

## IMPACT SAISONNIER DE L'ENVIRONNEMENT SUR LA STRUCTURE GENETIQUE DE TROIS POPULATIONS DE *RUDITAPES DECUSSATUS* DANS L'ECOSYSTEME LAGUNAIRE DE BIZERTE (TUNISIE)

Esma MDELGI-LASRAM<sup>1\*</sup>, CH. FASSATOUI<sup>1</sup>, D. MORAGA<sup>2</sup>, et M.S. ROMDHANE<sup>1\*</sup>

1- Unité de Recherche Ecosystèmes et Ressources Aquatiques - Institut National Agronomique de Tunisie, 43, Avenue Charles Nicolle-1082 Tunis – Mahrajène - Université du 7 novembre à Carthage. TUNISIE.

2- UMR-CNRS 6539 Institut Universitaire Européen de la Mer - Université de Bretagne Occidentale Place Nicolas Copernic, Technopôle Brest Iroise 29280 Plouzané. FRANCE.

\*romdhane.medsalah@inat.agrinet.tn

\*e.lasram@gnet.tn

### ملخص

التأثير الموسمي للاضطرابات البيئية على التركيب الجيني لثلاثة مجموعات من المحار بحيره بنزرت (تونس) : في محاولة لتقييم تأثير الاضطرابات التي يمكن ان تغير التركيب الجيني للمحار بحيره بنزرت ، اجريت تحاليل جينيه على عينات من ثلاثة مجموعات. و قد بينت النتائج تواجد علاقة متبادله بين فقدان التنوع ومستويات métallothionéines في خياشيم المحار التي يمكن ان تكون مرتبطة مع وجود تدرج الانسياب المحمل بالمعادن الثقيلة بين مناطق منزل جميل ، فروة والشعرة. الكلمات الرئيسية : المحار ، بحيره بنزرت ، المعادن الثقيلة ، العلامات البيولوجية ، التركيب الوراثي

### RÉSUMÉ

Les perturbations d'origine naturelle et anthropique subies par la lagune de Bizerte peuvent modifier la structure génétique des populations de palourdes (*Ruditapes decussatus*). Une analyse génétique a été réalisée au niveau de trois populations de palourdes des stations d'Echaara, de Menzel Jemil et de Faroua dans le but de déterminer l'impact environnemental sur ces populations. Elles ont été suivies en juin 2000 et en février 2001. Cela a permis de caractériser des marqueurs génétiques et protéiques spécifiques de ces facteurs. La structuration génétique de ces populations a été étudiée à l'aide de quatre marqueurs allozymiques ; la glucosephosphate isomérase (Gpi), la phosphoglucomutase (Pgm), la malate déshydrogénase (Mdh) et la leucine aminopeptidase (Lap). Les différents résultats obtenus ont montré une différenciation génétique inter-populationnelle pour les trois stations étudiées, et intra-populationnelle pour deux d'entre elles. Un déficit d'hétérozygotie ainsi qu'une perte de diversité allélique saisonnière ont été observés dans les trois populations. Il semblerait qu'il existe une corrélation positive entre la perte de diversité et les teneurs en métallothionéines dans les branchies des palourdes pour les trois populations considérées. Ceci pourrait être en relation avec l'existence d'un gradient de flux de métaux lourds entre Menzel Jemil, Faroua et Echaara. Les métaux lourds semblent constituer une force sélective majeure sur les palourdes de la lagune.

**Mots clés** : palourde, *Ruditapes decussatus*, lagune de Bizerte, métaux lourds, biomarqueur, structure génétique, métallothionéines.

### ABSTRACT

**Seasonal impact of the environment on the genetic structure of three *Ruditapes decussatus* populations in Bizerte lagoon ecosystem (Tunisia)** : Bizerte Lagoon is subjected to natural and anthropic disturbances which can modify the genetic structure of clam populations (*Ruditapes decussatus*). In an attempt to evaluate the impact of the environmental variations on populations, genetic analysis has been carried out on three clam populations sampled from Echaara, Menzel Jemil and Faroua sites between June 2000 and February 2001. This present study allowed genetic and protein markers to be specifically characterized. Four allozymic markers have been examined to reveal the genetic structure of these populations; glucosephosphate isomérase (Gpi), phosphoglucomutase (Pgm), malate déshydrogénase (Mdh), and leucine aminopeptidase (Lap). A significant genetic differentiation between the three populations of clams has been observed, as well as for every one of two

populations between the sampling periods. This analysis also detected the existence of an heterozygote deficiency and a seasonal decrease of the allelic diversity for each of them. A positive correlation between the decrease of diversity and the metallothionein contents seems to be occurring for every population. These results suggests a possible relationship with the existence of heavy metals flow graduation between Menzel Jemil, Faroua et Echaara. Heavy metals seems to be a major selective strength among the lagoon clams.

**Keywords:** Clam, *Ruditapes decussatus*, Bizerte Lagoon, heavy metals, biomarker, genetic structure, metallothionein.

## INTRODUCTION

Située dans la partie septentrionale de la Tunisie (figure 1), la lagune de Bizerte, est un milieu dont l'exploitation des ressources halieutiques et aquacoles contribue à un secteur économique important en Tunisie classé second en matière de valeurs d'exportation des produits agricoles et agroalimentaires. Une des composantes des études initiées pour sa mise en valeur a été ciblée sur le développement conchylicole (120 tonnes en 2005

malgré une capacité de production cinq fois supérieure) et ses potentialités, principalement pour la production de la palourde qui représente une source importante de recettes en devises. Cependant, cet écosystème côtier est susceptible d'être affecté par diverses sources de perturbations, comme les modifications naturelles des paramètres physico-chimiques engendrés par son confinement, la faible profondeur de ses eaux et par l'influence des apports

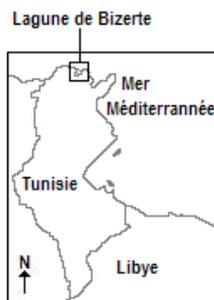
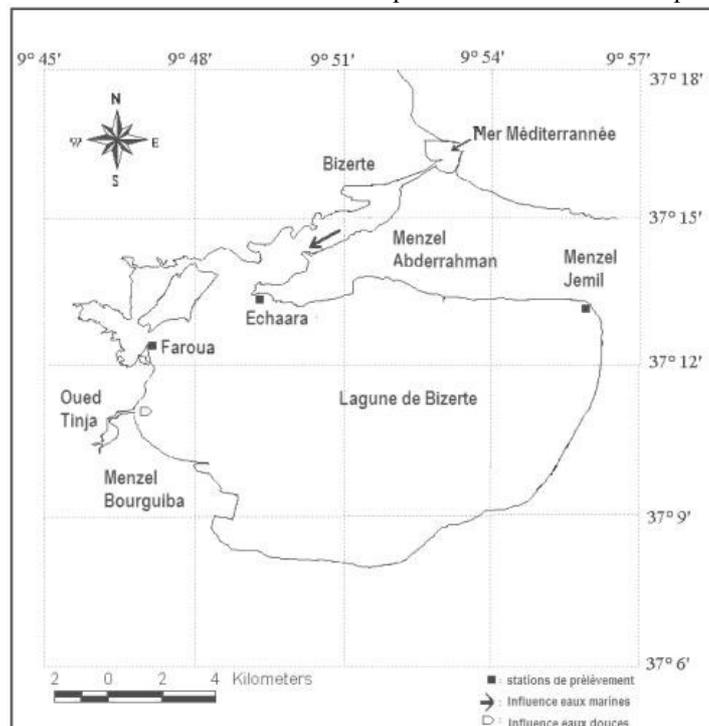


Figure 1. Localisation des sites de prélèvement de la palourde *R. decussatus* dans la lagune de Bizerte.

en eaux marines renforcée par la réduction des ceux en eaux douces, mais également, par une abondance des xénobiotiques d'origine agricole, urbaine et industrielle (métaux lourds, pesticides, engrais...). Ces différents facteurs jouent un rôle essentiel sur la structuration génétique des populations car ils agissent comme des forces sélectives, éliminant par mortalité différentielle les allèles ou les génotypes les moins résistants et favorisant ceux qui sont les mieux adaptés aux conditions du milieu. Les études de génétique des populations pourraient mettre en évidence l'action sélective de l'environnement sur certains allèles ou génotypes caractéristiques des conditions écologiques d'un biotope, d'où leur intérêt en tant que biomarqueurs. De nombreuses études ont, en effet, permis de montrer l'existence d'un tel phénomène chez les organismes marins tels que les poissons (Newmann *et al*, 1989 ; Pogson *et al*, 1995 ; Kotoulas *et al*, 1995), les crustacés isopodes (Jones, 1975) et les mollusques bivalves comme l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Moraga et Tanguy, 2000), différentes espèces de mytilidés *Perna viridis*, *Mytilus edulis* (Chan, 1993 ; Beaumont *et al*, 1989) et chez la palourde *Ruditapes decussatus* (Worms et Pasteur, 1982 ; Jame *et al*, 1988 ; Borsa *et al*, 1991).

Cependant, il existe en plus de ces biomarqueurs génétiques des bioindicateurs biochimiques : ils correspondent aux molécules impliquées dans la réponse des organismes exposés à des stress environnementaux telles que le cytochrome P 450, qui intervient dans les processus de détoxification des hydrocarbures ou les métallothionéines, qui jouent un rôle essentiel dans la détoxification des métaux lourds. Il semblerait, d'après les études citées précédemment, que les mollusques bivalves constituent un matériel biologique de choix pour la recherche de biomarqueurs du fait de leur type d'habitat, c'est à dire le substrat benthique siège de la biodéposition, de leur mode d'alimentation (filtreurs) et du fait de leur sédentarité. Ces caractéristiques font de ces organismes des sentinelles de l'état de santé du milieu marin. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact de facteurs environnementaux naturels ou anthropiques sur la structure génétique de la palourde (*Ruditapes decussatus*) de la lagune de Bizerte. Le but est de caractériser des marqueurs génétiques et protéiques spécifiques de ces facteurs, susceptible de servir de base à la biosurveillance de la qualité sanitaire de cette lagune. Aucune étude joignant la génétique des bivalves à l'environnement n'a été jusqu'à présent abordée pour la lagune de Bizerte. Il semble, par conséquent, particulièrement important de fournir à ce niveau des outils de diagnostic prédictifs capables de rendre compte de l'état de santé des organismes évoluant dans cet écosystème en perturbation. Le suivi de plusieurs biomarqueurs connus pour répondre aux stress de l'environnement, a permis d'étudier l'impact des processus sélectifs

aux perturbations environnementales de la lagune.

## MATERIEL ET METHODES

Trois populations naturelles de palourdes *Ruditapes decussatus* ont été étudiées dans la lagune de Bizerte. Les sites d'échantillonnage, Faroua, Echaara et Menzel Jemil, se caractérisent par des facteurs environnementaux variables. La station de Faroua au nord-ouest du plan d'eau, est soumise à l'influence d'un bassin versant agricole. Celle d'Echaara située près du goulet en communication avec la mer Méditerranée est le lieu de transit des rejets urbains de la ville de Bizerte et se situe en face d'une cimenterie. Enfin celle de Menzel Jemil au nord-est de la lagune est située dans une zone relativement confinée recevant des rejets urbains et industriels (teinturerie et métallurgie). Les prélèvements de palourdes de taille commerciale ont été effectués au sein de chaque station, en juin 2000 et février 2001, et ceci, afin de suivre l'évolution de la structuration génétique entre la période estivale et hivernale, période s'étalant entre le début des pontes et la fin du repos sexuel. Le but est de mettre en évidence un impact sélectif possible de la saisonnalité (variations de la salinité, de la température, de la teneur de certains polluants...) sur la structure génétique des populations de palourde. Parmi les divers marqueurs, quatre systèmes enzymatiques (Mdh, Gpi, Pgm et Lap impliqués dans le métabolisme énergétique) ont été suivis. Mdh (malate déshydrogénase) est une enzyme navette entre le cytosol et les mitochondries, impliquée dans le processus de respiration cellulaire, donc excellent marqueur des crises dystrophiques (anoxie) et également sensible au stress des xénobiotiques. Pgm (phosphoglucomutase) est une enzyme de la glycolyse répondant au stress de la température et des xénobiotiques notamment des métaux lourds. Gpi (glucosephosphate isomérase), enzyme de la glycolyse au même titre que Pgm, répond au stress des xénobiotiques (métaux lourds, pesticides, TBT). Ce dernier provoque la mortalité du premier échelon de la chaîne trophique (le phytoplancton) accumulé par les bivalves, et de ce fait affecte la glycolyse par l'effet de l'empoisonnement cellulaire. Enfin la Lap (leucine aminopeptidase), est une enzyme impliquée dans le processus d'osmorégulation cellulaire, qui répond essentiellement au stress de la salinité. Une analyse électrophorétique sur gel d'amidon de quatre systèmes enzymatiques (Pgm, Lap, Mdh et Pgi), extraits du muscle adducteur et de la glande digestive a été effectuée sur quatre vingt dix individus de palourde de chaque station. Les fragments de tissus sont introduits dans des tubes Eppendorf où ils sont finement broyés dans un volume d'environ 400 µl de tampon d'extraction (10<sup>-2</sup> M tris, 10<sup>-3</sup> M EDTA, NADP 1 % ; pH=6,8). Les échantillons maintenus

dans les microtubes sur la glace afin d'éviter une dégradation des protéines, sont ensuite centrifugés durant 10 minutes à 10000 g et à 4°C, puis stockés à -80°C au congélateur, en attendant l'électrophorèse. Les surnageants correspondant sont introduits dans le gel d'amidon à 12% utilisant un système discontinu de tampon Poulik (Pasteur et al., 1987). Les données allozymiques sont obtenues après lecture des gels électrophorétiques relatifs aux extraits enzymatiques des individus issus de chaque station d'échantillonnage. Pour chaque population, les données ont été traitées par les logiciels GENETIX 4.01 et GENEPOP 3.20. Les paramètres globaux calculés, sont : les fréquences alléliques ; le F statistique de Wright (1978) indice de fixation qui met en évidence la fixation d'allèles au sein d'une population et établit des différenciations génétiques entre populations ou sous-populations (Fst); l'indice (Fis) correspondant au coefficient de consanguinité qui permet de montrer un excès ou un déficit en hétérozygotes; la diversité allélique moyenne caractérisée par le nombre moyen d'allèles par locus qui représente le polymorphisme ; les distances génétiques de Cavalli-Sforza qui visualisent la différenciation génétique sur un arbre phylogénétique.

Par ailleurs, un marqueur biochimique, la quantification des métallothionéines, intervenant dans les processus de régulation homéostatique et de détoxification métallique cellulaire a été suivi. La concentration de métallothionéines a été déterminée par un test ELISA, à l'aide d'un anticorps anti-métallothionéine mis au point sur l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Tanguy et al., 2001, Tanguy & Moraga, 2001; Boutet et al., 2002). Cette méthode immunochimique présente l'avantage d'être rapide sensible et spécifique, en ne détectant que les métallothionéines contrairement aux méthodes polarographiques qui tiennent en plus compte des protéines à groupement-SH (Raspor et Pavicic, 1996). La moyenne des concentrations en métallothionéines respectivement dans la branchie et la glande digestive a été calculée pour vingt individus de chaque population.

## RESULTATS

L'analyse allozymique des quatre systèmes enzymatiques, Gpi, Pgm, Mdh et Lap impliqués dans le métabolisme énergétique cellulaire face à l'action de l'environnement, a permis de mettre en évidence, l'existence d'une différenciation génétique entre les trois populations Echaara, Menzel Jemil et Faroua. D'après l'étude de l'indice Fst (Tabl. I), il semblerait que les palourdes des trois stations étudiées appartiennent à des populations distinctes dont la différenciation est visualisée par l'arbre phylogénétique des distances de Cavalli - Sforza

(Figure 3). En effet, le Fst global est de 0.06 et il est significativement différent de 0 au seuil de 0,01. Aussi, d'après l'analyse de l'arbre phylogénétique, deux populations, Menzel Jemil et Echaara, présentent des structures génétiques répondant à des forces sélectives variables entre l'été et l'hiver. En revanche, aucune différenciation significative au sein de la population de Faroua, n'a été observée.

Une perte d'hétérozygotie, montrée par les valeurs de Fis de Wright (Tabl. II), a été observée. Cette perte est confirmée par la diminution de l'hétérozygotie moyenne au sein des trois populations (figure 5) qui est cependant plus marquée pour les stations de Menzel Jemil et Faroua comparée à celle d'Echaara. De même, la diversité allélique (figure 6) accuse une diminution lors de la transition été-hiver. Le polymorphisme est élevé pour les loci considérés dans cette étude, de 2,6 à 5,2 allèles par locus en moyenne (figure 6) pour toutes les populations.

L'analyse allozymique souligne, par ailleurs, un effet sélectif de la saisonnalité sur la distribution de certains allèles au niveau de trois loci enzymatiques. En effet, lors de la transition été-hiver, l'évolution des fréquences alléliques des loci enzymatiques retenus montre une variabilité des fréquences alléliques au niveau de Lap-2, qui semble être plus marquée dans les populations de Menzel Jemil et d'Echaara. L'étude des fréquences alléliques de la Pgm-2 et de la Gpi permet de mettre en évidence un phénomène de sélection (figure 7) qui opère entre l'été et l'hiver ; en effet, dans toutes les stations échantillonnées, il semblerait que l'allèle 105 soit contre sélectionné lors de la transition été-hiver pour le locus Pgm-2 puisque sa fréquence allélique décroît entre ces deux saisons. De même pour le locus Gpi, l'allèle 110 paraît contre sélectionné dans les trois populations entre ces deux périodes. Il apparaît donc que des forces sélectives opèrent sur ces allèles entre l'été et l'hiver. Les fréquences alléliques de la Mdh-2 n'ont pas permis de mettre en évidence un phénomène particulier.

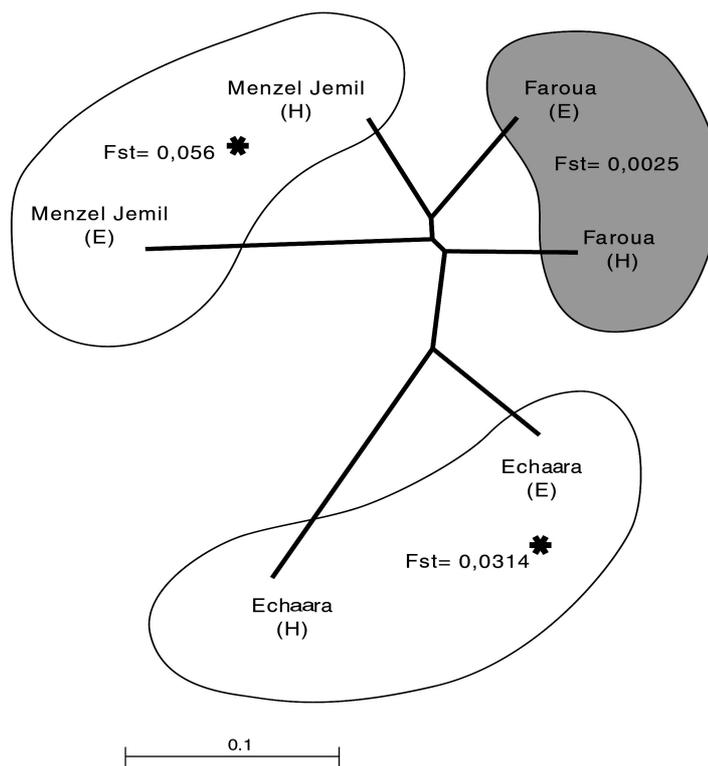
Le test ELISA a permis de mettre en évidence une différence dans les teneurs en métallothionéines des palourdes (figure 8) suivant la population considérée. Ceci traduit l'existence d'un stress métallique différentiel entre ces trois populations. Les concentrations en métallothionéines obtenues au niveau des branchies montrent un degré de contamination croissant par les métaux lourds entre Menzel Jemil, Faroua et Echaara. Une tendance similaire moins marquée est observée au niveau de la glande digestive.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats de l'analyse génétique montrent un polymorphisme élevé chez la palourde (Moraga, 1986) pour les loci considérés dans cette étude. Ceci semble, en effet, être une règle chez les bivalves chez

Tableau I. Tableau récapitulatif des résultats de Fst et de leurs paramètres statistiques respectifs pour les trois populations de *R. decussatus* de la lagune de Bizerte, prise deux à deux et entre l'été et l'hiver.

Fst	Faroua été	Echaara été	Menzel Jemil été	Echaara hiver	Menzel Jemil hiver	Faroua hiver
Faroua été		S .0386	S .0517	S .0867	NS .0041	NS .0025
Echaara été	S .0386		S .1134	S .0314	S .0188	S .0185
Menzel Jemil été	S .0517	S .1134		S .1299	S .0560	S .0644
Echaara hiver	S .0867	S .0314	S .1299		S .0537	S .0531
Menzel Jemil hiver	NS .0041	S .0188	S .0560	S .0537		NS .0000
Faroua hiver	NS .0025	S .0185	S .0644	S .0531	NS .0000	



Arbre phylogénétique sur 3 populations de palourdes de la lagune de Bizerte ( Distances de Cavalli-Sforza; stratégie d'agrégation : Neighbour Joining)  
 H: prélèvement hivernal  
 E: prélèvement estival

- Fst significatif au seuil de 1%
- Fst non significatif au seuil de 1%

Figure 3. Distances génétiques entre les trois populations de *R. decussatus* de la lagune de Bizerte.

Tableau II. Estimation de la perte d'hétérozygotie des trois populations de *R. decussatus* de la lagune de Bizerte, par locus et en fonction de la saison. (en gras : S)

Fis Tous W&C coefficient de consanguinité	Lap-2	Mdh-2	Pgm-2	Pgi
Menzel Jemil été	-0.024	-0.327	-0.121	-0.028
Menzel Jemil hiver	+0.084	<b>+0.774</b>	+0.117	-0.112
Faroua été	+0.054	<b>+0.379</b>	<b>+0.496</b>	<b>+0.219</b>
Faroua hiver	+0.084	-0.038	+0.228	<b>+0.136</b>
Echarra été	-0.135	+0.036	-0.099	<b>+0.091</b>
Echarra hiver	<b>+0.111</b>	-0.018	<b>+0.156</b>	+0.126

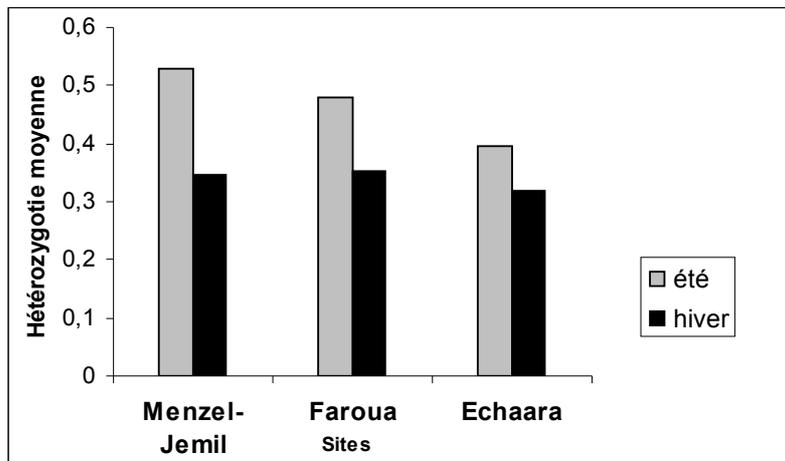


Figure 5. Evolution saisonnière de l'hétérozygotie moyenne des trois populations de *R. decussatus* de la lagune de Bizerte.

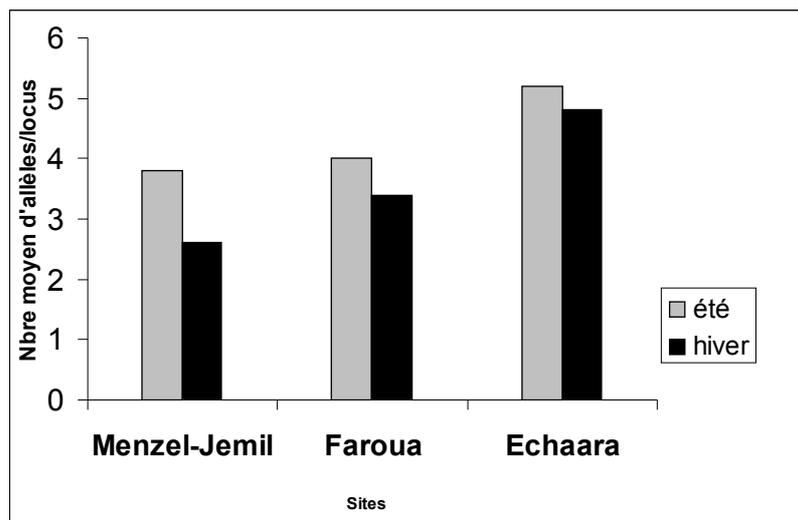


Figure 6. Evolution saisonnière de la diversité allélique des trois populations de *R. decussatus* de la lagune de Bizerte.

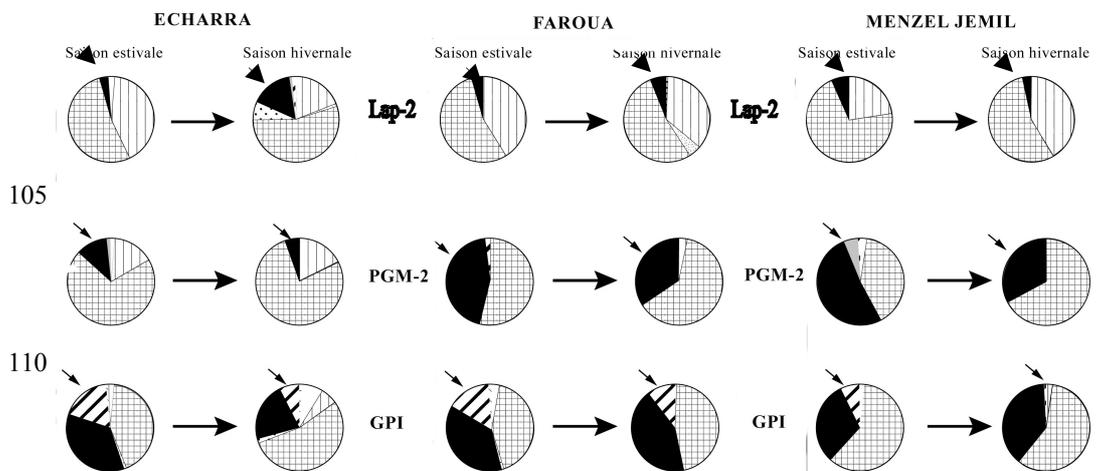


Figure 7. Evolution des fréquences alléliques de l'allèle 105 du locus Pgm-2 et de l'allèle 110 du locus Gpi durant la transition été-hiver pour les trois populations de *R. decussatus* de la lagune de Bizerte.

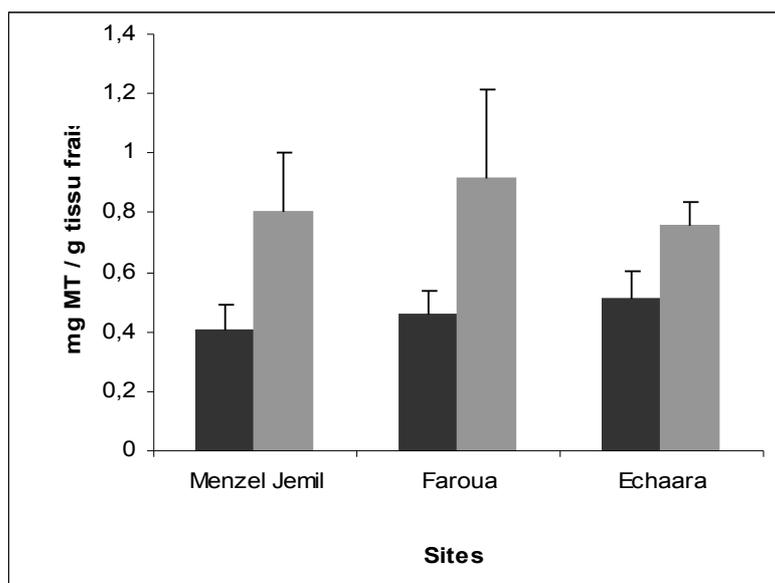


Figure 8. Concentration des métallothionéines obtenues par la technique du test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) dans les branchies (en noir) et dans la glande digestive (en gris) des populations de *R. decussatus* de la lagune de Bizerte.

qui la variabilité génétique est très importante (Jame et al, 1988). Les quatre loci retenus ont révélé un déficit de la diversité génétique en terme d'allèles et de génotypes. Ce constat va dans le sens des résultats obtenus à ce jour chez de nombreux bivalves marins. La mise en évidence d'une diminution de l'hétérozygotie moyenne entre l'été et l'hiver montre qu'il s'agirait d'un phénomène de contre-sélection des hétérozygotes entre ces deux saisons. Ceci semble

très fréquent chez les bivalves (Jame et al, 1988 ; Borsa et al, 1991 ; Chan, 1993) et n'est pas lié, à une station ou à un locus particulier (Jame et al, 1988) comme c'est le cas dans cette étude. Toutefois la diminution de l'hétérozygotie moyenne constatée durant la transition été-hiver, est plus ou moins importante selon la station considérée : elle est plus marquée pour Menzel Jemil puis pour Faroua et enfin pour Echaara où cette perte est la plus faible. Il

semblerait donc que la perte d'allèles entre ces deux saisons soit négativement corrélée avec le degré de pollution des stations, à savoir que, plus la station est polluée moins l'hétérozygotie moyenne diminue entre l'été et l'hiver. Si cette hypothèse est recevable, Menzel Jemil, serait la station la moins polluée des trois, d'après nos résultats. Bien que recevant d'importants rejets d'origine anthropique (urbains et industriels), drainant des métaux Pb, Cu et Ni, Menzel Jemil voit ces rejets se disperser au large par l'effet des courants (Yoshida et al. 2004a). Cette hypothèse est confirmée, en effet par les résultats récents présentés par Harzallah et al. (2001) montrant que les eaux de surface de la lagune se déplacent de l'ouest vers l'est avec des vitesses plus fortes au niveau de cette station, à proximité de laquelle s'effectue un retour des eaux en profondeur vers le canal de Bizerte. Ceci limiterait donc la biodéposition et l'accumulation de xénobiotiques dans le sédiment. Les fréquences alléliques de la Lap-2 montrent que l'augmentation de la diversité allélique entre l'été et l'hiver suit le même gradient : Menzel Jemil < Faroua < Echaara, en ce sens que plus la station est polluée, plus importante est la diversité allélique. Donc, malgré le déficit en hétérozygotes, il semblerait que ceux-ci soient avantagés en condition de stress (pollution) ce qui rejoindrait la théorie de l'hétérozygosis. Borsa et al (1991) supposent que les hétérozygotes sont favorisés en cas de stress car la possession de deux allèles différents et donc de deux formes enzymatiques différentes permettrait de diminuer les coûts énergétiques liés au maintien de l'homéostasie. De plus, les variations de l'hétérozygotie moyenne et des fréquences alléliques entre l'été et l'hiver prouvent l'existence d'un phénomène sélectif entre ces deux saisons. Le plus probable est que ces forces sélectives interviennent entre juillet et août où les teneurs en polluants sont les plus élevées (Aissa et Dellali, 1996). Les résultats ont permis d'établir des allèles bio-indicateurs d'un stress de l'environnement (Pgm et Gpi) qui pourraient être utilisés comme des marqueurs des variations saisonnières des paramètres environnementaux de la lagune. L'étude des fréquences alléliques a permis de mettre en évidence deux allèles pouvant servir d'indicateurs génétiques des forces sélectives agissant entre l'été et l'hiver : l'allèle 105 du locus Pgm-2 et l'allèle 110 du locus Gpi. Ceci va dans le sens des résultats obtenus pour l'allèle 105 Pgm-2 par Moraga et al. (2002), démontrant le caractère d'indicateur spécifique des métaux de celui-ci. Du fait de l'implication de la Lap dans les phénomènes d'osmorégulation, il faudrait s'attendre à ce qu'un allèle de ce système enzymatique puisse servir de biomarqueur de la salinité, étant donné les variations de ce paramètre entre l'été et l'hiver dans la lagune, en particulier au niveau de Faroua. Cependant un tel résultat n'a pu être mis en évidence dans cette étude.

Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la sélection liée aux variations de salinité opérerait sur les larves et ne serait donc plus observable au niveau des fréquences alléliques des adultes. En effet, Borsa et al (1991) émettent l'hypothèse d'une contre sélection des hétérozygotes avant le recrutement des larves, ce qui pourrait être le cas pour la Lap-2 dans cette étude. Il semblerait par conséquent intéressant de mener une étude génétique sur la Lap-2 chez les larves de palourdes de la lagune afin, éventuellement, de mettre en évidence un tel phénomène. Les résultats fournis par les Fst et les distances de Cavalli-Sforza ont permis de montrer que les palourdes des trois stations étudiées appartenaient à des populations distinctes et non à une métapopulation. La prédominance des interactions des différents stress environnementaux propres à chaque station étudiée pourrait expliquer la différenciation observée donc, l'hypothèse la plus probable pour expliquer ces différences génétiques est l'existence de forces sélectives d'importance variable selon les stations. Des résultats similaires ont été observés chez le flet (*Platichthys flesus*) par Borsa et al (1987). Cependant une étude génétique sur cinq populations de palourdes périméditerranéennes provenant d'Ismaïala (Egypte), d'Ebre (Espagne), de Bizerte (Tunisie), de Faro (Portugal) et de Thau (France) montre que la variabilité interpopulationnelle est à peine plus élevée que la «variabilité intrapopulationnelle. Ceci serait dû à l'homogénéité des conditions du milieu et des forces sélectives, en plus d'un flux génique important (Jarne et al, 1988). Il semblerait donc que l'effet des conditions environnementales prime sur les distances géographiques pour ce qui est des phénomènes de différenciation des populations. Les différenciations génétiques au sein des populations d'Echaara et de Menzel Jemil semblent être influencées par l'effet saisonnier. La caractérisation des forces sélectives particulières opérant à chaque station, permettrait d'identifier l'origine de cette différenciation et de comprendre, par exemple, l'absence de différenciation génétique au sein de la population de Faroua.

Les métallothionéines sont très étudiées chez les poissons (Hamza Chaffai et al, 1997), les bivalves comme l'huître *Crassostrea gigas* (Boutet et al, 2002) et la palourde *Ruditapes decussatus* (Bebiano et al, 1994), ainsi que chez de nombreuses autres espèces. Les métallothionéines sont de petites protéines solubles, de faible poids moléculaire qui se trouvent dans le cytosol et dans le noyau. Elles jouent un rôle déterminant dans le métabolisme, car leur complexation avec les ions métalliques permet le stockage de métaux essentiels ainsi que la détoxification des métaux lourds. En effet, ces ions, et en particulier les cations divalents, peuvent être dangereux pour le métabolisme car ils peuvent entrer en compétition avec les métaux essentiels qui servent de cofacteurs aux systèmes enzymatiques, empêchant

ainsi leur bon fonctionnement. La quantification des métallothionéines par le test ELISA dans les deux organes (branchies et glande digestive) reflète l'existence de variations des concentrations en métaux lourds entre les stations. Une corrélation positive entre la perte de diversité allélique observée pour les trois populations et les teneurs en métallothionéines dans les branchies, organe directement exposé aux xénobiotiques, semble être associée à la présence d'un gradient de flux de métaux lourds, entre Menzel Jemil, Faroua et Echaara. Ceci tendrait à prouver que les métaux constituent une force sélective majeure dans l'écosystème lagunaire de Bizerte qui, par conséquent, pourrait être responsable de la différenciation des trois populations de palourdes considérées. En effet, les variations de l'hétérozygotie moyenne semblent corrélées au degré de pollution des stations par les métaux. Cependant l'effet d'interaction entre les différents facteurs (métaux, température, oxygène dissous, salinité) n'est pas à exclure. Le fait que le gradient de teneurs en métallothionéines soit légèrement différent dans la glande digestive (Menzel Jemil < Echaara < Faroua) pourrait tenir au fait que la glande digestive est un organe de stockage et d'épuration des métaux alors que la branchie est en contact direct avec le milieu extérieur (Bebianno et al, 1994). Par conséquent les métallothionéines de la branchie constitueraient un meilleur indicateur de la pollution par les métaux que celles de la glande digestive (Bebianno et al, 1998). L'augmentation de la teneur en métallothionéines dans la branchie, observée entre Menzel Jemil, Faroua et Echaara, serait la conséquence de l'effet de l'hydrodynamisme de la lagune sur les flux métalliques. Des analyses régulières de la teneur en métallothionéines apporteraient des indications complémentaires sur les fluctuations saisonnières du stress métallique dans la lagune de Bizerte.

En définitive, cette étude a permis de mettre en évidence un impact des facteurs abiotiques, et en particulier des polluants, sur la structuration génétique des populations de palourdes étudiées. Ceci a permis de déterminer l'existence d'un gradient de pollution entre les trois stations. Ces travaux ont également permis d'établir l'existence de deux biomarqueurs génétiques : la Pgm-2 105 et la Gpi 110. Ces deux allèles sensibles semblent être, en effet, des biomarqueurs de l'action sélective de l'environnement sur les organismes. De plus, il semblerait que les métallothionéines soient de bons indicateurs biochimiques de la pollution par les métaux. Par conséquent la palourde (*R. decussatus*) constituerait une bonne sentinelle de l'état de santé de l'écosystème de la lagune de Bizerte qui gagne à être suivi, comme le montre une étude récente (Yoshida et al., 2004b) sur le dosage de métaux dans les sédiments de la lagune révélant que les concentrations de nombreux métaux enregistrent des

valeurs dépassant les seuils de toxicité. Des études complémentaires et, sur une longue période d'étude, associant la quantification des micropolluants métalliques dans les organismes avec les quantifications de métallothionéines dans les tissus permettra une meilleure appréciation de l'impact des xénobiotiques sur les palourdes (*R. decussatus*) de la lagune.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aissa P. & Dellali M., 1996. - Etat de pollution de la lagune de Bizerte, Bulletin I.N.S.T.M. N° spécial 3, 56-59.
- Beaumont A.R., Beveridge C.M. Barnet E.A. & Budd M.D., 1989. - Genetic studies of laboratory reared *Mytilus edulis*. II. Sélection at the leucine aminopeptidase (Lap) locus, Heredity 62, 169-176.
- Bebianno M.J. Serafim M.A.P. & Rita M.F., 1994. - Involvement of metallothionein in cadmium accumulation and elimination in the clam *Ruditapes decussata*, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53, 726-732.
- Bebianno M.J. & Serafim M.A.P., 1998. - Comparison of metallothionein induction in response to cadmium of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*, The science of the total environment 214, 123-131.
- Borsa P., Berrebi P. & Blanquer A., 1987. - Mécanisme de la formation en Méditerranée de sous-espèces de flets
- Plathichtys flesus* L., In LEGAY J.M. (ed) Biologie des populations, Université Claude Bernard, Lyon, 472-481.
- Borsa P., Zainuri M. & Delay B., 1991. - Hétérozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussatus*, Heredity 66.
- Boutet I., Tanguy A., Auffret M., Riso R., & Moraga D., 2002. - Immunochemical quantification of metallothioneins in marine molluscs : characterisation of a metal exposure bioindicator, Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 21 (5) pp. 1009-1014.
- Chan I.K.K., 1993. - Phosphoglucose isomerase (PGI) sélection in the green mussel, *Perna viridis*, In : Proceedings of the 27th European Biology Symposium, Dublin, Ireland, 7-11 September 1992, JAPAGA, Ashford, 15-24.
- Dellali M., 1996. - Etat de pollution de la lagune de Bizerte et effets à courts termes de certains polluants sur *Spheroma serratum* (Fabricius, 1787), *Idothea balthica* (Pallas, 1772) et

- Ruditapes decussatus* (Linne, 1758), DEA F.S.T., 143 pp.
- Harzallah A., Vladimir G., Koutitonsky, 2001. - Observations and Numerical Simulations of the Hydrodynamics of Bizerte Lagoon. Proceeding of the Fifth International Conférence on the Mediterranean Coastal Environment, MEDCOAST 01, E. Ozhan (Editor), 23-27 October, 2001, Hammamet, Tunisia. Vol. 3, p. 1101-1110
- Hamza-Chaffai A., Amiard-Triquet C. & El Abed A., 1997. - Metallothionein like protein : is it an efficient biomarker of metal contamination ? A case study based on fish from Tunisian coast, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 33, 53-62.
- Jarne P., Berrebi P. & Guelorget O., 1988. - Variabilité génétique et morphométrique de cinq populations de palourde *Ruditapes decussatus* (mollusque, bivalve), Oceanologica acta 11, 4, 401-407.
- Jones M.B., 1975. - Synergistic effects of salinity, temperature and heavy metals on mortality and osmoregulation in Marine and estuarine isopods (crustacea). Marine biology 30, 13-20.
- Kotoulas G., Bonhomme F. & Borsa P., 1995. - Genetic structure of the common sole *Solea vulgaris* at different geographic scales, Marine Biology 122, 361-375.
- Moraga D., 1986. - Polymorphisme génétique de populations cultivées de la Palourde du Pacifique *Tapes philippinarum*. Comptes rendus Académie Sciences Paris, 302 (série III), 621-624.
- Moraga D. & Tanguy A., 2000. - Genetic indicators of herbicide stress in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* under experimental conditions, Environmental Toxicology and chemistry 19, 3, 706-711.
- Moraga D., Mdelgi-Lasram E., Romdhane M. S., El Abed A., Boutet I., Tanguy A., & Auffret M., 2002. - Genetic responses to metal contamination in two clams: *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. Marine Environmental Research 54, (3-5) pp. 521-525.
- Newman M.C., Diamond S.A., Mulvey M. & Dixon P., 1989. - Allozyme genotype and time to death of mosquitofish, *Gambusia affinis* (Baird and Girard) during acute toxicant exposure : a comparison of arsenate and inorganic mercury, Aquatic toxicology 15, 141-156.
- Pasteur N, Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J. & Britton-Davidian, 1987. - Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines, Lavoisier ed, Paris, 217 pp.
- Pogson G.H., Mesa K.A. & Boutilier R. G., 1995. - Genetic population structure and gene flow in the Atlantic Cod *Gadus morhua* : a comparison of allozyme and nuclear RFLP loci, Genetics 139, 375-385.
- Raspor B. & Pavicic J., 1996. - Electrochemical methods for quantification and characterization of metallothioneins induced in *Mytilus galloprovincialis*. J. Anal Chem 354-529-534
- Tanguy A, Mura C & Moraga D., 2001. - Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Aquatic Toxicology, Vol. 55, pp. 35-47.
- Tanguy A. & Moraga D., 2001. - Cloning and characterization of the gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: CgMT2 a case of adaptive response to metal-induced stress ? GENE, Vol. 273 (1) pp. 123-130.
- Worms J. & Pasteur N., 1982. - Polymorphisme biochimique de la palourde, *Venerupis decussata*, de l'étang du Prévost (France), Oceanologica acta 5, 4, 395-397.
- Wright S., 1978. - Evolution and genetics of populations, Vol. 4 : Variability within and among natural populations, University of Chicago Press, Chicago.
- Yoshida M., Hamdi H., Abdul Nasser I., Jedidi N. 2004a. - Contamination of potentially toxic elements (PTEs) in Bizerte lagoon. Bottom sediments, surface sediment and sediment repository. Study on Environmental Pollution of Bizerte Lagoon. RPP-SEPMCL Final Report March 2004, INRS-JICA. p.21-30, 139 pp.
- Yoshida M., Kallali H., Ghrabi A., 2004b. - Solid waste landfills and soil/sediment contamination around Bizerte lagoon : Possible pollution sources. Study on Environmental Pollution of Bizerte Lagoon. RPP-SEPMCL Final Report March 2004, INRS-JICA. p.5-20, 139 pp.