaux, hormones et interférons, régulent la transcription des MTs, la présence d'éléments de régulation autres que les métaux, indique que l'expression du gène des MTs est complexe et influencée par des états métaboliques qui ne résultent pas toujours d'une exposition aux métaux (Roesijadi 1992). Par exemple, chez la truite arc-en-ciel, le taux de MTs hépatique fluctue en fonction de l'état gonadique, ceci étant une réponse possible au besoin métabolique en zinc (Olsson et al. 1987). Le stress dû au transport et aux manipulations de laboratoire est aussi connu pour induire les MTs (Baer and Thomas 1990). L'expression de l'ARNm des MTs est régulée en fonction du développement chez les oursins (Wilkinson and Nemer 1987) et les poissons (Olsson et al. 1990).

1.3. 3- Fonction des MTs:

La fonction des MTs, encore énigmatique, serait de jouer un rôle dans la régulation intracellulaire des métaux lourds. La première découverte des MTs étant corrélée à son haut contenu en cadmium, on lui avait donc assimilé un rôle de détoxification vis-à-vis de ce dernier. Pourtant, le contenu en métal des MTs purifiées est très variable et dépend des organismes, des tissus et de l'histoire

d'exposition aux métaux lourds. Par exemple les MTs extraites d'un foie humain ont un haut contenu en zinc tandis que dans le même individu, les MTs isolées dans le rein contiennent du cadmium et du cuivre. Ces différences sont probablement dues à l'exposition différente des organes aux métaux lourds mais aussi à l'expression de différentes isoformes de MTs.

Aujourd'hui, sachant que les MTs se retrouvent dans quasi tous les organismes et qu'elles complexent des métaux tels que le zinc et le cuivre, son rôle au niveau cellulaire serait plus en rapport avec un métabolisme général des métaux (essentiels ou non essentiels) pour l'organisme.

1.4- Quelques caractéristiques communes aux éléments métalliques:

Les métaux (essentiels ou non nécessaires) présentent quelques caractéristiques communes dont certaines sont reprises ici.

Dans l'environnement, ils se trouvent sous la forme de cation, à l'état d'oxydation +2, mais plusieurs formes ioniques peuvent se trouver dans l'eau et dans les sols. En milieu aquatique, on rencontre ces éléments sous diverses formes physiques (dissoute, colloïdale, particulaire) et chimiques. Ils peuvent également être accumulés dans les tissus des organismes aquatiques (animaux ou végétaux). Leur présence dans les eaux peut être attribuée à l'érosion des sols par les cours d'eau ou le ruissellement, à la contamination des sols ou des cours d'eau par des engrais ou des déversements directs accidentels, à des rejets d'eaux usées qui contiennent encore des métaux, même après traitement.

1.4.1. Cadmium (Cd):

Le cadmium est un métal qui appartient à la famille des métaux de transition. C'est un élément relativement rare qui n'existe pas naturellement à l'état natif. Il est présent dans la croûte terrestre à des concentrations d'environ 1 à 2 ppm, où il est

souvent associé au zinc (Zn) et au plomb (Pb). Il est également obtenu comme sous-produit de raffinage du plomb et du cuivre.

Les principaux domaines d'utilisation du cadmium sont la galvanoplastie, la fabrication d'accumulateurs alcalins, les alliages et l'industrie nucléaire. Les principales sources de rejet de cadmium dans l'atmosphère sont liées aux activités industrielles telles que le raffinage des métaux non ferreux, la combustion du charbon et des produits pétroliers, les incinérateurs d'ordures ménagères et la métallurgie de l'acier. Dans les milieux aquatiques, le cadmium provient de l'érosion naturelle, du lessivage des sols (engrais phosphatés), de sa dissolution de certaines canalisations galvanisées ou en matière plastique ainsi que des décharges industrielles et du traitement des effluents industriels et des mines.

Le cadmium n'est pas essentiel au développement des organismes (animaux ou végétaux) et ne participe pas au métabolisme cellulaire. En revanche, ses propriétés physiques et chimiques, proches de celles du calcium, lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus, le cadmium contamine les sols, les plantes (mousses et lichens) et les organismes aquatiques (mollusques, crabes, poissons). La toxicité du cadmium a été beaucoup étudiée pour les poissons d'eau douce, ce qui a conduit à la recommandation, au moyen d'une norme européenne, de ne pas dépasser une concentration de 5 µg/L. La dureté de l'eau et la température influent sur la toxicité du cadmium pour les poissons, spécialement au stade juvénile.

Les données issues des tests de toxicité effectués sur des macroinvertébrés suggèrent que ce sont les crustacés qui sont les espèces les plus sensibles. En ce qui concerne l'être humain, la cigarette est considérée comme la principale source d'absorption du Cd chez l'Homme. Parmi les pathologies que le cadmium provoque pour l'être humain, on distingue : l'hypertension, l'anémie, des anomalies cardiaques, des altérations du foie et des reins.

Le cadmium (Cd): est bioaccumulable et répertorié comme toxique par l'INRS sous ses formes sulfure et oxyde de cadmium. C'est une substance classée « dangereuse prioritaire » par la Directive Européenne 2000/60/CE [AERMC, 2002].

Le cadmium est un élément chimique de symbole Cd et numéro atomique 48. C'est un élément toxique et écotoxique, considérés comme parmi les plus problématiques en termes de santé environnementale parmi les éléments traces métalliques et métaux lourds. Des analyses géostatistiques ont montré que dans certaines régions de monde, dont en France, certains sols (sédimentaires marins) présentent naturellement une teneur élevée en cadmium (avec des risques de contamination de végétaux ou d'animaux et de l'eau). Certains engrais (phosphatés) sont aussi une source possible de contamination des sols.

1.5.2-Cuivre (Cu):

Le cuivre existe à l'état natif et extrait d'une grande variété de minerais. Il se rencontre surtout sous forme de sulfures CuS et Cu_2S dans la tétrahédrite et l'énargite, et sous forme d'oxydes. Le minerai le plus important est la chalcopryrite. La teneur en cuivre dans les minerais varie de 0,5 à 5 %. Elle est de 0,01 % dans les roches volcaniques et de 0,0055 % dans les roches cristallines. Le cuivre est l'un des métaux les plus employés à cause de ses propriétés physiques et de sa conductibilité électrique et thermique. Il est utilisé dans la métallurgie, dans la fabrication des alliages de bronze (avec étain), de laiton (avec zinc) ou de joaillerie (avec or et argent). Il est très largement employé dans la fabrication de matériels électriques (fils, enroulements de moteurs ...), dans la plomberie, dans les équipements industriels, dans l'automobile (garnitures de freins), et en

chaudronnerie. Les sels de cuivre sont utilisés dans l'industrie textile, les tanneries, l'industrie de la photographie, les fongicides, les traitements de surface et en agriculture.

Le cuivre est présent dans l'environnement de manière ubiquiste. Les principales sources anthropiques sont l'industrie du cuivre et des métaux en général, l'industrie du bois, l'incinération des ordures ménagères, la combustion de charbon, d'huile et d'essence et la fabrication de fertilisants (phosphate). Le milieu le plus exposé au cuivre est le sol: 97 % du Cu libéré dans l'environnement s'y retrouve contre seulement 3 % dans les eaux et 0,04 % dans l'air .

Le cuivre est indispensable au métabolisme des êtres vivants (oligo-éléments). L'ion Cu^{2+} forme de nombreux complexes solubles stables avec des ligands minéraux, comme les chlorures ou l'ammonium, ou avec des ligands organiques. L'oxyde cuivreux Cu_2O est insoluble dans l'eau alors que les formes sulfates, chlorures, nitrates le sont. Dans l'eau, le cuivre particulaire représenterait de 40 à 90 % du cuivre. En milieu aquatique et dans la phase soluble, la biodisponibilité et la toxicité du cuivre peuvent être favorisées par des molécules complexantes organiques synergiques qui sont liposolubles et par conséquent capables de traverser les membranes cellulaires.

Le cuivre est un élément chimique de symbole **Cu** et de numéro atomique 29. Naturellement présent dans la croûte terrestre, il est essentiel au développement de toute forme de vie.

Il est majoritairement utilisé par l'homme sous forme de métal. Le cuivre pur est un des seuls métaux colorés (voir la section Propriétés physiques). Il présente sur ses surfaces fraîches une teinte rose saumon et est aussi appelé le « métal rouge » ; à l'état « pur », on parle parfois de **cuivre rouge** pour le distinguer de ses formes alliées, dites « cuivre jaune ». Métal ductile, il possède des conductivités

électriques et thermique particulièrement élevées qui lui confèrent des usages variés. Il intervient également comme matériau de construction et entre dans la composition de nombreux alliages.

Le cuivre est le plus ancien métal utilisé par l'homme⁸. Les plus anciennes traces de fusion du cuivre dans des fours à vent ayant été découvertes dans le plateau iranien sur le site archéologique de Sialk III daté de la première moitié du V^e millénaire av. J.-C. — il y a donc près de sept mille ans. Allié à l'étain, il donna lieu à une révolution technologique, « l'âge du bronze », aux alentours de 2 300 ans avant notre ère.

L'histoire méditerranéenne du cuivre est intimement liée à l'île de Chypre : c'est en effet sur cette île que furent exploitées les premières mines de cuivre natif, qui permirent aux civilisations minoenne, mycénienne et phénicienne de prospérer. Elles organisèrent le commerce du métal rouge en Méditerranée, si bien que les Romains l'appelèrent *aes cyprium* (littéralement « métal de Chypre »), issu du grec ancien Κύπρος désignant l'île elle-même. Le terme s'est transformé au fil du temps pour devenir « cuivre ».

1.8.3 Le plomb: est un élément chimique de la famille des cristallogènes de symbole Pb et de numéro atomique 82. Le mot et le symbole viennent du latin *plumbum*.

Le plomb est un métal gris bleuâtre, blanchissant lentement en s'oxydant, malléable. C'est un élément toxique, mutagène, et protoxique⁹, sans valeur connue d'oligoélément. Il a en effet été classé comme *potentiellement* cancérigène en 1980, classé dans le groupe 2B par le CIRC¹⁰ puis comme *probablement* cancérigène pour l'homme et l'animal en 2004^{10,11}. Deux sels de plomb (chromate de plomb et

et arséniate de plomb), sont considérés comme carcinogènes certains par le CIRC¹⁰.

Le plomb est un contaminant de l'environnement, toxique et écotoxique dès les faibles doses¹². Les maladies et symptômes qu'il provoque chez l'homme ou l'animal sont regroupées sous le nom de « saturnisme ».

1.6 Présentation des métallothionéines:

1.6.1 Historique:

Dans les années 1940, il a été pour la première fois découvert la présence de métal notamment le Cadmium (Cd) dans de nombreux tissus humains. Ces travaux ont alors entraîné l'hypothèse selon laquelle le Cd se lierait à une ou plusieurs molécules de taille importante, et serait un polluant cellulaire (Maliuga en 1941 puis Voinar en 1953). C'est en 1957 avec Margoshes et Vallee que furent découvertes les métallothionéines (MTs). A partir de l'isolement du cortex d'un rein de cheval, des travaux ont montré la présence d'une petite protéine à forte teneur en Cd. En 1960 elle fut nommée : métallothionéine en raison de son importante concentration en métaux, en cystéine (Cys), et d'une protéine riche en soufre : la thionéine.

A partir de ces découvertes, les scientifiques ont voulu préciser la nature de cette protéine. Des milliers de travaux furent publiés entre 1957 et aujourd'hui, les domaines de recherches sont nombreux: Biochimie, Médecine, Biologie Moléculaire, Toxicologie, Physiologie.....

Cinquante années de recherches ont montré la complexité de cette protéine, notamment sur sa fonction et son rôle. Il est aujourd'hui difficile de définir clairement ce que sont les métallothionéines, et quel est leur rôle physiologique.

1.8.2 Définition:

Les métallothionéines sont des protéines de faible poids moléculaire intervenant dans les phénomènes de détoxification cellulaire, résistance au stress et biodisponibilité cellulaire en métaux essentiels.

Historiquement, les métallothionéines furent découvertes en 1957 par Margoshes et Vallee. Elles sont omniprésentes chez les organismes vivants et disposent de caractéristiques physico-chimiques et structurales qui leurs sont propres. C'est à partir de ces caractéristiques que fut développée une classification en quatre divisions. Un aspect remarquable de la Composition des métallothionéines est l'abondance d'un acide aminé particulier, la cystéine.

La structure spatiale des métallothionéines est telle que ces protéines peuvent fixer les ions métalliques par l'intermédiaire de ces cystéines.

La régulation des métallothionéines est assurée par un mécanisme basal (production constante) et un mécanisme induit (réponse au stress). A l'heure actuelle, les découvertes sur les métallothionéines restent toujours hypothétiques et leurs rôles flous.

1.6.3 Rôles:

Les MTs sont omniprésentes sur notre planète, elles ont été observées dans le règne animal, végétal et chez les procaryotes*.

Contrairement aux métalloenzymes, les MTs n'ont aucune action enzymatique.

La MT est une petite protéine (de faible poids moléculaire: entre 6 et 10 kDa). Qui se caractérise par leur structure et leur haute affinité pour les ions métalliques, MTs sont composées de 60 à 70 acides aminés dont une forte proportion de Cys (30%). Cette chaîne d'acides aminés est dépourvue d'acides aromatiques (tyrosine, phénylalanine, tryptophane) ou hydrophobiques et d'histidine. Les MTs présentent une forte résistance à la coagulation thermique et à la précipitation acide.

De plus, les MTs comme de nombreuses protéines absorbent à différentes longueurs d'ondes selon le métal lourd lié : 225nm pour le Zinc (Zn), 250nm pour le Cd, 275nm pour le Cuivre (Cu) et 300 pour le Mercure (Hg).

Les Cys sont donc responsables de l'affinité aux métaux et la conservation de ces positions en prouve l'importance fonctionnelle. Par ailleurs, il a été prouvé que la présence de Cd, de Cu ou de Zn induisait la production de MT.

Quelques rôles semblent récurrents dans l'organisme:

- La MT peut libérer ou capter des ions métalliques pour maintenir l'homéostasie (équilibre des concentrations) en ions Zn et Cu.
- La MT joue également un rôle important en modulant la toxicité des métaux lourds tels que (plomb, mercure, cadmium,...)
- La MT protège les cellules contre les effets cytotoxiques de réactions d'oxydation, radiations ionisantes, drogues et agents mutagènes anticancéreux électrophiles, métaux...
- les MTs ont une importance dans la régulation de la biodisponibilité intracellulaire du Zn.
- Rôle dans l'activation de métalloprotéines

1.6.4 Classification:

Les métallothionéines sont regroupées en trois classes, sur la base de la localisation de la cystéine dans la chaîne d'acides aminés et du mode de synthèse (Fowlere et al., 1987):

La première classe (MT-1) des MTs : regroupe les polypeptides ayant leurs cystéines très proches du positionnement de celles du cortex de rein de cheval (Première découverte des MTs, origine des recherches). Cette classe regroupe les MTs des vertébrés, des mollusques et des crustacés.

La seconde classe (MT-2) : contient les polypeptides dont le positionnement des Cys est éloigné du premier modèle observé chez le cortex de rein de cheval. On retrouve ici les MTs observées chez les Levures en 1985 par Winge.

La troisième classe (MT-3) : comprend les polypeptides n'entrant dans aucune des deux premières classes. Leur structure primaire est différente, On y retrouve les cadystines (Hayashi et al. 1986), les phytométallothionéines et les phytochélatines (Bernhard et al. 1987; Grill, 1987; Rauser, 1990; Robinson et al. 1993).

La classification selon des caractéristiques structurales nous amène à nous intéresser plus particulièrement à la structure de ces MTs.

1.6.4 La structure des métallothionéines:

1.6.4.1 Structure primaire:

Les banques de données référencent plus de mille séquences de MTs mais leur composition reste sensiblement la même.

Une MT est une protéine, donc une chaîne d'acides aminés, dans laquelle peut être incorporé un métal lourd (Zn, Cu, Cd, pb, Hg) sous forme d'ion.

Les premières découvertes ont permis l'isolement de la première séquence de MT, et par conséquent de dégager un modèle structural des MTs.

On y retrouve les motifs suivants:

- Cys-X-Cys,
- Cys-X-X-Cys ou,
- Cys-Cys (le X étant un acide aminé autre que la Cystéine).

La MT chez les Vertébrés est composée d'une soixantaine de résidus, les acides aminés aromatiques et hydrophobes sont absents dans ces séquences protéiques.

Les MTs sans ions métalliques sont appelées apométallothionéines ou thionéines.

La thionéine existe in vivo et possède la capacité de se fixer aux ions métalliques des Ib et IIb.

Le contenu en métaux des MTs est donc variable suivant l'organisme, le tissu ou l'exposition à ces métaux. D'autres facteurs physico-chimiques viennent à modifier la structure des MTs.

1.6.4.2 Structure spatiale:

Chez l'Homme, la MT compte 68 acides aminés, de même chez la souris. Le rat, lui, n'en compte que 66 mais pour ces trois espèces on retrouve la même structure, le même nombre de résidus Cys et la même position de ces Cys. Il y a sept acides aminés en plus chez l'Homme: 1 Thréonine en position amino-terminale (N-terminale) et six acides aminés (Glutamine et Alanine) en position carboxy-terminale (C-terminale).

La structure de la MT, lui permet de fixer les ions métalliques. Les apométallothionéines sont très désordonnées contrairement aux MTs complexées avec des ions métalliques. Les acides aminés, autres que des Cys, contribuent à la fixation des ions métalliques en créant des espaces vides flexibles pour ces ions. Les résidus Cys, quant à eux, permettent de complexer jusqu'à sept ions divalents (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} ...) par molécule de MT. Ces Cys adoptent une conformation repliée sur les métaux, leur position est telle que les atomes de Soufre des Cys sont présentés aux ions métalliques pour qu'ils puissent s'y fixer. Ils sont orientés vers le centre d'un tétraèdre. Cette disposition est caractéristique des métaux comme le Cd ou le Zn, en revanche le Cu et l'Argent (Ag) adoptent des géométries différentes.

On note alors l'apparition de deux domaines de tailles similaires (15 à 20 Å) au sein de cette structure tridimensionnelle.

□ Tout d'abord un domaine β pour les résidus 1 à 30 (en position N-terminale). Il permet la fixation de trois ions métalliques divalents par l'intermédiaire de neuf Cys.

□ Puis un domaine α en position C-terminale (résidus 31 à 60) qui peut fixer quatre ions métalliques grâce à onze Cys.

Ces deux domaines sont reliés entre eux par deux Lysine (en position 30 et 31) qui forment un pont flexible entre les deux sites actifs de la MT. Il a été montré que l'affinité des deux domaines pour les métaux était différente. Le domaine β fixe plus facilement Cu et Ag alors que le domaine α fixe en priorité Zn et Cd. De plus, une fois qu'un ion est fixé à un domaine, il lui est toujours possible d'en changer, un domaine (α ou β) peut fixer jusqu'à six ions monovalents comme le Cu^+ .

Même si cette structure générale est commune à beaucoup de MT, il existe un polymorphisme de ces molécules.

3. Justification:

Métallothionéine:

Les connaissances qui vont être acquises lors de ce projet vont permettre de mieux apprécier le potentiel qu'offre la métallothionéine comme indicateur biochimique d'exposition et de toxicité provoquée par les métaux traces toxiques en milieu naturel, les résultats obtenus dans les études précédentes sont encourageants à cet égard mais conservent un caractère préliminaire, à notre connaissance, peu d'évaluation systématiques in situ de ce genre ont été rapportées, dans la littérature. A fin d'exploiter la métallothionéine comme indicateur prédictif d'exposition et de toxicité, il sera nécessaire d'obtenir une

compréhension plus profonde de ses fonctions physiologiques normales et du mécanisme de détoxification dont elle fait partie, dans l'environnement naturel, ces études devront être effectuées sur l'organisme biomoniteur proposé.

1.3-Les biomarqueurs:

La notion de biomarqueur est issue du domaine de l'épidémiologie moléculaire née dans les années 1980. Cette discipline correspond à l'utilisation de la biologie moléculaire et de l'épidémiologie pour comprendre les causes de survenue du cancer, et améliorer la prévention de cette maladie (Perera et al. 2000). En effet, la prise de conscience du caractère multifactoriel de la survenue des cancers, a permis de définir l'influence très importante de facteurs externes non-héréditaires, et notamment de la dose d'exposition à un produit toxique.

Un biomarqueur mesuré au niveau individuel ne trouve sa signification écotoxicologique que lorsqu'il permet de décrire, d'expliquer, voire même éventuellement de prédire, les effets des polluants sur les populations et communautés évoluant dans leur environnement naturel » (Lagadic et al., 1997).

Les biomarqueurs développés à ce jour sont pour l'essentiel des marqueurs précoces d'exposition ou d'effet des contaminants mais ne révèlent pas forcément les effets potentiels à long terme sur l'écosystème. Le développement de biomarqueurs permettant un diagnostic précoce des perturbations à long terme d'un écosystème représente un défi pour les écotoxicologues. Ces biomarqueurs doivent concerner des fonctions physiologiques dont les perturbations agissent sur les paramètres démoécologiques. L'émergence des techniques de biologie moléculaire appliquées à l'écotoxicologie a permis de mieux appréhender les mécanismes d'action des contaminants sur les organismes vivants.

Résumé:

Cette étude a pour objectifs de déterminer la réponse biochimique de la moule exposée à différentes concentrations de cuivre (10; 15 et 30 μ g de Cu/l), de plomb (0,25; 0,5 et 1 μ g de Pb/l) et de cadmium (50; 100 et 200 μ g de Cd/l); pour cela nous avons suivi l'évolution des teneurs en métallothionéines dans 3 organes différents de la moule *Perna perna* (la glande digestive, les branchies et le reste du corps).

Les résultats de cette expérimentation montrent que les différentes doses de plomb et de cuivre n'ont pas d'effet significatif sur l'induction de la métallothionéine au niveau des branchies et du corps des moules traitées; mais en revanche, un effet significatif est décelé au niveau de la glande de ces mêmes moules. Chez les moules exposées à différentes doses de cadmium, nous notons l'absence d'effet significatif sur l'induction de la métallothionéine au niveau des 3 organes étudiés (glandes, branchies et corps de moules).

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude mériteraient d'être complétés par la mise en place d'un protocole expérimental complémentaire.

Mots clés : branchies; glande digestive; corps; moule *Perna perna*; cadmium ; cuivre ; plomb ; métallothionéine ;