

ETUDE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DES METALLOTHIONEINES CHEZ LA DAURADE "*SPARUS AURATA*" EXPOSEE AUX METAUX LOURDS

Jamel JEBALI*^{1a}, Jihene GHEDIRA^{1a}, Z. BOURAOU¹, S. AMEUR³, H. GUERBEJ² et H. BOUSSETTA¹.

1: Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie Environnementale, Institut Supérieur Agronomique de Chott-Mariem, 4042 Chott-Mariem, Tunisie.

2 : Laboratoire d'Aquaculture, INSTM de Monastir, Monastir, 5000, Tunisie.

3 : Laboratoire de Physique, Institut Supérieur Agronomique de Chott-Mariem, 4042 Chott-Mariem, Tunisie.

a : Auteurs ayant contribué d'une façon égale à ce travail

*jebali.jamel@laposte.net

ملخص

دراسة كمية ونوعية " المتلوثيونيين " المركزة في مختلف أعضاء سمك الورقة *Sparus aurata* اثر تعرضها للملوثات المعدنية ، الكاديوم و النحاس : للمعادن الثقيلة انعكاس بيئي سلبي و ذو خطورة عالية على المنظومة البحرية و صحة الكائنات و من بين ها ته المعادن التي يقع إلقاءها في البحر نجد الكاديوم، النحاس، الزئبق و الرصاص. تلعب " المتلوثيونيين " دورا هاما في إزالة التسمم بالتصدي لها ته المعادن في الجسم. في هذا العمل، وقع دراسة " المتلوثيونيين " في بعض أعضاء سمك الورقة *Sparus aurata* اثر تعرضها في المخبر للملوثات المعدنية، الكاديوم و النحاس بمعدل ميكروغرام/كيلوغرام 500 لمدة يومين. لقد أثبتت الدراسة ارتفاع مستوى الملوثات المعدنية، الكاديوم و النحاس في مختلف أعضاء السمك *S. aurata* كما لاحظنا ارتفاعا عال لمستوى الملوثات داخل الكبد. لتخلص من ها ته الملوثات، تفرز السمكة كميات هائلة من " المتلوثيونيين " في مختلف أعضائها. و تأكيدا لهذه الملاحظة فقد سجلنا إفرزا مرتفعا لمستوى الملوثات داخل الكبد تماشيا مع المستوى للملوثات داخل هذا العضو. **الكلمات المفتاحية :** الملوثات المعدنية، الكاديوم، النحاس " المتلوثيونيين"، أعضاء السمك، *Sparus aurata*

RESUME

Dans l'environnement marin, les éléments traces peuvent s'accumuler dans les organismes à des concentrations supérieures à celles présentes dans l'eau. L'étude de la distribution tissulaire des métaux traces au niveau des organismes qui y sont exposés, constitue un aspect très important pour la compréhension de leur devenir. En outre, le suivi de la réponse biologique spécifique de ces organismes sentinelles aux xénobiotiques complète et consolide l'analyse chimique.

Ce travail vise à étudier la distribution tissulaire des métaux traces et des métallothionéines (MTs) chez la daurade «*Sparus aurata*» traitée par un métal essentiel (le cuivre) et un métal non essentiel (le cadmium) à une concentration de 500µg/Kg de poids frais pendant 48 heures. L'exposition de *S. aurata* aux deux métaux provoque une accumulation différentielle selon l'organe avec un maximum de bioaccumulation au niveau du foie. L'induction des MTs est significative au niveau des branchies et des reins avec une teneur maximale au niveau du foie.

La plus haute teneur des MTs observée au niveau du foie est corrélée aux fortes concentrations de Cu et de Cd. La forte induction des MTs au niveau de différents organes des poissons traités confirme les rôles des MTs dans l'homéostasie et la détoxification des métaux lourds de l'organisme. Par spectroscopie d'impédance nous a montré que le cuivre a un pouvoir inducteur des MTs plus puissant que le cadmium.

Mots clés : métaux lourds, *Sparus aurata*, métallothionéines, spectrophotométrie d'absorption atomique, spectroscopie d'impédance, dosage spectrophotométrique.

ABSTRACT

Quantitative and qualitative study of the metallothioneines of the sea bream "*Sparus aurata*" exposed to heavy metals : Marine ecosystem is threatened by increasing levels of various pollutants originating from human activities, urban, agricultural and industrial discharges. Such situation endangers health of organisms inhabiting marine ecosystem. Among anthropogenic contaminants, heavy metals were widely detected in sediments at different orders of magnitude. Investigation heavy metals organotropism for exposed organisms is a very important since let to comprehension of pollutant behaviour (Geret, 2000).

Levels of metallothionein (MTs), (biomarker of metal exposure) were determined in *Sparus aurata* intraperitoneally injected with 500µg/Kg of Cu and Cd for 2 days. MTs levels and metal concentrations (Cd and Cu), were determined in liver, gills and kidney. MTs levels increased significantly in all tissues with highest level in liver with (3.56 fold and 3.39 fold of Cu and Cd respectively). Metal concentrations were significantly different between investigated tissues. Highest Cd and Cu concentrations were observed in liver.

Higher MTs induction levels in different tissues of treated fishes support the main role of MTs in metal homeostasis and detoxification. Else MTs analysis by spectroscopic of impedance showed that copper was stronger MTs inducing than the cadmium.

Keywords: metallothionein; trace metals; *Sparus aurata*; spectroscopic of impedance.

INTRODUCTION

Parmi les polluants déversés dans le milieu marin et représentant une sérieuse menace pour les organismes vivants, figurent les métaux traces et leurs dérivés. Ainsi ces métaux sont souvent solubles dans la colonne d'eau ou liés aux particules du sédiment et peuvent s'accumuler dans les organismes vivants à des concentrations supérieures à celles présentes dans l'eau (Ramade, 1995 ; Van Der Oost et al., 2003).

Le cuivre (Cu) élément essentiel aux processus métaboliques de la cellule, à faible dose constitue un cofacteur par plusieurs enzymes cellulaires. Cependant, à forte concentration il peut être toxique pour les poissons (Paris Palacios et al. 2000). Cette forte concentration en Cu dériverait de différents processus géochimiques et anthropogéniques (agriculture, rejets urbains et industriel) (Geffard, 2001). Il est à préciser que le Cu est aussi utilisé dans l'aquaculture pour le traitement algal et l'infection ectoparasitaire.

Le cadmium (Cd) un autre polluant présent dans les milieux aquatiques et plus en milieu marin par le biais d'activités différentes notamment activités anthropogéniques. L'effet du Cd sur les poissons a été largement rapporté en bibliographie (Vaglio and Landriscina 1999; Jebali et al. 2006 ; Jebali et al., 2008).

Les métallothionéines (MTs) sont des protéines de faible poids moléculaire (6 à 7 KDa), exceptionnellement riches en cystéines et en zinc (6 à 7 atomes par molécule de protéine), totalement dépourvues d'acides aminés aromatiques et d'histidine (Cosson, 1992). Présentes chez presque tous les organismes, ces protéines sont détectées dans pratiquement tous les tissus étudiés et atteignent des concentrations maximales dans des organes tels que le foie, les reins et l'intestin (Roesijadi et al., 1997 ; Roméo et al., 1997 ; Van Den Hurk et al., 2000).

Chez les mammifères, les métallothionéines sont formées de près de 62 acides aminés (6 KDa) alors que chez la daurade, *Sparus aurata*, elles présentent 60 acides aminés dont 20 cystéines pour un poids moléculaire de 5,966 KDa (Tom et al., 1998).

Présentes chez presque tous les organismes, ces protéines sont détectées dans pratiquement tous les tissus avec des concentrations maximales dans le foie, les reins et l'intestin (Roesijadi et al., 1997 ; Roméo et al., 1997 ; Van Den Hurk et al., 2000).

Les MTs interviennent dans la régulation homéostatique des métaux essentiels (Cu et Fe), la détoxification des métaux non essentiels (Cd et Hg)

et participent à des fonctions métaboliques dont le piégeage des radicaux libres (Roesijadi et al. 1997).

Présentes à faibles doses en absence de polluant ou contaminant, il a été démontré qu'à la suite d'une exposition à des doses sublétales de certains métaux tels que le cadmium, le cuivre, le mercure, le zinc ou l'argent, il y a induction de la synthèse de la thionéine et liaison de l'apoprotéine au métal pour former une métallothionéine (Baudrimont et al., 2003).

La relation directe entre accumulation en polluants métalliques et induction des métallothionéines est utilisé en biosurveillance et définit un marqueur biologique (Gagné et al., 1990 ; Roesijadi et al., 1997). Cependant, leur fonction biologique n'est pas bien défini à ce jour (Cattani et al., 1996 ; Norberg, 1998 ; Filipović et Raspor, 2003).

Ce biomarqueur pour la biosurveillance de l'impact des métaux sur les organismes en environnement marin a été validé et de nombreux programmes de biosurveillance utilisant cet indice autour de la Méditerranée (Hamza-Chaffai et al., 1995 ; Viarengo et al., 1997 ; Baudrimont et al., 2003 ; Banni, 2007).

Différentes techniques et méthodologies ont été récemment développées pour la quantification des métallothionéines. Les techniques immunologiques (ELISA), radio-immunologique (RIA), spectrophotométriques (Viarengo et al., 1997), chromatographiques (Jebali et al., 2008), et plusieurs techniques électrochimiques ont été utilisées avec succès (Erk et al., 2002).

Le présent travail vise à évaluer l'accumulation du Cuivre et du cadmium dans le foie, les branchies et les reins chez *S. aurata* exposée "in vivo" à 500 µg/Kg de Cu et de Cd ainsi que l'évaluation de l'induction de métallothionéine au niveau de ces organes par deux méthodes la spectrophotométrie d'absorbance et la spectroscopie d'impédance.

MATERIEL ET METHODES

Traitement des poissons

Une quarantaine de daurades, *Sparus aurata* de poids corporel de 100 - 150 g, de longueur de 20 - 30 cm issus d'élevage de l'Institut National des Sciences et Techniques de la Mer centre de Monstir (INSTM), sont répartis en lots de 10 individus chacun et placés dans des aquariums de 280 L d'eau de mer avec un renouvellement continu d'eau filtrée par un filtre à sable avec un taux de renouvellement de l'ordre de 3m³/heure et une aération permanente. La température et la salinité de l'eau sont respectivement 18 °C et 38 ‰. Les poissons sont gardés pour

préadaptation dans ces conditions pendant deux semaines avant expérimentation. Les échantillons sont injectés une fois par voie intraperitonéale de solution de NaCl (9 ‰) pour les témoins, soit une dose de 500 µg/Kg de poids corporel de Cu ou de Cd pour les traités. Ces concentrations ont été rapporté dans la bibliographie comme des doses fortement inférieures aux doses léthales DL50 (Castano et al. 1996; Roméo et al. 1997) Les poissons traités et témoins sont sacrifiés après 48 heures d'exposition. Le foie, les branchies et les reins sont prélevés soigneusement, rincés avec une solution de KCl (9‰). Chaque organe est séparé en deux parties, une pour l'analyse des MTs et l'autre pour dosage chimique du Cd et du Cu.

Dosage des métaux traces

Le dosage des éléments métalliques (Cd et Cu) a été réalisé sur un pool de tissu (foie, branchies, reins). Après homogénéisation, les échantillons ont été lyophilisés broyés et minéralisés.

Le dosage du cadmium et du cuivre a été effectué par spectrophotométrie d'absorption atomique en utilisant un four à graphite et un correcteur de fond continu à effet Zeeman. Pour chaque série d'échantillons, un blanc de digestion et un échantillon de référence de concentration connue ont été analysés et ceci pour assurer le contrôle qualité des résultats (UNEP/COI/AIEA/FAO., 1994).

Préparation des fractions enrichies en métallothionéines

L'analyse qualitative et quantitative des métallothionéines a été réalisée sur la fraction enrichie en métallothionéines obtenue à partir du (foie, branchies et reins) de *S. aurata* traitée ou non par 500 µg/Kg de Cu ou de Cd. Le tissu a été homogénéisé dans 3 volumes de Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 contenant 0,5 M de sucrose, 0,006 mM de leupeptin, 0,5 mM de PMSF et 0,01% de β-mercaptoéthanol. L'homogénat est centrifugé à 30 000 x g pendant 20 min. Pour 1 ml de surnageant obtenu, on ajoute 1,05 ml éthanol absolu et 80 µl de chloroforme. Le mélange obtenu est centrifugé à 6 000 x g pendant 10 min à 4°C. Pour un volume V de surnageant, on ajoute 1 mg de RNA, 40 µl de HCl 37% et 3 volumes d'éthanol absolu. Après incubation d'une heure à -20°C, le mélange est centrifugé à 6 000 x g pendant 10 min à 4°C. Le culot contenant les métallothionéines est lavé par 2 ml d'éthanol 87%, 1% de chloroforme et 12% de tampon de lyse. Après une centrifugation à 6 000 x g pendant 10 min à 4°C, le culot obtenu est dissout dans 300 µl d'une solution composée de 150 µl de NaCl 0,25 M, et 150 µl de HCl 1 N contenant de EDTA 4 mM.

Cette fraction enrichie en MTs servira pour l'analyse qualitative et quantitative des MTs (Viarengo et al., 1997).

Dosage spectrophotométrie d'absorbance

Pour chaque fraction enrichie en MTs on ajoute 4,2 ml d'une solution de phosphate de sodium 0,2 M, pH 8, contenant de NaCl 2 M et de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque 0,43 mM. Après centrifugation à 3 000 x g pendant 5 min, l'absorbance est mesurée à 412 nm. La teneur en MTs est estimée en utilisant le glutathion réduit GSH comme standard (Viarengo et al. 1997).

Analyse qualitative des MTs par spectroscopie d'impédance

L'analyse consiste à utiliser Les lames en or comme transducteur préalablement nettoyé par l'éthanol absolu pendant 5 min pour l'élimination de toute contamination éventuelle puis les lames sont rincées en eau ultra pure et séchées sous flux d'azote gazeux. On dépose sur la lame d'or, 60 µl de la fraction enrichie en MTs précédemment préparé. On laisse les groupements SH- des MTs se fixer sur la surface de la lame d'or pendant 24 h.

Toutes les mesures électrochimiques ont été conduites en utilisant le potentiostat SI1287 de Solartron couplé à l'analyseur d'impédance 1255B de Schlumberger. Les résultats d'impédances ont été obtenus respectivement par les logiciels Zplot et Corrware fournis par Scribner.

En spectroscopie d'impédance, l'électrode de travail est soumise à une perturbation sinusoïdale de 10 mv d'amplitude induisant en retour un courant sinusoïdal, superposé au courant stationnaire et déphasé d'un angle φ. L'impédance étant le rapport de la tension sur le courant.

EXPRESSION DES RESULTATS

Les taux de métallothionéines sont exprimés en µg / g de tissu et les teneurs des métaux étudiés sont exprimées en µg / g de tissu frais.

Les valeurs sont exprimées en moyenne affectée par la déviation standard ($m \pm DS$), correspondant à 5 répétitions pour chaque traitement.

La comparaison des moyennes est effectuée par analyse de variance (ANOVA) et par le test de Duncan en utilisant le logiciel SPSS (Version 10.0, Microsoft).

RESULTATS

Les teneurs en Cd et en Cu ont été évaluées chez *S. aurata* exposé par voie intrapéritonéale au Cd et au Cu à 500 µg/Kg pendant 48h. La distribution tissulaire du Cd et du Cu est rapportée dans le Tableau I.

Chez les poissons témoins, les teneurs en Cd au niveau du foie et des branchies sont plus élevées que celles au niveau des reins.

L'accumulation du cadmium se produit plus rapidement au niveau du foie par rapport aux autres organes et atteint une valeur maximale de $10,30 \pm 1,39 \mu\text{g/g}$ de tissu. De plus, une accumulation considérable de Cd a été observée dans le rein et dans les branchies en comparaison avec leurs témoins relatifs avec des valeurs respectives de $0,36 \pm 0,035 \mu\text{g/g}$ de tissu et $0,64 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ de tissu.

La distribution du cuivre dans le foie, les reins et les branchies a été illustrée dans le tableau I. Les résultats montrent une tendance semblable de l'accumulation de Cu à celle du Cd.

Le foie est l'organe principal d'accumulation du Cu avec une valeur de $25,70 \pm 2,40 \mu\text{g/g}$ de tissu.

Cependant l'accumulation du cuivre dans le rein et les branchies était seulement de $3,0 \pm 0,19 \mu\text{g/g}$ de tissu et $6,80 \pm 0,75 \mu\text{g/g}$ de tissu respectivement.

Les taux de Métallothionéines évalués dans le foie, les branchies et les reins du *Sparus aurata* exposée au Cu ou au Cd ont été rapportés dans le tableau II.

Chez les poissons témoins, le niveau maximal d'induction des MTs a été enregistré au niveau du foie en comparaison avec les branchies et les reins. En plus de la forte accumulation du Cu et du Cd, le foie avait aussi la plus haute induction des MTs avec des augmentations respectives de 3,56 et 3,39 fois par rapport au témoin (tableau II).

Tableau I. Teneurs en Cd et en Cu exprimées en $\mu\text{g/g}$ de tissu frais, au niveau du foie, des branchies et des reins de *Sparus aurata* traitée par $500 \mu\text{g/Kg}$ de cadmium ou de cuivre pendant 48 heures.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm DS; n = 5. Les différences significatives entre les groupes traités et le témoin sont désignés par * $p < 0,05$.

	<i>S. aurata</i> exposée à $500 \mu\text{g/Kg}$ de Cd pendant 48 heures		<i>S. aurata</i> exposée à $500 \mu\text{g/Kg}$ de Cu pendant 48 heures	
	Témoin	Cd	Témoin	Cu
Foie	0,48 \pm 0,21	10,30 \pm 1,39*	10,52 \pm 3,20	25,70 \pm 2,40*
Branchies	0,29 \pm 0,09	0,64 \pm 0,10*	2,35 \pm 1,52	6,80 \pm 0,75*
Reins	0,11 \pm 0,02	0,36 \pm 0,04*	0,41 \pm 0,13	3,00 \pm 0,19*

Tableau II: Taux en métallothionéines ($\mu\text{g/g}$ de tissu) évaluées au niveau de foie, des branchies et des reins de *Sparus aurata* traité par $500 \mu\text{g/Kg}$ de cadmium ou de cuivre pendant 48 heures. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm DS; n = 5. Les différences significatives entre groupes traités et témoins sont désignés par * $p < 0,05$; *** hautement significative

	<i>S. aurata</i> exposée à $500 \mu\text{g/Kg}$ of Cd pendant 48 heures		<i>S. aurata</i> exposée à $500 \mu\text{g/Kg}$ of Cu pendant 48 heures
	Témoin	Cd	Cu
Foie	111,97 \pm 17,40	379,80 \pm 109,95***	399,53 \pm 36,66***
Branchies	15,09 \pm 2,32	27,33 \pm 4,07*	22,04 \pm 3,56*
Reins	20,23 \pm 3,54	31,67 \pm 7,70*	28,54 \pm 2,94*

Les spectres d'impédance en diagramme de Nyquist, pour différents tissus (foie, branchies et reins) du *Sparus aurata* exposée au Cu et au Cd à $500 \mu\text{g/Kg}$ sont illustrés par la Figure 1. L'analyse qualitative des MTs réalisée par spectroscopie d'impédance met en valeur l'ordre d'induction de ces protéines selon l'organe et la nature du métal.

Le niveau d'induction des MTs au niveau de foie est supérieur à celui observé au niveau des reins et des branchies. De plus, à une même concentration ($500 \mu\text{g/Kg}$), le cuivre a un effet inducteur des MTs plus important que le Cd, alors que le dosage spectrophotométrique montre que le Cu aussi bien que le Cd ont le même effet inducteur des MTs.

DISCUSSION

L'étude de la répartition tissulaire des métaux traces au niveau des organismes exposés au laboratoire ou dans le milieu naturel, constitue un aspect très important dans la compréhension du devenir de ces polluants dans l'organisme vivant. En effet, le suivi de la réponse biologique spécifique des organismes sentinelles à la présence des contaminants métalliques complémente l'analyse chimique.

L'affinité des ions métalliques pour les sites de fixation des métallothionéines varie selon la nature du métal en question : la stabilité de la liaison de MTs avec le cuivre est 100 fois plus élevée que celle avec

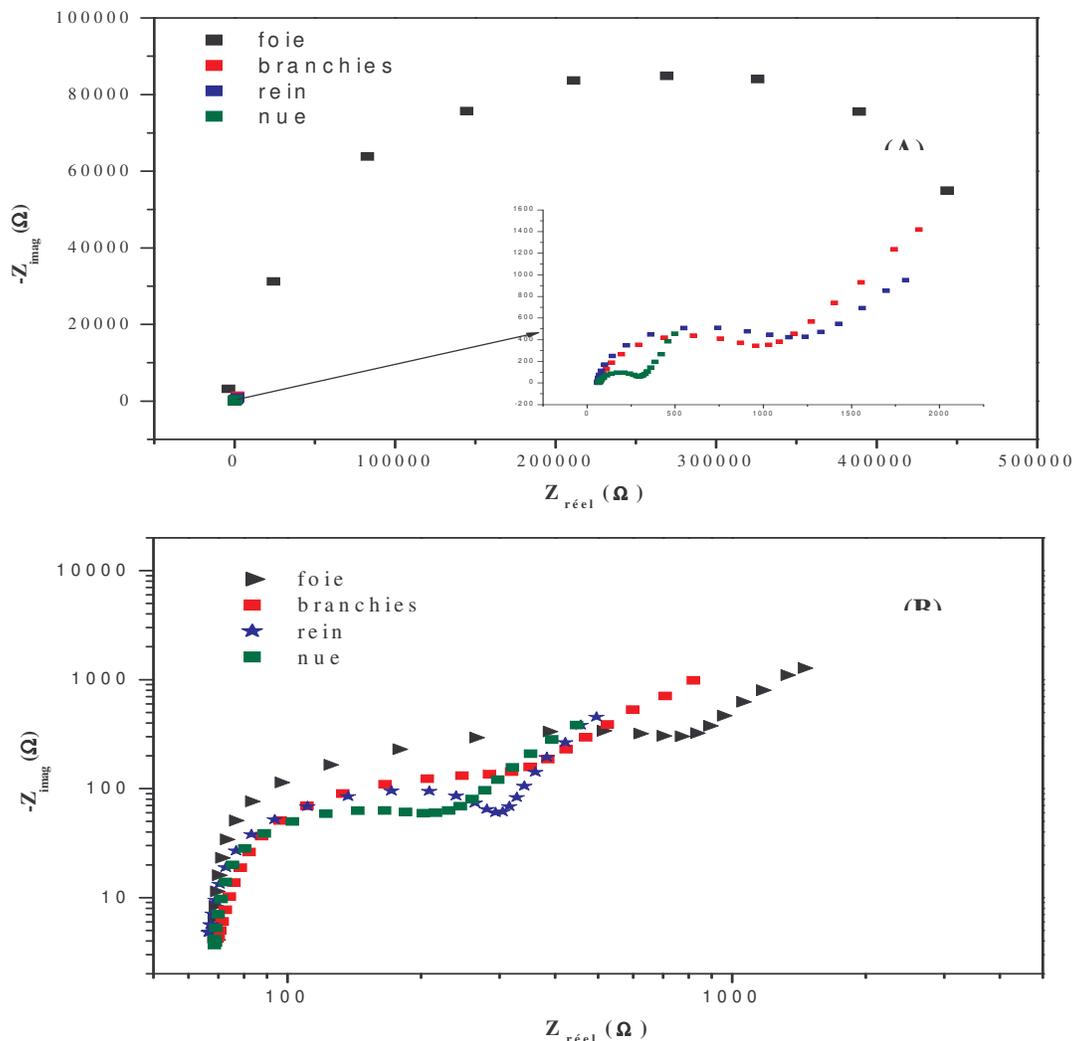


Figure 1 : Spectres d'impédance en diagramme de Nyquist, pour différents tissus (foie, branchies et reins) de *Sparus aurata* exposée à 500 µg/Kg de Cu (A) et à 500µg/Kg de Cd pendant 48h (B).

Le cadmium, elle-même 1000 fois plus forte que celle avec le zinc. Le mercure et l'argent ont une affinité pour les métallothionéines plus grande que celle du cuivre (De Smet et al., 2001; Duquesne, 1994).

Dans ce travail, on s'est intéressé à l'étude qualitative et quantitative des métallothionéines de *Sparus aurata* exposée à des doses sub-létales d'un métal essentiel le cuivre et d'un métal hautement toxique le cadmium. D'un autre côté, on a étudié l'induction différentielle de ces protéines selon l'organe et selon la nature de métal.

Les résultats des dosages chimiques de Cd et de Cu dans les différents tissus des poissons traités révèlent une bioaccumulation de ces métaux au niveau du foie à des concentrations très élevées en comparaison avec les branchies et les reins. En effet, chez les poissons, le foie constitue le carrefour de tout le métabolisme endogène et exogène et par conséquent, il accumule à des teneurs élevées de nombreux métaux pouvant pénétrer dans l'organisme par des voies cutanées,

branchiales et à travers le régime alimentaire (Bendell-Young et al., 1986).

Quelle que soit la voie de contamination des poissons par les métaux lourds (eau, régime alimentaire, injection i.p.), les taux d'accumulations du Cd et de Cu que nous avons trouvés dans ce travail sont similaires à ceux rapportés dans la littérature. Hamza-Chaffai et al. (1995) a rapporté que l'accumulation de Cd et de Cu est plus élevée dans le foie que dans les branchies de trois espèces de poisson: *Diplodus annularis*, *Scorpaena porcus* et *Scorpaena scrofa* collectées d'un site industrialisé de la côte tunisienne. Marijić et Raspor (2006) ont enregistré une accumulation de Cd de 43 fois au niveau du foie et de 5 fois au niveau des reins du *Mullus barbatus* collecté de la baie de kaštela fortement polluée par des rejets urbains et industriels. Le traitement par injection i.p. de *Dicentrarchus labrax* à 1000 ng/g de Cu a montré que le foie est l'organe principal d'accumulation de Cu (Roméo et al. 2000).

Les reins est un organe qui assure le maintien de l'homéostasie et l'élimination des substances potentiellement toxiques chez les poissons. Cependant l'exposition des poissons au Cd et au Cu montre une nette accumulation de ces métaux dans cet organe, toute fois cette accumulation est faible en comparaison, avec celle observée au niveau du foie. Le même résultat a été observé dans les branchies. Ceci pourrait être dû à la mode de contamination utilisée dans ce travail à savoir la voie intrapéritonéale. En effet, des études de contamination de *Dicentrarchus labrax* par bain ont montré une forte accumulation de cadmium au niveau des branchies (Cattani et al., 1996).

Les métaux bioaccumulés au niveau des organes sont fixés par des protéines de type métalloprotéines puis excrétés de l'organisme pour empêcher sa toxicité (Dondero et al., 2005, Banni et al., 2005).

Les métallothionéines, constituent une classe particulière de protéines dont les niveau d'induction reflètent étroitement la présence des métaux traces au sein de l'organisme (Nath, et al., 1988, De smet et al., 2001b ; Lacorne et al., 2001).

Plusieurs travaux ont étudié l'effet du cadmium et du cuivre sur l'induction des métallothionéines comme une stratégie de détoxification (Lieu et al., 1995 ; Roméo et al., 1997 Coyle et al., 2000 ; Jebali et al., 2008). Toutefois, cette induction est fortement variable, en fonction de plusieurs facteurs dont notamment l'organe, le temps d'exposition et la voie de contamination (Roméo et al., 1995).

Dans notre étude, la quantification des niveaux d'induction des métallothionéines au niveau des trois organes a montré que le maximum de production de ces protéines est enregistré au niveau du foie mettant en effet le rôle de cet organe comme siège principal de détoxification (Roméo et al., 1997; Jebali et al., 2006). Des études similaires portées sur la distribution tissulaire des métallothionéines chez plusieurs espèces ont montré que la production est principalement focalisée au niveau du foie, suivi par les reins et les branchies (Hamza – Chaffai et al., 1995 ; De Boeck et al., 2003).

De façon intéressante, nous avons noté que la forte induction des MTs est corrélée à haute accumulation des métaux dans les trois organes ce qui confirme bien le principal rôle des MT dans le maintien de l'homéostasie des métaux chez *S. aurata*. Des résultats semblables sont rapportés par Filipovic et Raspor (2003), qui ont trouvé une haute corrélation entre l'accumulation du Zn et du Cu et l'induction des MTs dans le foie de *M. surmuletus* et de *L. aurata*.

Au niveau moléculaire, la transcription des gènes des MTs est sous la dépendance des éléments régulateurs désignés par MREs (Metal – Responsive – Element). Ces éléments régulateurs présentes en plusieurs copies au niveau de la région promotrice de la plupart

des gènes des MTs. La transcription proprement dite est assurée par l'interaction entre les facteurs de transcription dont le plus connu est le MTF-1 (Metal - Transcription - Factor), avec la région spécifique du promoteur : MREs (Dondero et al., 2005).

L'analyse des MTs par spectroscopie d'impédance met en évidence l'ordre d'induction des métallothionéines selon l'organe et selon la nature du métal étudié. En effet, cette méthode confirme bien que le foie présente le maximum d'induction des MTs par rapport aux autres organes (branchies et reins) quelque soit le métal, le cuivre ou le cadmium. D'autre part, le cuivre a un pouvoir inducteur des MTs plus puissant que le cadmium. Cette méthode est complémentaire à la méthode spectrophotométrique d'absorbance, cependant elle nécessite d'autres études approfondies pour l'améliorer.

CONCLUSION

L'exposition de courte durée de *S. aurata* à des doses sub-létales de Cd et de Cu montre une accumulation différentielle de ces métaux selon l'organe de poisson avec un maximum de bioaccumulation au niveau du foie. L'induction des MTs est significative dans les trois organes (foie, branchies et reins) avec une teneur maximale au niveau du foie.

La plus haute teneur de MTs observée au niveau du foie est corrélée aux fortes concentrations des métaux. La forte induction de MTs chez les poissons traités par le Cd et par le Cu confirme le rôle primordial de ces protéines dans l'homéostasie et la détoxification des métaux lourds chez le poisson *S. aurata*. D'autre part, la spectroscopie d'impédance montre que le cuivre à un pouvoir inducteur de MTs plus puissant que le cadmium.

Remerciements

Les auteurs ont le plaisir de remercier vivement le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique « Unité de Recherche en Biochimie et Toxicologie Environnementale, UR 04AGR05 » pour sa contribution financière à ces travaux de recherche.

BIBLIOGRAPHIE

- Banni M, Dondero F, Jebali J, Guerbej H, Boussetta H & Viarengo A 2007 Assessment of heavy metal contamination using real time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: a validation along the Tunisian coasts. *Biomarkers* 12(4) : 369-383.
- Banni, M., Jebali, J., Daubeze, M., Clerandau, C., Guerbej, H., Narbonne, J.F. and Boussetta, H. 2005. Monitoring pollution in Tunisian coasts : application of a classification scale based on

- biochemical markers. *Biomarkers* 10(2-3): 105-116.
- Baudrimont, M., Andres, S., Durrieu, and Boudou, A. 2003. The key role of metallothionein in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquatic Toxicol.* 63: 89-102.
- Bendell-Young, L., Harvey, H.H., & Young, J.F., 1986. Accumulation of Cadmium by White Suckers in Relation to Fish Growth and Lake Acidification, *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 43, 806-811.
- Castano, A., Carbonell, G., Carballo, M., Fernandez, C., Boleas, S., Tarazona, J.V. 1996 Sublethal effects of repeated intra-peritoneal cadmium injections on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol Environ Saf.*, 41, 29-35.
- Cattani O., Serra R., Isani G., Raggi G., Cortesi P., & Carpena E., 1996. Correlation between metallothionein and energy metabolism in Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 113C, 2, 193-199.
- Cosson, R. 1992. Les métallothionéines. *Anal. Mag.* 20, 50-53.
- Coyle, P., Niezing, G., Shelton, T.L., Philcox, J.C., & Rofe, A.M., 2000. Tolerance to cadmium hepatotoxicity by metallothionein and zinc: In vivo and in vitro studies with MT-null mice. *Toxicology* 150,53-67.
- De Boeck, G., Ngo, T. T. H., Van Campenhout, K., & Blust, R., 2003. Differential metallothionein induction patterns in three freshwater fish during sublethal copper exposure. *Aquat. Toxicol.* 65, 413-424.
- De Smet, H., De Wachter, B., Lobinski, R., & Blust, R., 2001. Dynamics of (Cd, Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.* 52, 269-281.
- Dondero, F., Piacentini, L., Banni, M., Rebelo, M., Burlando, B., & Viarengo, A., 2005. Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene*. Vol (345) 259-270.
- Duquesne, S. 1994. Pollution métallique et biomarqueurs: les métallothionéines. *Anal. Mag.* 22 (1), 20-23.
- Erk, M., Ivanković, D., Raspor, B., Pavičić. 2002. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussels metallothioneins. *Talanta*, 57, 1211-1218.
- Filipović, V., Raspor, B. 2003. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *liza aurata* from the eastern Adriatic sea. *Water research*, 37, 3253-3262.
- Gagné, F., Marion, M. and Denizeau, F. 1990. Metal homeostasis and metallothionein induction in rainbow trout hepatocytes exposed to Cadmium. *Fund. Appl. Toxicol.* 14: 429-437.
- Geffard, O., 2001. Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : Evaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires. Thèse, Université de Bordeaux I, Bordeaux, France.
- Geret, R., Cosson, P., 2000. Utilisation des métallothionéines comme biomarqueur de la contamination métallique : variabilité entre sites et organes chez l'huître *Crassostrea giga*. *Oceanologica acta*, 23(3), 261-271.
- Hamza-Chaffai, A., Cosson, R.P., Amiard-Triquet, C., & El Abed, A., 1995. Physico-chemical forms of storage of metals (Cd, Cu and Zn) and metallothionein-like proteins in gills and liver of marine fish from the Tunisian coasts : ecotoxicological consequences. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* (111).
- Jebali J, Banni M, Almeida E.A, Bannaoui A, Boussetta H (2006) Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. *Fish Physiol. Biochem.* 32: 93-98.
- Jebali J, Banni M, Guerbej H, Boussetta H, Lopez-Barea J, Alhama J (2008). Metallothionein induction by Cu, Cd and Hg in *Dicentrarchus labrax* liver: Assessment by RP-HPLC with fluorescence detection and spectrophotometry. *Marine Environmental Research* 65, 358-363.
- Lacorne, M., Lahrssen, A., Rotzoll, N., Simat, T. J., & Steinhart, H., 2001. Quantification of metallothionein isoforms in fish liver and its implications for biomonitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 140-145.
- Liu, Y., Liu, J., Iszard, M.B., Andrews, Palmiter, R.D., & Klaassen, C.D., 1995. Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 135, 222-228.
- Marijić V, Raspor B (2006) Age and tissue-dependant metallothionein and cytosolic metal distribution in a native Mediterranean fish, *Mullus barbatus*, from the Eastern Adriatic sea. *Comparative Biochem. Physiol. part C* (143): 382-387.
- Nath, R., Kambadur, R., Gulati, S., V.K., & Sharma, M., 1988. Molecular aspects, physiological function, and clinical significance of metallothioneins. *Crit. Rev. Food Nutr.* 27, 41-85.

- Norberg, M. 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta*, 46, 243-254.
- Paris-Palacios S, Biagianni-Risbourg S, Fouley A, Vernet G (2000) Metallothionein in liver of *Rutilus rutilus* exposed to Cd²⁺. Analysis by metal summation, SH determination and spectrophluorimetry. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* (126): 113-122.
- Ramade, F., 1995. *Eléments d'écologie : écologie appliquée*. Ediscience. 631 p.
- Roesijadi, G., Hansen, K.M., Unger, M.E. 1997. Concentration-response relationship for Cd, Cu, and Zn and metallothionein mRNA induction in larvae of *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118C (3), 267-270.
- Roméo, M., Cosson, R.P., Gnassia-Barelli, M., Risso, C., Stien, X., Lafaurie, M. 1997. Metallothionein determination in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* treated with copper and B(a)P. *Marine Environmental research*, 44 (3), 275-284.
- Roméo, M., Gnassia-Barelli, M., 1995. Metal distribution in different tissues and in subcellular fraction of the mediterranean clam *Ruditapes decussatus* treated with cadmium, copper or zinc. *Comp. Biochem. Physiol. Vol. 111 (C3)*, pp. 457-463.
- Roméo M, Bennani M, Gnassia-Barelli M, Lafaurie M. And Girard J.P (2000) Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicol.* 48: 185-194.
- Tom M, Moran O, Jabukov E, Cavari B, Rinkevitch B (1998) Molecular characterization of metallothionein-cDNA of *Sparus aurata* used for detecting heavy metal pollution along the Mediterranean coast of Israel. *Mar. poll. Bull.* 36: 131-137.
- UNEP/COI/AIEA/FAO., 1994. Programme de surveillance continue des contaminants utilisant des organismes marins. Assurance de la qualité et bonnes pratiques de laboratoire. Méthodes de référence pour les études de la pollution marine no. 57, PNUE, 25 pp.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. and Pharmaco.* 13, 57-149.
- Van Den Hurk, P, Faisal, M., Roberts Jr., M.H. 2000. Interactive effect of cadmium and benzo(a)pyrene on metallothionein induction in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Marine Environmental research*, 50, 83-87.
- Vaglio A and Landriscina C (1999) Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. *Ecotox. Environ. Saf.* 43: 111-116.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., & Fabbri, R., 1997. Simple methods for metallothionein evaluation in the tissues of marine invertebrates such as Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Marine Environmental Research*, 44, 69-84.