

2022-2023

Master Toxicologie Humaine et Environnementale

Institut des Substances et Organismes de la mer (ISOMer)

# Expression transcriptionnelle modulée par le cadmium, le samarium et le gadolinium chez la moule bleue *Mytilus edulis*

Laura GANDON

Sous la direction de :

Paul DELERIS | Maître de Conférences (ISOMer UR2160)



## Liste des abréviations

ACBG	Agents de Contraste à Base de Gadolinium
ADNc	ADN complémentaire
Akt	Protéine kinase B
ARNm	ARN messager
BAX	Bcl2 Associated X-protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BLAST	Basic local alignment search tool
Cd	Cadmium
Cas 3	Caspase 3
Cas 8	Caspase 8
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
Ct	Cycle threshold
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
Gd	Gadolinium
GST	Glutathion-S-Transférase
HSP 70	Heat Shock Protein 70
HSP 90	Heat Shock Protein 90
JNK	c-Jun N-terminal kinases
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NF $\kappa$ B	Nuclear factor Kappa B
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Pdk1	3'- phosphoinositide-dependent kinase-1
PIP	PhosphatidylInositol-monoPhosphate
PIP2	PhosphatidylInositol-bisPhosphate
PIP3	PhosphatidylInositol-3,4,5-Phosphate
Pi3k	Phosphoinositide 3 kinase
p38 MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
p53	tumour protein p53
RT-qPCR	Reverse transcription real time quantitative polymerase chain reaction
Sm	Samarium
SOD	Super Oxyde Dismutase

TR

Terre Rare

## Table des matières

1) Introduction	p1-5
a. Terres Rares et Cadmium	
Cadmium	
Gadolinium	
Samarium	
b. Projet	
La moule <i>Mytilus edulis</i>	
Concentrations choisies	
Biomarqueurs, tissus et métabolomique	
Analyses à venir	
2) Matériels et méthodes	p6-7
Exposition	
Extraction et purification des ARNm de <i>Mytilus edulis</i>	
Rétrotranscription (RT)	
Choix des gènes	
Définition des amorces	
PCR quantitative	
Analyses statistiques	
3) Résultats	p7-22
Choix des gènes cibles supplémentaires	
Amorces	
Mise au point de l'extraction des ARNm	
Choix du gène contrôle	
PCR quantitative	
4) Discussion	p22-27
5) Conclusion et perspectives	p27-28
Références bibliographiques	p29-34
Résumé/Abstract	p35

## 1) Introduction

### a. Terres Rares (TR) et Cadmium (Cd)

La production halieutique et aquacole mondiale a atteint un niveau record de 214 millions de tonnes en 2020, dont 178 millions de tonnes d'animaux aquatiques. La quantité destinée à la consommation humaine (à l'exclusion des algues) est de 20,2 kg par habitant, c'est-à-dire, deux fois plus que dans les années 1960 (FAO, 2022).

Aujourd'hui, l'un des principaux défis qui touchent l'aquaculture bivalve et les écosystèmes côtiers est l'augmentation continue des activités anthropiques qui a aggravé le rejet de mélanges de xénobiotiques complexes, dont les métaux lourds et les terres rares (TR), dans le milieu aquatique (Möller et al. 2014). En effet, la demande mondiale de TR augmente rapidement car ces métaux sont essentiels dans de nombreuses industries de haute technologie, notamment l'électronique, la médecine et les énergies renouvelables (Alonso et al. 2012; Gwenzi et al. 2018). Les progrès technologiques récents dans ces domaines ont entraîné une augmentation de l'extraction et de l'utilisation des TR ainsi que de métaux lourds comme le Cadmium (Cd) (utilisé dans l'industrie nucléaire, les alliages...) qui peut s'accompagner d'une augmentation des concentrations dans l'environnement (Khan et al. 2017). En effet, l'augmentation des applications industrielles, agricoles (engrais) et domestiques des TR a entraîné une augmentation de déchets d'équipements électriques et électroniques ce qui conduit à des rejets de TR dans l'environnement (İşıldar et al. 2018 ; Möller et al. 2014). De plus, l'utilisation des TR induit des rejets d'eaux usées contaminées (effluents domestiques et industriels) dans l'environnement côtier et estuaire par les systèmes de traitement urbain, ce qui entraîne une pression supplémentaire sur l'écosystème aquatique (Figueiredo et al. 2022).

C'est pourquoi, les TR sont maintenant qualifiés de contaminants émergents en raison des problèmes environnementaux et de santé causés par la gestion et l'élimination sans discernement des déchets électroniques contenant de fortes concentrations d'ETR (Gwenzi et al. 2018).

Au même titre que les TR, le Cd est un contaminant ubiquitaire. Il est aussi rejeté de manière intensive dans le milieu aquatique du fait de l'activité volcanique, du lessivage des sols et des roches riches en cadmium et du stockage dans les sédiments marins de diatomées. Les activités anthropiques liées à l'utilisation de métaux lourds ont également contribué à la présence de Cd dans le milieu aquatique par exemple le Cd est contenu dans des engrains et est un sous-produit du raffinage du zinc (Kubier et al. 2020 ; Hutton 1983, Elinder 1985).

#### Cadmium (Cd)

En raison de sa faible affinité de sorption par rapport aux autres métaux lourds, le Cd est facilement mobilisé, les concentrations retrouvées dans les sédiments sont faibles alors que des concentrations élevées de Cd peuvent se retrouver dans les eaux et dans les organismes marins (Kubier et al. 2020). De plus, dans l'environnement marin, le Cd est présent à des concentrations plus élevées dans les eaux côtières et estuariennes en raison des rejets industriels intensifs, de l'activité portuaire et de l'activité minière dans les rivières (Hamed & Emara, 2006 ; Tamele & Loureiro 2020).

Une exposition à de faibles niveaux de Cd peut entraîner des dommages aux reins, au foie, au système osseux et au système cardiovasculaire, ainsi qu'une détérioration de la vue et de l'ouïe. Il présente également des effets indésirables à faibles doses sur la reproduction humaine mâle et femelle et affecte la grossesse ou son issue (Jenardhanan *et al.* 2016 ; Kumar & Sharma, 2019 ; Zhu *et al.* 2020).

Plusieurs études montrent une modulation de l'expression du système antioxydant après une exposition au Cd (Dellali *et al.* 2021 ; Geret *et al.* 2008 ; Orbea *et al.* 2002 ; Rocha *et al.* 2015). En effet l'activité de la catalase (CAT) et les niveaux de malondialdéhyde ont été augmenté après une exposition au Cd ce qui montre que le système antioxydant est surexprimé en cas d'exposition au Cd.

De plus, le Cd génère des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO), ces dernières perturbent l'expression des gènes et empêchent la réparation de l'ADN (Skipper *et al.* 2016). Elles peuvent induire une altération des macromolécules ainsi que l'apoptose (Simon *et al.* 2000). Au niveau transcriptionnel, il a été trouvé que l'exposition au Cd induisait une augmentation des niveaux d'ARNm de métallothionéine, de la protéine de choc thermique 70 (HSP 70) et de la CAT (Rocha *et al.* 2018 ; Karray *et al.* 2015).

### Gadolinium

Le Gadolinium (Gd) est utilisé dans les agents de contraste à base de gadolinium (ACBG) pour l'Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) (Bau *et al.* 2006 ; Kulakiz & Bau, 2011 ; Trapasso *et al.* 2021). Cette utilisation entraîne une contamination généralisée des systèmes d'eau douce et d'eau potable car ces derniers sont difficiles, voire impossibles à éliminer dans les stations d'épuration (Parant *et al.* 2018 ; Rabiet *et al.* 2009 ; Schmidt *et al.* 2019). En effet, les procédés de traitement des eaux usées n'éliminent pas de manière satisfaisante les ACBG mais risquent plutôt de transformer les ACBG chélatés en leur métal ionique libre ( $Gd^{3+}$ ) par des processus de dégradation involontaires (Oluwasola *et al.* 2022). Le Gd est donc identifié comme un microcontaminant aquatique émergent qui nécessite une attention particulière (Ebrahimi & Barbiera, 2019). Par ailleurs, il est également utilisé dans les composants phosphorés des tubes TV couleur, dans des alliages (pour la fabrication d'aimants) ainsi que dans des composants électroniques, notamment les pièces d'enregistreurs vidéo et la mémoire des ordinateurs.

Les effets du Gd sur le développement embryonnaire d'oursins ont été étudiés (Martino *et al.* 2017 ; Martino *et al.* 2018). Les travaux ont décrit des altérations de la croissance et de la structure du squelette. De plus, en 2019, Henriques *et al.* (2019) ont prouvé que les moules contaminées au Gd ont diminué leur capacité métabolique, ont activé leurs défenses antioxydantes et ont montré une peroxydation lipidique accrue. Ces deux études montrent bien des altérations aux niveaux physiologique et biochimique mais ces dernières n'ont pas traité les altérations moléculaires.

### Samarium (Sm)

Le samarium est un TR utilisé dans des technologies de pointe telles que les turbines, les panneaux solaires, les véhicules électriques ainsi que dans les engrains (Bergsten-Torralba *et al.* 2020 ; Zhang *et al.* 2013).

La toxicité du Sm a été très peu étudié sur les organismes aquatiques néanmoins une concentration engendrant 50% de mortalité chez *Hyalella azteca* a été mesurée à 0,85 mg/L (Borgmann et al. 2009). De plus, le Sm est bioaccumulé chez la moule *D.polymorpha*, il induit une modification de biomarqueurs antioxydants comme la Glutathion-S-Transférase (GST) (Hanana et al. 2018).

### **b. Le projet**

Cette présente étude s'inscrit dans un projet visant à étudier les effets du Cd, du Gd et du Sm sur la moule bleue *Mytilus edulis*.

#### La moule *Mytilus edulis*

Les bivalves marins sont importants dans l'alimentation humaine, en effet, ils contiennent une variété de nutriments et de minéraux essentiels qui ne peuvent pas être synthétisés par l'Homme (Wright et al. 2018). Les bivalves sont des organismes filtreurs, ils sont continuellement exposés à de grand volume d'eau et par conséquent aux polluants présents dans l'eau (Beyer et al. 2017). Ils sont capables d'absorber les métaux des eaux de manière dose dépendante (Freitas et al. 2020 a/b ; Orani et al. 2022 ; Hanana et al. 2018 ; Henriques et al. 2019) ce qui pose question sur l'impact des métaux sur les bivalves ainsi que sur les échelons supérieurs de la chaîne alimentaire. Les moules accumulent de fortes concentrations de contaminants, y compris les métaux et les particules d'eau pendant leur processus d'alimentation par filtration. Les moules du genre *Mytilus* sont de bonnes espèces bioindicatrices car elles sont sessiles et elles vivent en bancs ce qui permet d'obtenir des analyses spécifiques à l'emplacement. Elles sont faciles à maintenir en culture, ont une faible capacité à métaboliser les contaminants en plus d'avoir de nombreux biomarqueurs sensibles ce qui les rend adaptées aux études écotoxicologiques en laboratoire (Beyer et al. 2017). De plus, les concentrations de métaux lourds retrouvées dans les espèces du genre *Mytilus* reflètent les concentrations des eaux côtières dans lesquelles ils vivent. Elles sont donc touchées par les TR en raison de leur augmentation dans les zones côtières et estuariennes (Akagi & Edanami, 2017). Tous ces arguments nous ont poussé à choisir la moule bleue *Mytilus edulis* comme organisme modèle de cette étude.

#### Concentrations choisies

Nous avons choisi des concentrations de 50 µg/L (Cd) et 500 µg/L (Cd, Gd et Sm) ce qui est représentatif des concentrations retrouvées dans les environnements les plus exposés comme les estuaires, les zones d'extraction et les eaux proches des hôpitaux.

#### Exposition

195 *Mytilus edulis* matures ont été acclimaté pendant trois jours. Les moules ont été répartis par 13 dans 15 aquariums. Elles ont ensuite été exposés à 0,5 mg/L de Cd, de Gd, de Sm ou à 0,05 mg/L de Cd pendant huit jours, 3 aquariums n'étaient pas exposés pour servir de contrôle.

#### Biomarqueurs, tissus et métabolomique

L'impact de ces 3 polluants a été initialement analysé en évaluant leurs effets sur plusieurs biomarqueurs tels que la Super Oxide Dismutase (SOD), la CAT et la GST (**Annexe 1**, page 38 à 40).

Ce sont les principaux systèmes de défense antioxydants contre les ERO (Demirci-Çekiç et al. 2022). Ces biomarqueurs ont été étudié sur le manteau, les branchies ainsi que la glande digestive. Ces tissus ont été choisi car ce sont des tissus susceptibles d'être affectés par une exposition aux métaux car ils interviennent dans la voie d'absorption des polluants chez la moule (**Figure 1**). En effet, des études de distribution des toxiques montrent que les différents compartiments biologiques (branchies, manteau, plasma, glande digestive, gonades, muscles et autres viscères) peuvent contenir des concentrations variables de contaminants (Raftopoulou & Dimitriadis 2011 ; Rocha et al. 2015). Plusieurs études ont montré que les métaux étaient majoritairement accumulés dans la glande digestive, puis au niveau des branchies (Jebali et al. 2014). Des analyses métabolomiques ont aussi été réalisées sur la glande digestive (**Annexe 1** page 41 à 50). Les principaux résultats des analyses biochimiques et métabolomiques sont résumés dans les **Tableaux I et II**.

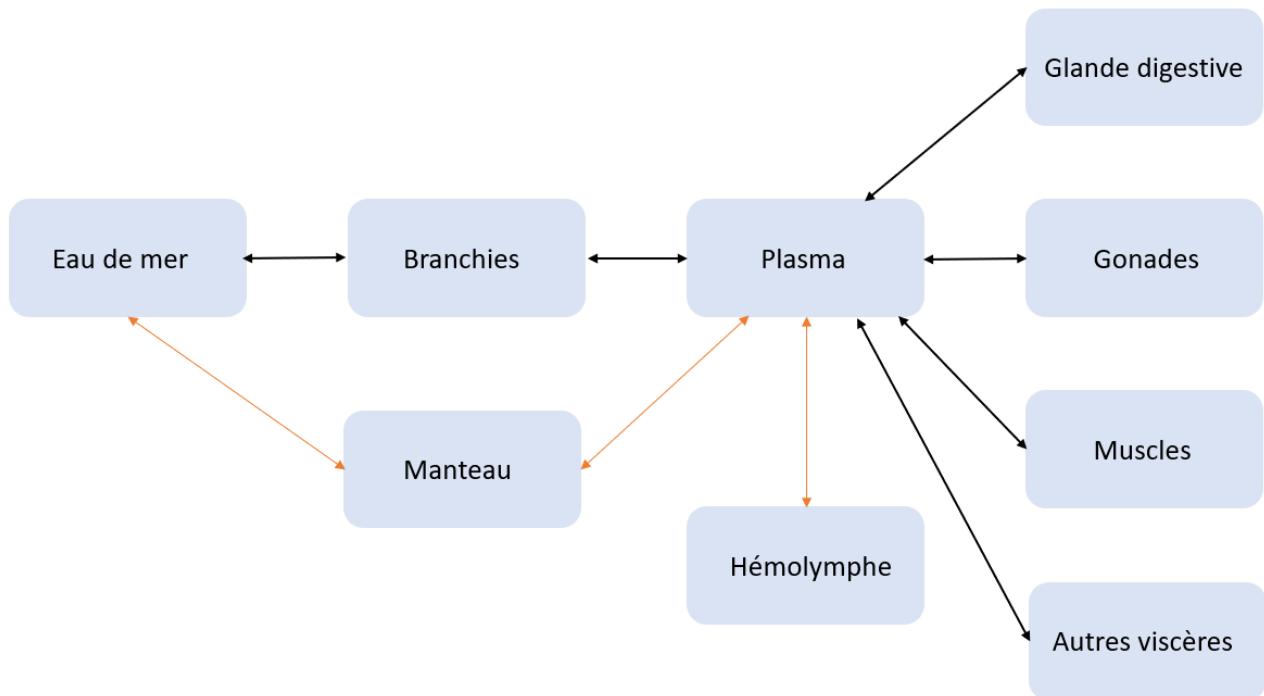
#### Analyses à venir

Les analyses métabolomiques ont révélé une surexpression de 3 phosphoinositides (PIP, PIP2 et PIP3) dans la glande digestive après l'exposition de *Mytilus edulis* au Cd et au Sm tandis que le Gd a uniquement induit la surexpression du PIP3 dans la glande digestive. La surexpression du PIP3 questionne sur l'expression transcriptionnelle des acteurs intervenant dans les voies de prolifération, de survie cellulaire et dans l'apoptose. En effet, le PIP3 active la protéine kinase B (Akt) et cette dernière peut intervenir dans ces différentes voies via l'activation de p53, de NFκB, de mTOR.

Au vu de la surexpression du PIP3, de la faible documentation sur toxicité du Sm et du Gd ainsi que sur les mécanismes moléculaires sous-jacents associés, l'objectif d'analyses préalables réalisées en 2022 (**Annexe 2**) était d'étudier les niveaux d'expressions transcriptionnelles de 12 gènes, intervenant dans la survie cellulaire, la prolifération cellulaire, le stress et la mort cellulaire, après exposition au Cd, au Gd et au Sm.

Dans la présente étude nous allons redéfinir les gènes contrôles pour optimiser les résultats obtenus en 2022, le but étant de réduire la variabilité statistique. De plus, nous allons élargir les gènes et voies étudiées.

Cette étude vise donc à étudier les niveaux d'expressions transcriptionnelles de différents gènes intervenant dans la prolifération, la mort cellulaire, le métabolisme énergétique, le stress ou encore la détoxicification suite à une exposition de *Mytilus edulis* à 0,5 mg/L de Cd, le Sm et le Gd pendant 8 jours. Ces niveaux d'expression transcriptionnelle seront mesurés sur la glande digestive, les branchies ainsi que le manteau grâce à des analyses de RT qPCR.



**Figure 1 :** Représentation schématique des principales voies de transport/distribution internes des contaminants dans les moules bleues. Les flèches noires indiquent les voies principales tandis que les voies alternatives sont représentées par des flèches orange. Illustration adaptée de Ricciardi et al. (2016)

**Tableau I :** Résultats des analyses biochimiques (marqueurs du stress oxydant) provenant d'une exposition au Cd, Gd et Sm sur des moules *Mytilus edulis* réalisée en 2021 pendant 8 jours

Branchies	Manteau	Glande digestive
Gd 0.5mg/L – Augmentation SOD	Cd 0.5mg/L – Diminution SOD	Sm 0.5mg/L – Diminution GST
Sm 0.5mg/L – Diminution GST		

**Tableau II :** Résultats des analyses métabolomiques sur la glande digestive provenant d'une exposition au Cd, Gd et Sm sur des moules *Mytilus edulis* réalisée en 2021 pendant 8 jours

Concentration en métal	Réponse
Sm 0,5 mg/L	Surexpression du Phosphatidylinositol-trisphosphate (PIP3), surexpression Phosphatidylinositol-bisphosphate (PIP2) et Phosphatidylinositol-monophosphate (PIP)
Gd 0,5 mg/L	Surexpression du PIP3
Cd 0,5 mg/L	Surexpression du PIP3, surexpression PIP2 et PIP

## 2) Matériels et Méthodes

### Exposition

L'exposition a été réalisé en 2021 (**Annexe 1** page 22-23), 195 *Mytilus edulis* matures en provenance de l'Irlande, pesant (10,24 + ou - 2,87 g) ont été acheté dans un supermarché de Rezé. Elles ont été acclimaté pendant trois jours et exposés à une concentration variable de cadmium, gadolinium et samarium avec cinq traitements en tripliques pendant huit jours. Les traitements étaient le cadmium dissous 50 µg/L et 500 µg/L, le samarium dissous 500 µg/L, le gadolinium dissous 500 µg/L, et un groupe témoin sans contamination par des métaux. Treize moules ont été introduites dans chaque aquarium et la contamination a été effectuée tous les deux jours après le changement d'eau de mer. Après l'exposition, les moules ont été disséqué et préparé pour une analyse ultérieure : séparation des branchies, de la glande digestive et du manteau. Les échantillons de moules disséquées destinés à l'analyse RTqPCR ont été plongé dans de l'azote liquide puis conservé à -20°C.

### Extraction et purification des ARNm de *Mytilus edulis*

La purification des ARNm a été réalisé grâce au kit d'isolation d'ARN NucleoSpin® (Macherey – Nagel). Pour soucis d'efficacité, l'étape de digestion par DNase et le premier lavage avec RAW2 ont été supprimés. Les extraits d'ARN ont ensuite été traités avec un kit de digestion DNase I (Qiagen) conformément aux instructions du fabricant. L'agent de lyse du kit a été remplacé par le Nucléozol ®, nous avons aussi augmenté la quantité de tissu broyé entre 30 et 50 mg. Le kit de nettoyage d'ARN Macherey – Nagel NucleoSpin® nous a ensuite permis de purifier et de concentrer l'ARN extrait conformément aux instructions du fabricant.

La concentration et la pureté de chaque aliquot d'ARN purifié ont été évalués par spectrophotométrie grâce à un lecteur de plaque Varioskan (Thermo Scientific) couplé avec une microdrop selon les instructions du fabricant.

### Rétrotranscription (RT)

La concentration d'ARNm mesurée nous a permis d'obtenir le volume exact à prélever pour que tous les échantillons rétro transcrits contiennent 0,5 µg d'ARNm total. L'ADNc a été synthétisé dans un thermocycleur Applied Biosystems 2720 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, États-Unis) à l'aide du kit qScript® cDNA SuperMix (Quantabio Reagent Technologies, Beverly, MA, États-Unis) en suivant les instructions du fabricant.

### Choix des gènes contrôles

Afin de définir les gènes de contrôles les plus robustes pour effectuer la RT qPCR, nous avons comparé la stabilité de 3 gènes couramment utilisés, l'ARNr28S, l'ARNr18S et l'alpha tubuline. Ces gènes ont été testés pour le manteau et les branchies.

### Définition des amorces

Une fois le gène d'intérêt trouvé, nous avons récupéré la séquence codante complète dans la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Si la séquence codante trouvée n'appartenait pas à *Mytilus edulis* alors nous avons comparé cette séquence avec le transcriptome de *Mytilus edulis* via la plateforme galaxy. Puis nous avons récupéré la séquence correspondante à *Mytilus edulis* et trouver la meilleure paire d'amorce à l'aide du logiciel primer3. Dans primer3, il fallait entrer les conditions suivantes :

- Tm entre 57 et 63°C
- Longueur de l'amplicon entre 80 et 150 pb
- Longueur des primer : 18 – 23 bases

En dernier lieu, nous avons testés la spécificité des amorces grâce au logiciel Bioedit. Les amorces identifiées par Primer3 ont été comparé localement avec le transcriptome de *Mytilus edulis* pour vérifier qu'elles amplifient uniquement la séquence souhaitée. Le transcriptome de *Mytilus edulis* se trouve dans le fichier : GCA\_905397895.1\_MEDL1\_cds\_from\_genomic.fna, c'est un transcriptome non annoté issu de NCBI.

### PCR quantitative

L'analyse qPCR a été effectuée dans un système qPCR temps réel Applied Biosystems 7300 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) selon les instructions du fabricant, et le mélange SYBR Green I a été utilisé comme colorant de liaison. Chaque puits de PCR contient 5µl d'ADNc dilué 1/10, 1,5 µl d'amorces spécifiques du gène d'intérêt avec une concentration de 10 µM, 12,25 µl de SYBR Green avec 6,25 µl d'eau pour un volume total de 25 µl. Des réactions PCR pour six répliques biologiques ont été réalisées en un exemplaire. Le cycle de PCR a été de 50 °C pendant 2 minutes, de 95 °C pendant 10 minutes pour la dissociation, suivi de 40 cycles de 15 secondes à 95 °C et de 1 minutes à 60 °C pour l'hybridation de l'amorce et l'allongement de l'ADN. L'étape de dissociation est nécessaire uniquement lorsque de nouveaux primer sont testés, en effet cela permet de s'assurer que les primeurs ne s'hybrident pas entre eux.

### Analyses statistiques

La quantification des résultats RT-qPCR a été analysée à l'aide de la méthode comparative 2- $\Delta\Delta Ct$  (Schmittgen & Livak, 2008). Les résultats ont été standardisés au gène contrôle. Une matrice de quantification relative a été construite dans Microsoft Excel. Cette matrice prend en compte 4 valeurs sur les 6. Les deux valeurs les plus extrêmes ont été exclu afin de réduire les variations biologiques.

## **3) Résultats**

### Choix des gènes cibles supplémentaires

Nous avons ajouté 5 gènes cibles supplémentaires aux 12 gènes étudiés dans l'analyse précédente réalisée en 2022 (**Annexe 2** page 43 à 46). Ces nouveaux gènes sont les Heat Shock Protein 70 et 90 (HSP 70 ET HSP 90) qui sont des biomarqueurs de stress non spécifiques (Figueiredo et al. 2022 ; Le Saux et al. 2020

; Sulmon et *al.*, 2015), les métallothionéines qui capturent les ions bivalents et jouent donc un rôle dans la détoxicification (Soazig & Marc, 2003 ; Aceto et *al.* 2011), l'ATP synthase ainsi que la citrate synthase qui sont 2 enzymes clés du métabolisme énergétique (Louis et *al.* 2020). La citrate synthase (CS) catalyse la réaction de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate pour produire de l'acide citrique dans le cycle de Krebs, elle est mesurée car elle reflète la capacité aérobie des moules et d'autres invertébrés (Collins et *al.* 2020).

### Amorces

Les amorces obtenues pour l'ATP synthase, la citrate synthase, la métallothionéine et les HSP sont présentées dans l'**Annexe 3**. Les amorces des autres gènes cibles ont été définies précédemment, elles sont résumées dans l'**Annexe 4**.

### Mise au point de l'extraction des ARNm

L'isolement et la purification de l'ARN sont des étapes clés pour l'analyse des niveaux d'expression des gènes. La mauvaise qualité d'un ARN peut induire des défaillances techniques dans l'analyse moléculaire. Afin d'éviter toutes défaillance, l'ARN doit être pur. Dans les essais précédents, la pureté des ARNm des moules exposées au Gd étaient trop faible (**Annexe 5**) avec l'usage du kit NucleoSpin® (Macherey – Nagel). En effet, le ratio A260/A280 doit être supérieur ou égal à 1,8 pour affirmer que l'ARN n'est pas contaminé par les protéines et le ratio A260/A230 doit être supérieur ou égal à 2 pour affirmer que l'ARN n'est pas contaminé par des composés phénoliques ou des métabolites secondaires. Or, les ratios obtenus précédemment étaient trop faible pour affirmer que les ARN étaient purs (**Annexe 5**) c'est pourquoi nous avons optimiser les étapes d'extraction et de purification avec un agent de lyse plus efficace (voir partie 2b de ce présent rapport). Nous avons aussi augmenté la quantité de tissu broyé entre 30 et 50 mg pour obtenir une concentration en ARN plus élevée. Les ratios ainsi que la concentration en ARN sont synthétisés dans le **Tableau III**.

### Choix du gène contrôle

Nous avons comparé 3 gènes contrôles potentiels, l'alpha tubuline, l'ARNr 18 et l'ARNr 28. L'alpha tubuline a été utilisé comme gène contrôle dans les précédentes qPCR, cependant, la variabilité était trop forte. Nous avons ensuite comparé la variation totale induite par l'ARNr 18 et l'ARNr 28. Les résultats sont présentés dans le **Tableau IV**. Les 2 ARNr montrent des variations totales de l'ordre de 1 pour sur le manteau et de l'ordre de 2,5-3 pour les branchies. Nous avons choisi de travailler avec l'ARNr 18S car les Ct induit (autour de 13) se rapprochent plus des Ct de nos gènes cibles variant entre 17 et 30

**Tableau III** : Pureté et concentration des ARNm extraits

Tissu	Echantillon	A260/A280	A260/A230	Concentration
Manteau	C1	2,114	2,458	391,4
	C2	2,104	2,41	328,9
	C3	2,202	2,186	1243
	C4	2,085	2,414	260,4
	C5	2,133	2,472	543,8
	C6	2,17	2,365	733,3
	Cd1	2,111	1,857	296,7
	Cd2	2,077	2,168	118,8
	Cd3	2,09	2,155	240,2
	Cd4	2,087	2,306	203
	Cd5	2,048	2,053	91,76
	Cd6	2,186	2,216	898,2
	Gd1	2,086	1,857	72,51
	Gd2	2,148	1,916	556,4
	Gd3	2,124	2,462	417,2
	Gd4	2,15	2,495	629,4
	Gd5	2,107	2,237	174,4
	Gd6	2,129	2,528	262,8
Branchies	Sm1	2,114	2,164	448,5
	Sm2	2,096	2,231	135,5
	Sm3	2,083	2,145	184,5
	Sm4	2,136	2,405	681,7
	Sm5	2,097	2,137	113,4
	Sm6	2,076	2,041	88,94
	C1	2,089	1,897	54,2
	C2	2,098	2,093	91,98
	C3	2,117	2,426	166,5
	C4	2,113	2,234	69,54
	C5	2,123	2,26	422,3
	C6	2,12	2,025	130,3
	Cd1	2,112	2,304	320,1
	Cd2	2,158	1,841	32,08
	Cd3	2,131	2,402	157,2
	Cd4	2,141	2,467	221,1
	Cd5	2,122	2,433	589,2
	Cd6	2,143	2,394	189,6
Glande Digestive	Sm1	2,086	2,022	126,1
	Sm2	2,13	2,428	648,6
	Sm3	2,092	2,24	189,4
	Gd1	2,094	2,013	165,7
	Gd2	2,093	1,831	143,3
	Gd3	2,106	2,136	269,9
	C1	2,142	2,365	998,9
	C2	2,171	2,164	1222
	C3	2,157	2,110	1027
	C4	2,119	2,193	580
	C5	2,193	2,372	1466
	C6	2,170	2,344	1306
	Cd1	2,139	1,951	794,7
	Cd2	2,153	1,839	898,6
	Cd3	2,138	2,310	830,4
	Cd4	2,091	2,069	160,9
	Cd5	2,161	2,344	1073
	Cd6	2,158	2,311	1048
	Gd1	2,140	2,299	806,5
	Gd2	2,156	2,299	690,5
	Gd3	2,139	2,394	467,8
	Gd4	2,145	1,855	714,6
	Gd5	2,097	2,083	199,07
	Gd6	2,054	1,940	127,6
	Sm1	2,115	2,416	1024
	Sm2	2,136	2,402	1234
	Sm3	2,134	2,386	1212
	Sm4	2,126	2,395	1152
	Sm5	2,113	2,041	975,1
	Sm6	2,141	2,433	1147

**Tableau IV :** Comparaison entre l'ARNr 18 S et l'ARNr 28 S sur le manteau et les branchies de *Mytilus edulis*.

<b>Manteau</b>			<b>Branchies</b>		
Echantillon	Ct 18 S	Ct 28 S	Echantillon	Ct 18 S	Ct 28 S
C1	13,081	8,819	C1	14,282	10,854
C2	14,606	9,884	C2	12,63	9,348
C3	12,748	8,218	C3	18,164	14,414
C4	15,265	11,452	C4	12,499	9,026
C5	12,282	n.d	C5	12,891	9,276
C6	13,752	9,985	C6	12,946	9,164
<b>Médiane C</b>	<b>13,4165</b>	<b>9,884</b>	<b>Médiane C</b>	<b>12,9185</b>	<b>9,312</b>
Cd1	12,935	8,036	Cd1	13,578	10,192
Cd2	13,359	8,895	Cd2	14,117	10,337
Cd3	15,193	10,201	Cd3	14,105	10,194
Cd4	14,111	10,571	Cd4	13,466	10,232
Cd5	19,9	15,841	Cd5	14,436	10,33
Cd6	28,437	22,11	Cd6	13,773	10,33
<b>Médiane Cd</b>	<b>14,652</b>	<b>10,386</b>	<b>Médiane Cd</b>	<b>13,939</b>	<b>10,281</b>
Gd1	16,277	11,324	Gd1	14,157	9,36
Gd2	13,253	9,427	Gd2	12,403	9,627
Gd3	13,129	8,325	Gd3	13,604	10,366
Gd4	14,271	10,271	Gd4	15	9,495
Gd5	14,169	8,781	Gd5	14,435	11,231
Gd6	12,444	n.d	Gd6	14,64	11,265
<b>Médiane Gd</b>	<b>13,711</b>	<b>9,427</b>	<b>Médiane Gd</b>	<b>14,296</b>	<b>9,9965</b>
Sm1	14,287	11,239	Sm1	14,075	10,22
Sm2	12,889	8,168	Sm2	15,46	11,888
Sm3	14,772	11,17	Sm3	13,684	10,296
Sm4	12,543	9,271	Sm4	12,495	10,176
Sm5	13,212	9,511	Sm5	13,569	10,925
Sm6	13,989	10,863	Sm6	12,223	10
<b>Médiane Sm</b>	<b>13,6005</b>	<b>10,187</b>	<b>Médiane Sm</b>	<b>13,6265</b>	<b>10,258</b>
<b>Variation totale</b>	<b>1,125</b>	<b>1,262</b>	<b>Variation totale</b>	<b>3,106</b>	<b>2,5995</b>

## PCR quantitative

Pour tous les traitements nous avons étudié plusieurs voies de signalisation : la voie Pi3k/Akt/mTOR, la voie apoptotique, la détoxication, le stress cellulaire et le métabolisme énergétique. Pour la voie PI3K/Akt/mTOR nous avons analysé l'expression des gènes Akt, Pdk1, PI3K, mTOR et NfkB. La voie apoptotique comprend les gènes Bcl2, Bax, la caspase 8 (Cas 8), la caspase 3 (Cas 3) et p53. Pour la détoxication, nous avons uniquement analysé les métallothionéines (MT). L'expression des gènes HSP 70, HSP 90, p38 et JNK nous ont permis d'analyser l'impact sur le stress cellulaire. Le métabolisme énergétique a été étudié en analysant l'expression de l'ATP synthase et celle de la citrate synthase.

Dans toutes les conditions, l'expression des gènes cibles est appréciée en rapport à la condition contrôle. Les résultats de qPCR obtenus chez moules non exposées (condition contrôle) ont été standardisé à 1. Les chiffres cités représentent le facteur de surexpression s'il est  $> 1$  ou le facteur de répression s'il est  $< 1$ . Les gènes dont l'expression est modulée significativement seront décrits dans l'analyse des figures 2 à 10.

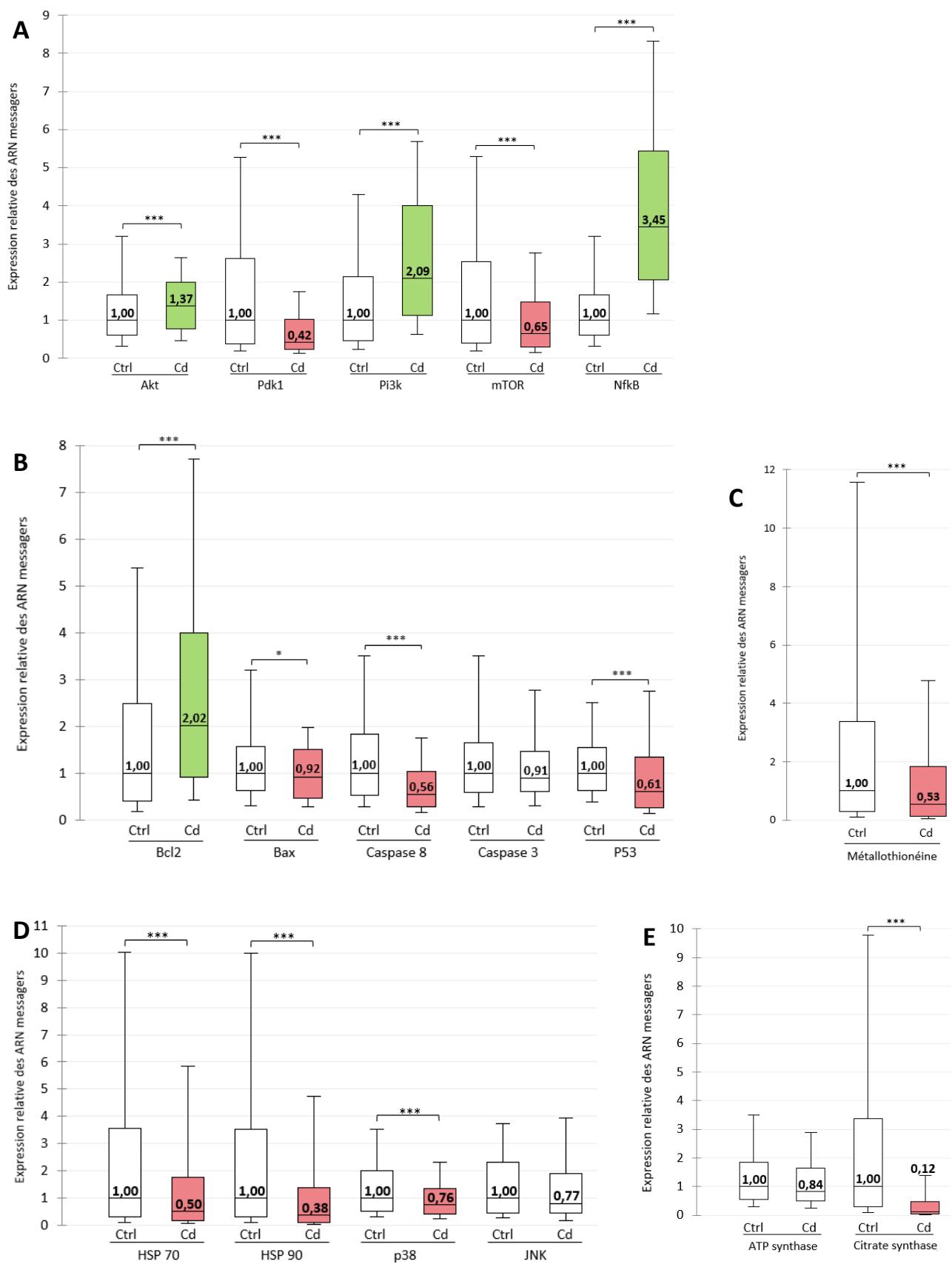
- Manteau

Les résultats obtenus sur le manteau après l'exposition à 0,5 mg/L de Cd sont représentés en **Figure 2**.

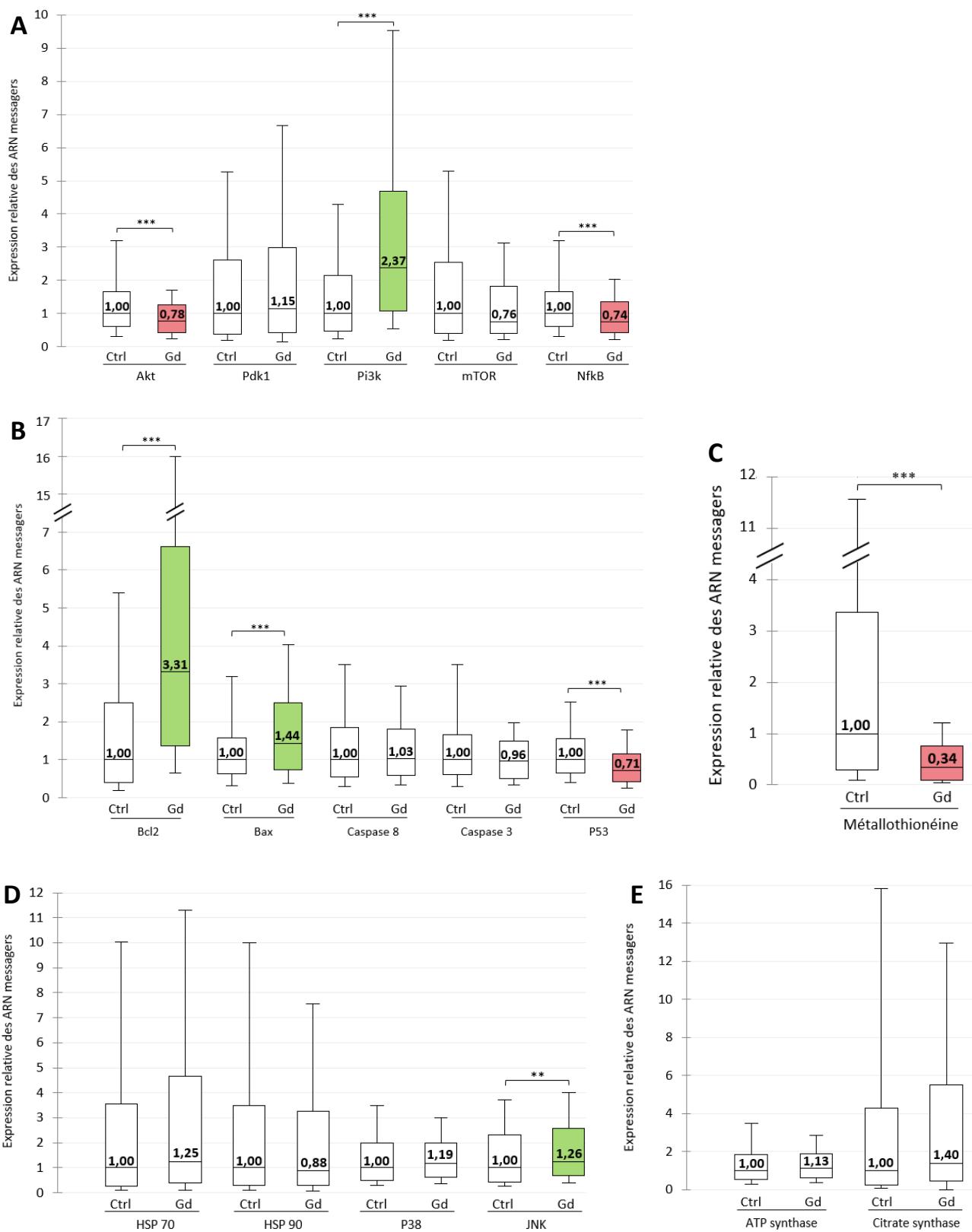
Pour la voie Pi3k/Akt/mTOR (**Figure 2A**), nous avons noté une augmentation significative de l'expression des ARNm d'Akt (1,367 ;  $p < 0,001$ ), de Pi3k (2,093 ;  $p < 0,001$ ) et de NfkB (3,453 ;  $p < 0,001$ ). A l'inverse, la répression de l'expression des ARNm de Pdk1 (0,422 ;  $p < 0,001$ ) et mTOR (0,651 ;  $p < 0,001$ ) a été relevé. Pour la voie apoptotique (**Figure 2B**), l'expression de l'ARNm de Bcl2 a été significativement augmentée (2,022 ;  $p < 0,001$ ). Contrairement à l'expression des ARNm de Bax (0,924 ;  $p < 0,05$ ), de la caspase 8 (0,557 ;  $p < 0,001$ ) et de p53 (0,614 ;  $p < 0,001$ ) qui a été réprimé. Pour la détoxication (**Figure 2C**), l'expression de l'ARNm des MT a été réprimée (0,527 ;  $p < 0,001$ ). Pour le stress cellulaire (**Figure 2D**), une répression de l'expression des ARNm de HSP 70 (0,495 ;  $p < 0,001$ ), HSP 90 (0,379 ;  $p < 0,001$ ) et p38 (0,760 ;  $p < 0,001$ ) a été observée. En ce qui concerne le métabolisme énergétique (**Figure 2E**), l'expression de l'ARNm de la citrate synthase a été réprimé (0,124 ;  $p < 0,001$ ).

Les résultats obtenus sur le manteau après l'exposition à 0,5 mg/L de Gd sont représentés en **Figure 3**.

Pour la voie Pi3k/Akt/mTOR (**Figure 3A**). Nous avons noté une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de la Pi3k (2,371 ;  $p < 0,001$ ). A l'inverse, l'expression des ARNm d'Akt (0,784 ;  $p < 0,001$ ) et de NfkB (0,741 ;  $p < 0,001$ ) a été réprimée. En ce qui concerne, l'impact sur la voie apoptotique (**Figure 3B**), l'expression des ARNm de Bcl2 (3,313 ;  $p < 0,001$ ) et de Bax (1,435 ;  $p < 0,001$ ) a été significativement augmentée. Contrairement à l'expression de l'ARNm de p53 (0,705 ;  $p < 0,001$ ) qui a été réprimée. Pour la détoxication (**Figure 3C**), l'expression de l'ARNm des MT a été réprimée (0,343 ;  $p < 0,001$ ). Pour le stress cellulaire (**Figure 3D**), nous avons observé une augmentation de l'expression de ARNm de JNK (1,257 ;  $p < 0,01$ ). Pour le métabolisme énergétique, aucun gène ne présente de différence significative avec le contrôle (**Figure 3E**).



**Figure 2 :** Expression relative des gènes impliqués dans la voie Pi3K/Akt/mTOR (A), dans la voie apoptotique (B), dans la détoxification (C), dans le stress (D) et dans le métabolisme énergétique (E) dans le manteau de *Mytilus edulis* après l'exposition à 0,5 mg/L de Cd. (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001)



**Figure 3 :** Expression relative des gènes impliqués dans la voie Pi3K/Akt/mTOR (A), dans la voie apoptotique (B), dans la détoxification (C), dans le stress (D) et dans le métabolisme énergétique (E) dans le manteau de *Mytilus edulis* après l'exposition à 0,5 mg/L de Gd. (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001)

Les résultats obtenus sur le manteau après l'exposition à 0,5 mg/L de Sm sont représentés en **Figure 4**.

Pour la voie PI3K/Akt/mTOR (**Figure 4A**), nous avons noté une augmentation significative de l'expression des ARNm de Pdk1 (1,398 ; p < 0,05), de Pi3k (1,654 ; p < 0,001), de mTOR (1,561 ; p < 0,001) et de NfkB (1,306 ; p < 0,001). En ce qui concerne, l'impact sur la voie apoptotique (**Figure 4B**), l'expression des ARNm de Bcl2 (1,810 ; p < 0,001) et de la caspase 8 (2,110 ; p < 0,001) a été significativement augmentée. Contrairement à l'expression de l'ARNm de la caspase 3 (0,729 ; p < 0,001) qui a été réprimée. Pour la détoxicification (**Figure 4C**), l'expression de l'ARNm des MT ne présente pas de différence significative avec le contrôle. Pour le stress cellulaire (**Figure 4D**), nous avons observé une augmentation de l'expression des ARNm de HSP 70 (1,907 ; p < 0,001) et de HSP 90 (1,283 ; p < 0,05). Pour le métabolisme énergétique (**Figure 4E**), l'expression de l'ARNm de la citrate synthase a été réprimée (0,714 ; p < 0,05).

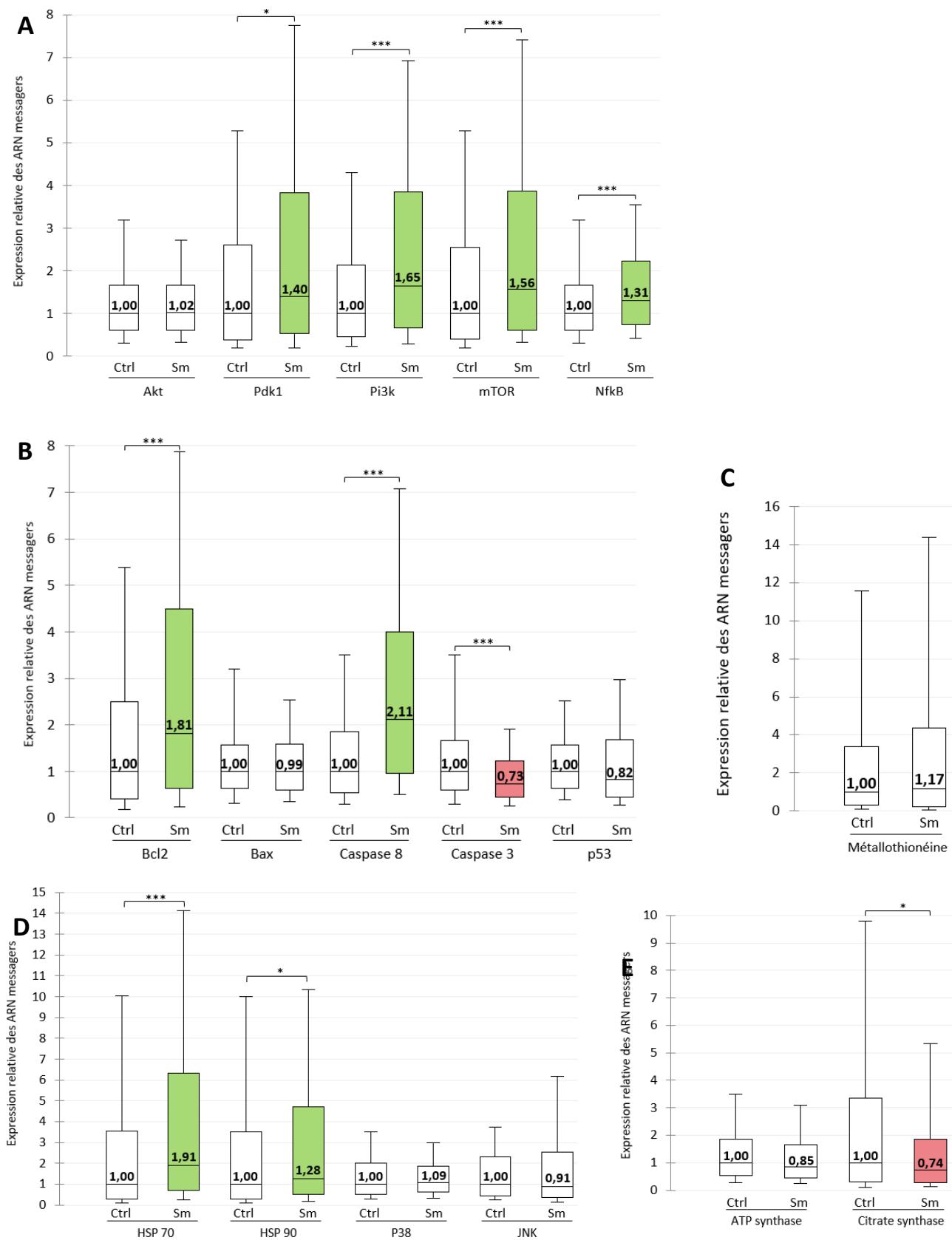
- Branchies

Les résultats obtenus sur les branchies après l'exposition à 0,5 mg/L de Cd sont représentés en **Figure 5**.

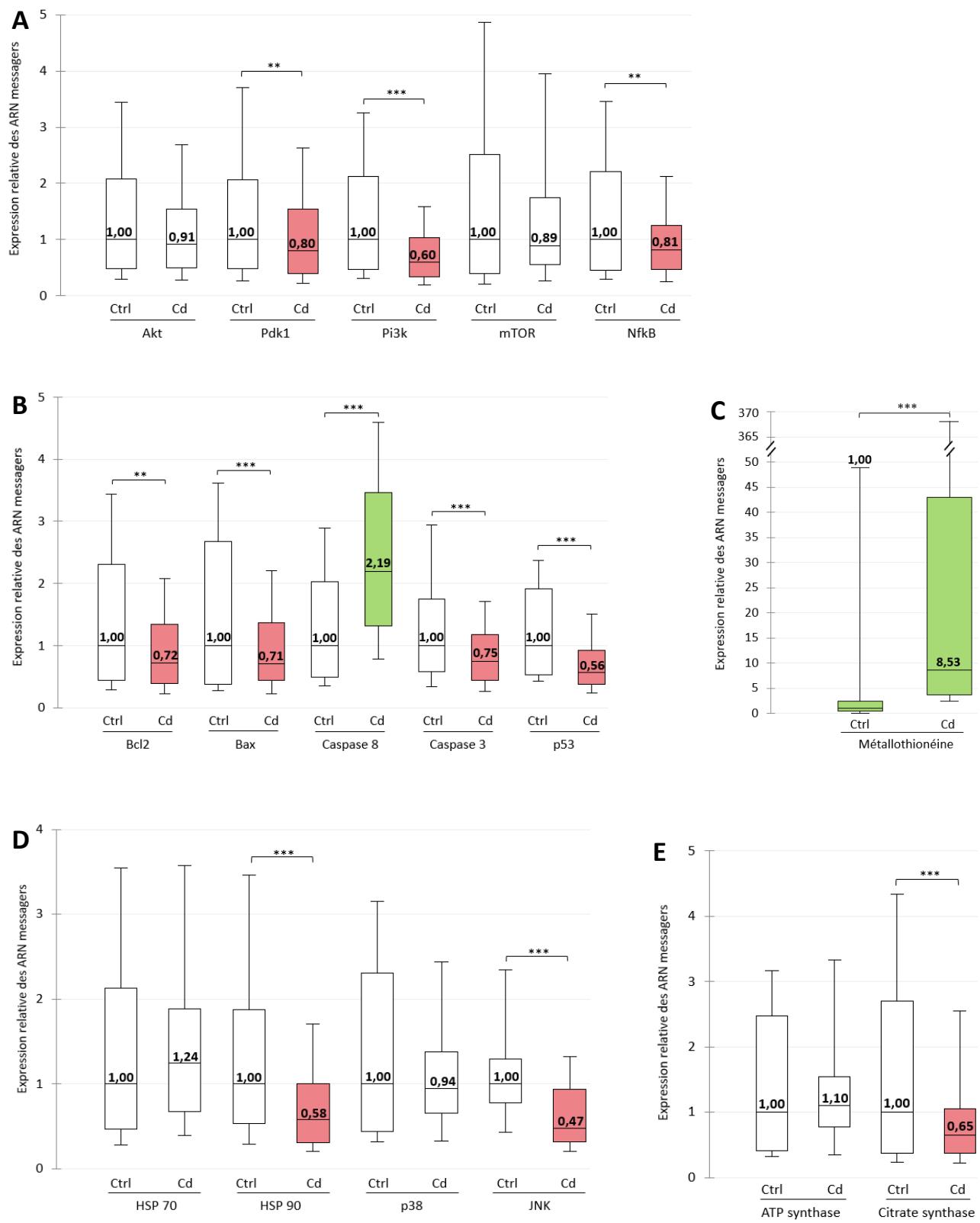
Pour la voie Pi3k/Akt/mTOR (**Figure 5A**), nous avons noté une répression significative de l'expression des ARNm de Pdk1 (0,802 ; p < 0,01), Pi3k (0,599 ; p < 0,001) et NfkB (0,813 ; p < 0,01). En ce qui concerne, l'impact sur la voie apoptotique (**Figure 5B**), l'expression de l'ARNm de la caspase 8 a été significativement augmentée (2,193 ; p < 0,001). A l'inverse, l'expression des ARNm de Bcl2 (0,715 ; p < 0,01), de Bax (0,709 ; p < 0,001), de la caspase 3 (0,749 ; p < 0,001) et de p53 (0,563 ; p < 0,001) a été significativement diminuée. Pour la détoxicification (**Figure 5C**), l'expression de l'ARNm des MT a été augmentée (8,530 ; p < 0,001). Pour le stress cellulaire (**Figure 5D**), nous avons noté une répression de l'expression des ARNm de HSP 90 (0,578 ; p < 0,001) et de JNK (0,473 ; p < 0,001). Pour le métabolisme énergétique (**Figure 5E**), l'expression de l'ARNm de la citrate synthase a été réprimée (0,651 ; p < 0,001).

Les résultats obtenus sur les branchies après l'exposition à 0,5 mg/L de Gd sont représentés en **Figure 6**.

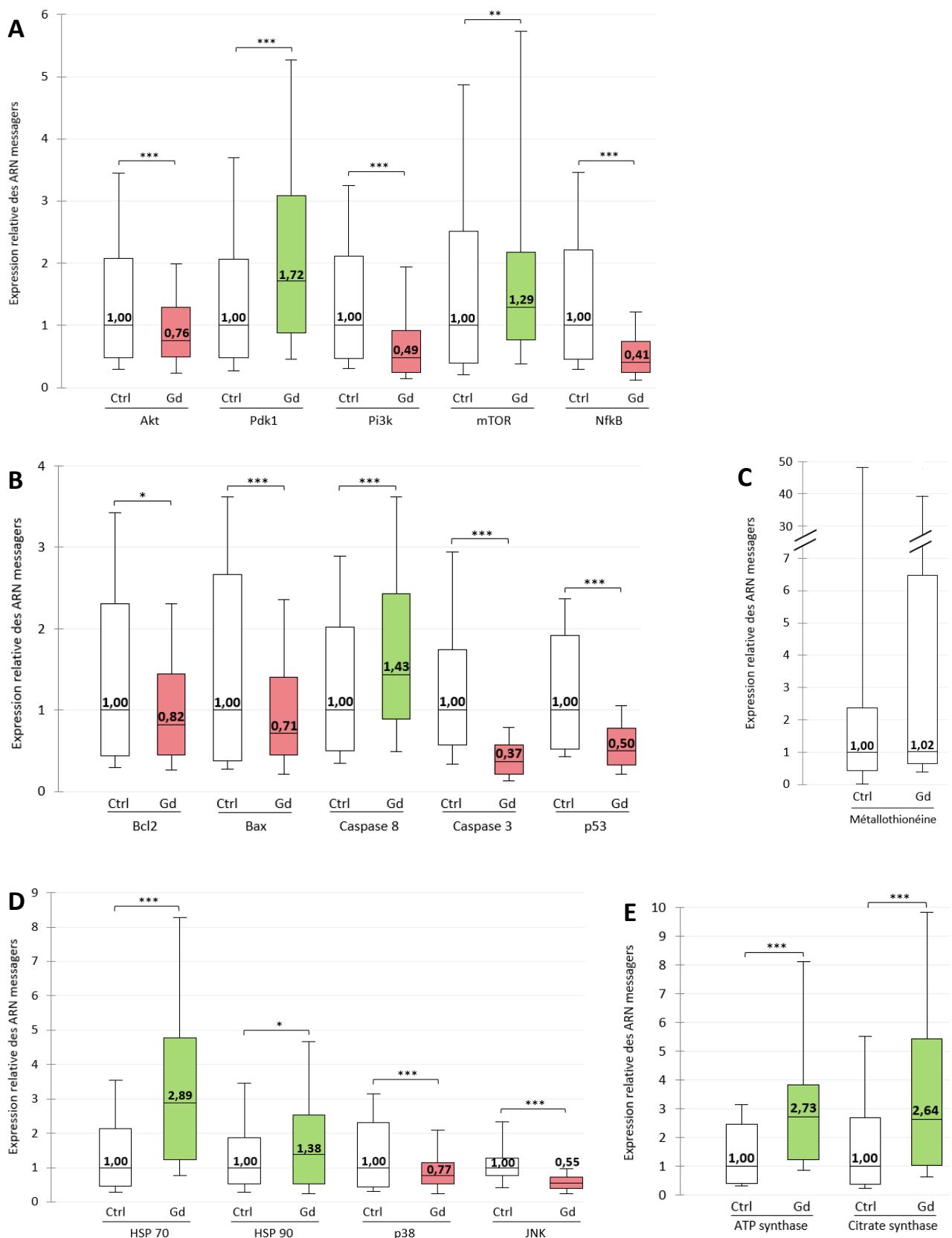
Pour la voie PI3K/Akt/mTOR, (**Figure 6A**), nous avons noté une augmentation de l'expression des ARNm de Pdk1 (1,718 ; p < 0,001) et de mTOR (1,291 ; p < 0,01). A l'inverse, une répression significative de l'expression des ARNm de Akt (0,759 ; p < 0,001), Pi3k (0,485 ; p < 0,001) et NfkB (0,409 ; p < 0,001) a été observée. En ce qui concerne, l'impact sur la voie apoptotique (**Figure 6B**), l'expression de l'ARNm de la caspase 8 a été significativement augmentée (1,434 ; p < 0,001). A l'inverse, l'expression des ARNm de Bcl2 (0,817 ; p < 0,05), de Bax (0,713 ; p < 0,001) de la caspase 3 (0,367 ; p < 0,001) et de p53 (0,496 ; p < 0,001) ont été significativement diminuée. Pour la détoxicification (**Figure 6C**), l'expression de l'ARNm des MT ne présente de différence significative avec le contrôle. Pour le stress cellulaire (**Figure 6D**), nous avons observé une augmentation de l'expression des ARNm de HSP 70 (2,891 ; p < 0,001) et de HSP 90 (1,381 ; p < 0,05). De plus, une répression de l'expression de p38 (0,772 ; p < 0,001) et de JNK (0,548 ; p < 0,001) a été relevée. Pour le métabolisme énergétique (**Figure 6E**), l'expression des ARNm de l'ATP synthase (2,725 ; p < 0,001) et de la citrate synthase (2,635 ; p < 0,001) a été réprimée.



**Figure 4 :** Expression relative des gènes impliqués dans la voie Pi3K/Akt/mTOR (A), dans la voie apoptotique (B), dans la détoxification (C), dans le stress (D) et dans le métabolisme énergétique (E) dans le manteau de *Mytilus edulis* après l'exposition à 0,5 mg/L de Sm. (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001)



**Figure 5 :** Expression relative des gènes impliqués dans la voie Pi3K/Akt/mTOR (A), dans la voie apoptotique (B), dans la détoxication (C), dans le stress (D) et dans le métabolisme énergétique (E) dans les branchies de *Mytilus edulis* après l'exposition à 0,5 mg/L de Cd. (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001)



**Figure 6 :** Expression relative des gènes impliqués dans la voie Pi3K/Akt/mTOR (A), dans la voie apoptotique (B), dans la détoxication (C), dans le stress (D) et dans le métabolisme énergétique (E) dans les branchies de *Mytilus edulis* après l'exposition à 0,5 mg/L de Gd. (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001)

Les résultats obtenus sur les branchies après l'exposition à 0,5 mg/L de Sm sont représentés en **Figure 7**.

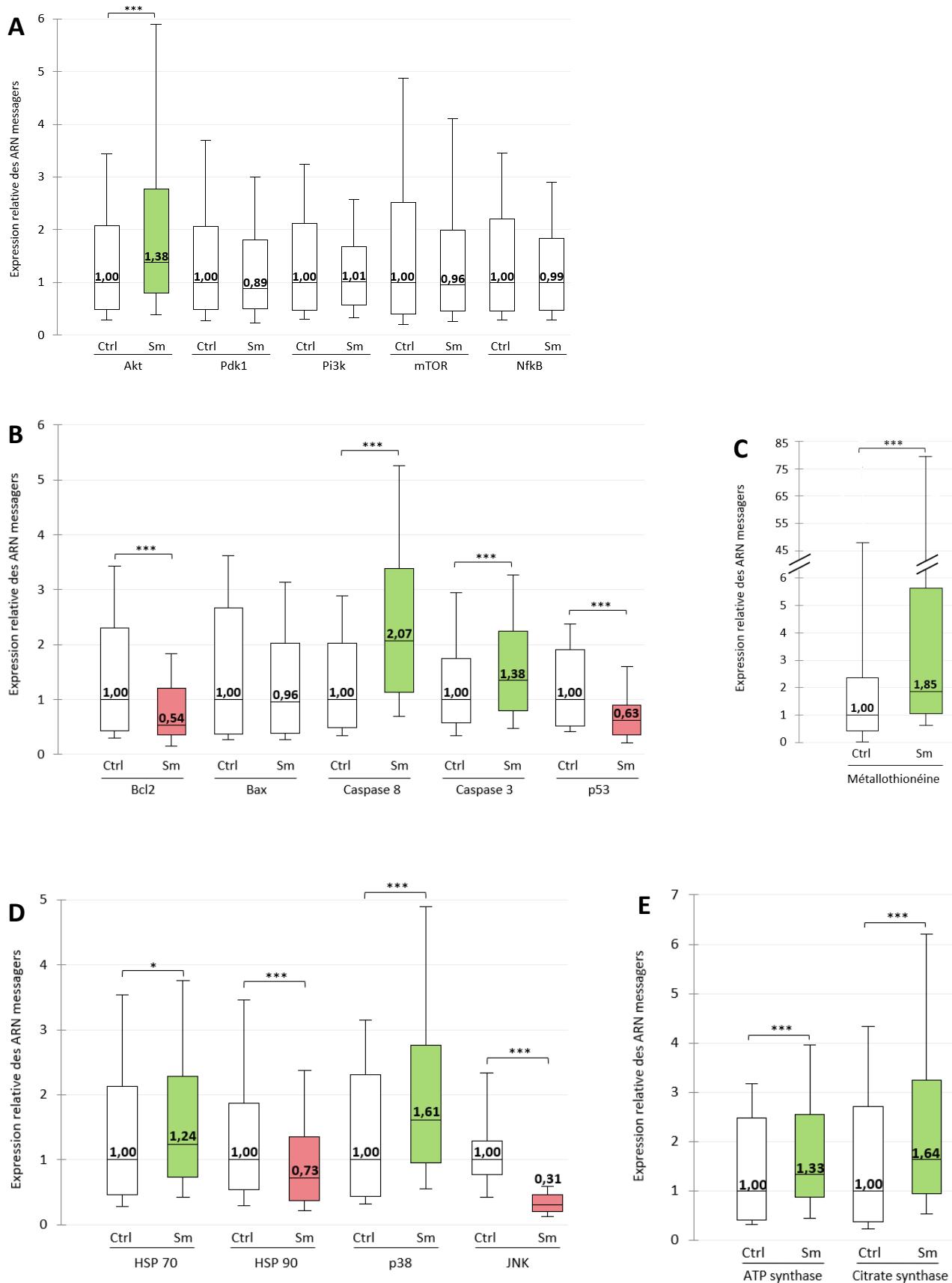
Pour la voie PI3K/Akt/mTOR, (**Figure 7A**), nous avons noté une augmentation de l'expression de l'ARNm d'Akt (1,383 ;  $p < 0,001$ ). En ce qui concerne, l'impact sur la voie apoptotique (**Figure 7B**), une augmentation de l'expression de l'ARNm de la caspase 8 (2,071 ;  $p < 0,001$ ) et de la caspase 3 (1,348 ;  $p < 0,001$ ) a été observée. A l'inverse, l'expression des ARNm de Bcl2 (0,537 ;  $p < 0,001$ ) et de p53 (0,625 ;  $p < 0,001$ ) a été significativement diminuée. Pour la détoxicification (**Figure 7C**), l'expression de l'ARNm des MT a été augmentée (1,830 ;  $p < 0,001$ ). Pour le stress cellulaire (**Figure 7D**), nous avons observé une augmentation de l'expression des ARNm de HSP 70 (1,242 ;  $p < 0,05$ ) et de p38 (1,607 ;  $p < 0,001$ ). De plus, une répression de l'expression de HSP 90 (0,728 ;  $p < 0,001$ ) et de JNK (0,305 ;  $p < 0,001$ ) a été relevé. Pour le métabolisme énergétique (**Figure 7E**), l'expression des ARNm de l'ATP synthase (1,331 ;  $p < 0,001$ ) et de la citrate synthase (1,640 ;  $p < 0,001$ ) a été augmentée.

Les résultats obtenus sur la glande digestive après l'exposition à 0,5 mg/L de Cd sont présentés en **Figure 8**.

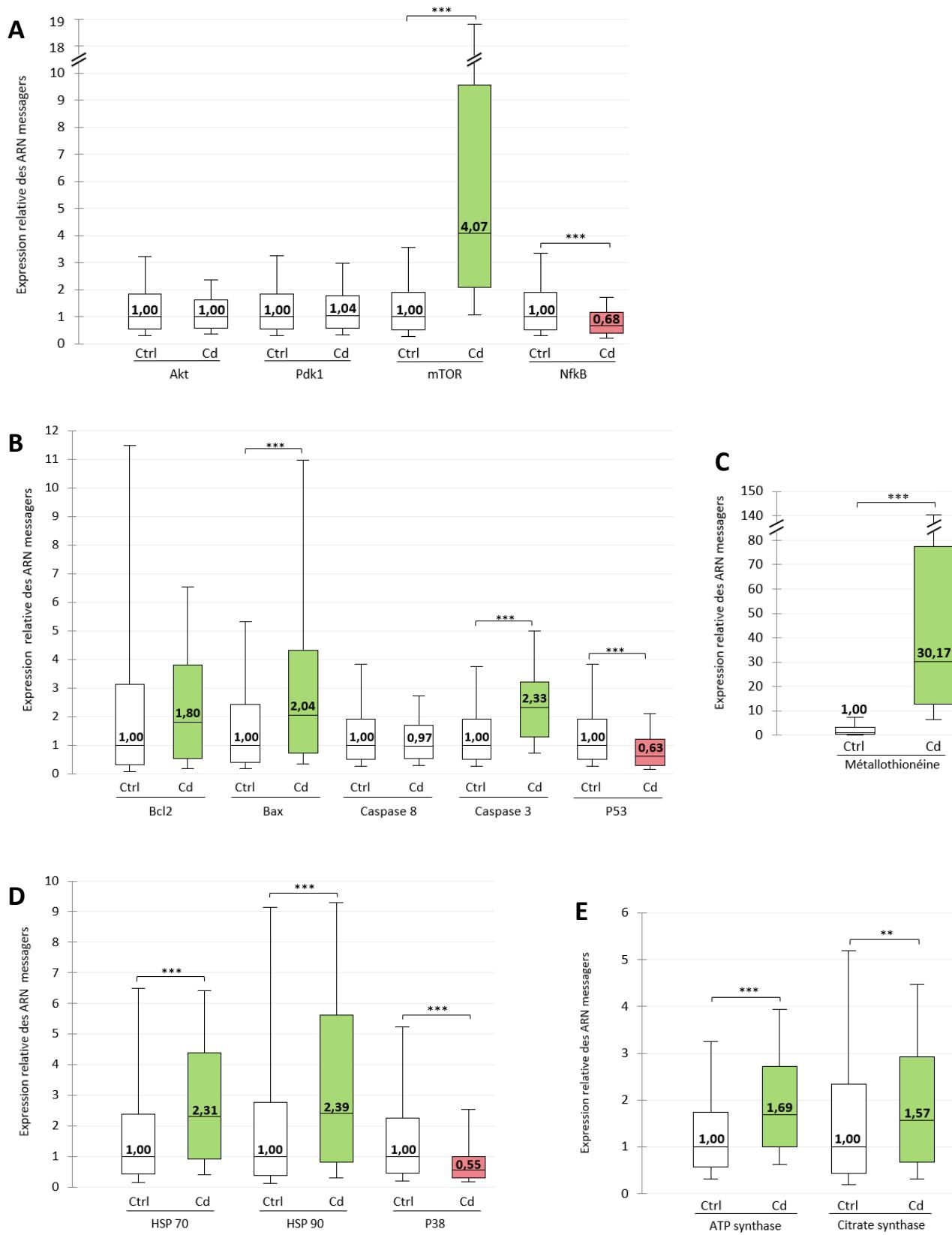
Pour la voie Pi3k/Akt/mTOR, (**Figure 8A**), nous avons noté une augmentation de l'expression de l'ARNm de mTOR (4,074 ;  $p < 0,001$ ) ainsi qu'une répression de l'expression de l'ARNm de NfkB (0,684 ;  $p < 0,001$ ). Les données pour le gène PI3K ne sont pas disponibles. En ce qui concerne l'impact sur la voie apoptotique (**Figure 8B**), nous avons noté une augmentation de l'expression des ARNm de Bcl2 (1,804 ;  $p < 0,01$ ), de Bax (2,043 ;  $p < 0,001$ ) et de la caspase 3 (2,334 ;  $p < 0,001$ ). A l'inverse, l'expression de l'ARNm de p53 a été significativement réduite (0,632 ;  $p < 0,001$ ). Pour la détoxicification (**Figure 8C**), l'expression de l'ARNm des MT a été augmentée (30,169 ;  $p < 0,001$ ). Pour le stress cellulaire (**Figure 8D**), nous avons observé une augmentation de l'expression des ARNm de HSP 70 (2,308 ;  $p < 0,001$ ) et de HSP 90 (2,393 ;  $p < 0,001$ ). De plus, une répression de l'expression de p38 (0,546 ;  $p < 0,001$ ) a été relevé. Les données pour le gène JNK ne sont pas disponibles. Pour le métabolisme énergétique (**Figure 8E**), l'expression des ARNm de l'ATP synthase (1,686 ;  $p < 0,001$ ) et de la citrate synthase a été augmenté (1,568 ;  $p < 0,01$ ).

Les résultats obtenus sur la glande digestive après l'exposition à 0,5 mg/L de Gd sont présentés en **Figure 9**.

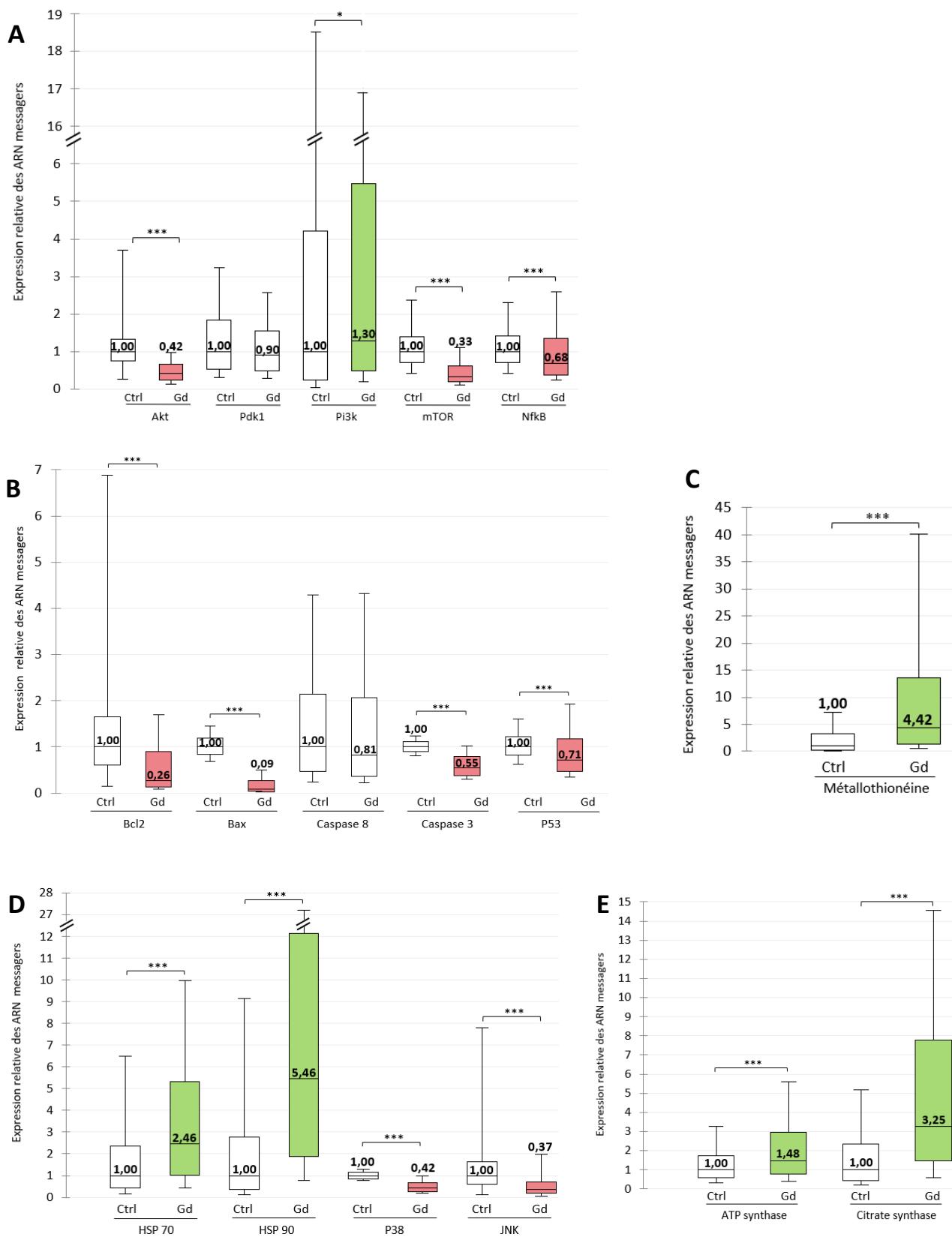
Pour la voie Pi3k/Akt/mTOR (**Figure 9A**), nous avons noté une augmentation de l'expression de l'ARNm de Pi3k (1,295 ;  $p < 0,05$ ) ainsi qu'une répression de l'expression des ARNm d'Akt (0,422 ;  $p < 0,001$ ), de mTOR (0,330 ;  $p < 0,001$ ) et de NfkB (0,682 ;  $p < 0,001$ ). En ce qui concerne l'impact sur la voie apoptotique (**Figure 9B**), nous avons noté une répression de l'expression des ARNm de Bcl2 (0,262 ;  $p < 0,001$ ), de Bax (0,092 ;  $p < 0,001$ ) de la caspase 3 (0,552 ;  $p < 0,001$ ) et de p53 (0,707 ;  $p < 0,001$ ). Pour la détoxicification (**Figure 9C**), l'expression de l'ARNm des MT a été augmentée (4,423 ;  $p < 0,001$ ). Pour le stress cellulaire (**Figure 9D**), nous avons observé une augmentation de l'expression des ARNm de HSP 70 (2,461 ;  $p < 0,001$ ) et de HSP 90 (5,464 ;  $p < 0,001$ ). De plus, une répression de l'expression de p38 (0,419 ;  $p < 0,001$ ) et de JNK (0,366 ;  $p < 0,001$ ) a été relevée. Pour le métabolisme énergétique (**Figure 9E**), l'expression des ARNm de l'ATP synthase (1,478 ;  $p < 0,001$ ) et de la citrate synthase (3,246 ;  $p < 0,001$ ) a été augmentée.



**Figure 7 :** Expression relative des gènes impliqués dans la voie Pi3k/Akt/mTOR (A), dans la voie apoptotique (B), dans la détoxification (C), dans le stress (D) et dans le métabolisme énergétique (E) dans les branchies de *Mytilus edulis* après l'exposition à 0,5 mg/L de Sm. (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001)



**Figure 8 :** Expression relative des gènes impliqués dans la voie Pi3k/Akt/mTOR (A), dans la voie apoptotique (B), dans la détoxication (C), dans le stress (D) et dans le métabolisme énergétique (E) dans la glande digestive de *Mytilus edulis* après l'exposition à 0,5 mg/L de Cd. (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001)



**Figure 9 :** Expression relative des gènes impliqués dans la voie Pi3k/Akt/mTOR (A), dans la voie apoptotique (B), dans la détoxication (C), dans le stress (D) et dans le métabolisme énergétique (E) dans la glande digestive de *Mytilus edulis* après l'exposition à 0,5 mg/L de Gd. (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001)

Les résultats obtenus sur la glande digestive après l'exposition à 0,5 mg/L de Sm sont présentés en **Figure 10**.

Pour la voie Pi3k/Akt/mTOR (Figure 10A), nous avons noté une augmentation de l'expression de l'ARNm de mTOR (2,164 ;  $p < 0,001$ ) ainsi qu'une répression de l'expression de l'ARNm de Pdk1 (0,454 ;  $p < 0,001$ ). En ce qui concerne l'impact sur la voie apoptotique (Figure 10B), nous avons noté une augmentation de l'expression de l'ARNm de Bcl2 (2,402 ;  $p < 0,001$ ) ainsi qu'une répression de celle de p53 (0,665 ;  $p < 0,001$ ). Pour la détoxicification (Figure 10C), l'expression de l'ARNm des MT a été augmentée (6,023 ;  $p < 0,001$ ). Pour le stress cellulaire (Figure 10D), nous avons observé une augmentation de l'expression de l'ARNm de HSP 70 (1,829 ;  $p < 0,001$ ). De plus, une répression de l'expression des ARNm de p38 (0,825 ;  $p < 0,05$ ) et de JNK (0,542 ;  $p < 0,001$ ) a été relevé. Pour le métabolisme énergétique (Figure 10E), l'expression des ARNm de l'ATP synthase (1,932 ;  $p < 0,001$ ) et de la citrate synthase (1,767 ;  $p < 0,001$ ) a été augmentée.

## 4) Discussion

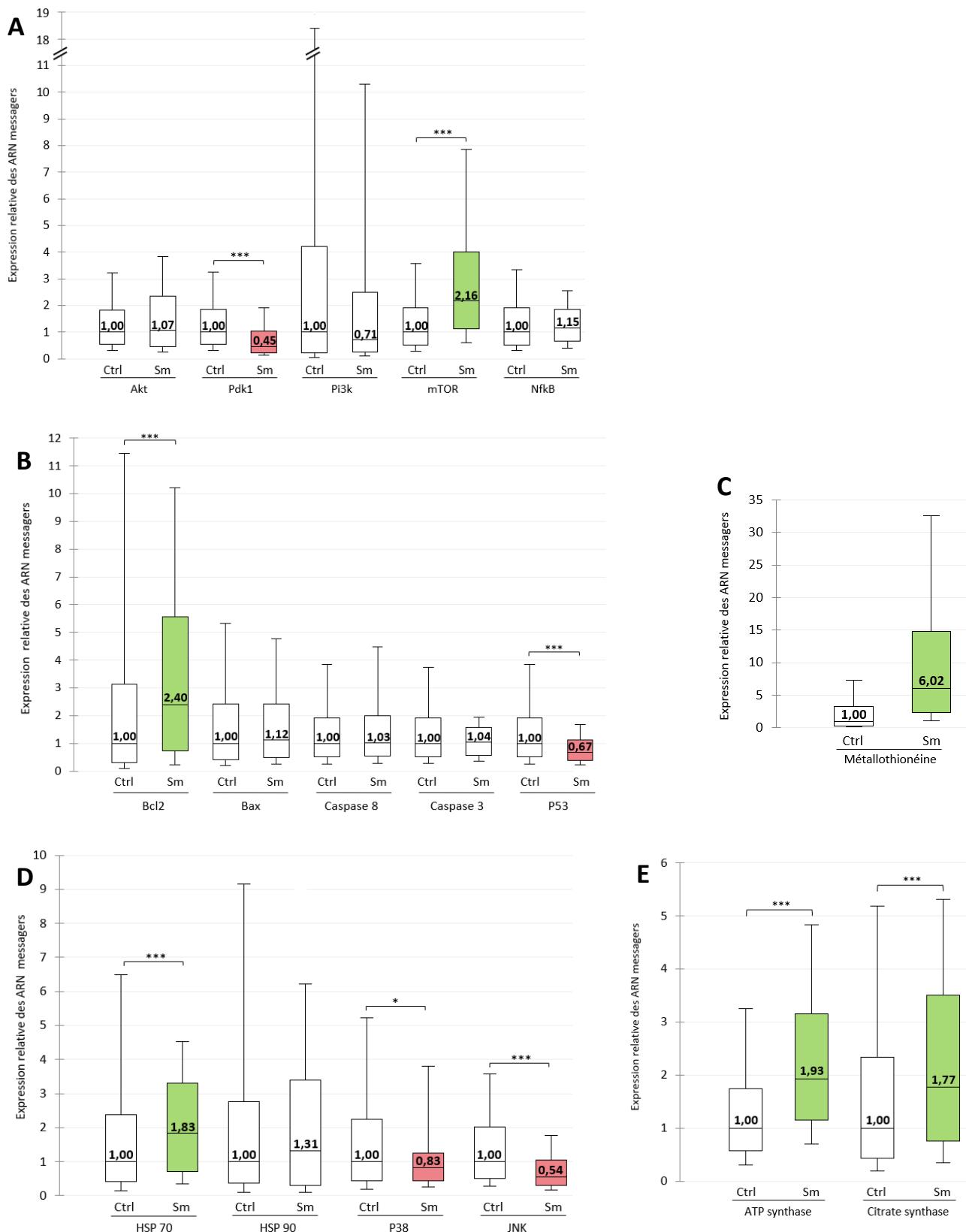
### RT-qPCR après l'exposition de *M. edulis* à 0,5 mg/L de Cd :

- Le manteau

Le manteau est un tissu faisant partie de la voie secondaire d'absorption des polluants chez la moule. Dans le manteau des moules exposées à 0,5 mg/L de Cd, l'expression de la citrate synthase a été divisé par 8,06. Ceci suggérerait alors une diminution du métabolisme énergétique. L'expression des ARNm des HSP et de p38 a été réprimée alors que pour l'exposition au Sm sur le même tissu l'expression des ARNm des HSP a été augmenté.

Nous avons noté une augmentation de l'expression de l'ARNm de Bcl2 qui est un gène anti-apoptotique. Ceci est en lien avec la diminution de l'expression des ARNm des gènes pro-apoptotiques que sont Bax, la caspase 8 et p53. L'apoptose est donc clairement diminuée dans le manteau après exposition au Cd.

Pour la voie Pi3k/Akt/mTOR, l'expression de l'ARNm de la Pi3k a été multipliée par 2,09 et celle de l'ARNm de NfkB a été multipliée par 3,45. Sachant que la Pi3k est impliquée dans la prolifération cellulaire (Hay, 2011 ; Fruman et al. 2017) et que NfkB est impliqué dans les signaux de croissance, dans la prolifération cellulaire, dans la différenciation cellulaire et dans la défense contre l'apoptose (Alharbi et al. 2021), ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus pour la voie apoptotique (effet anti-apoptotique). La prolifération/survie cellulaire et le métabolisme pourraient donc être augmenté dans le manteau par le Cd tandis que l'apoptose serait inhibée.



**Figure 10 :** Expression relative des gènes impliqués dans la voie Pi3k/Akt/mTOR (A), dans la voie apoptotique (B), dans la détoxication (C), dans le stress (D) et dans le métabolisme énergétique (E) dans la glande digestive de *Mytilus edulis* après l'exposition à 0,5 mg/L de Sm. (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001)

- Les branchies

Sur les branchies, les résultats obtenus pour la voie Pi3k/Akt/mTOR sont en faveur d'une diminution cependant, l'expression des ARNm de Pdk1, de la Pi3k et de NfkB est faiblement réprimée par rapport au contrôle, moins de 2 fois. L'expression de l'ARNm d'un gène est une étape précoce pouvant menée à la formation de la protéine, néanmoins des modifications post-traductionnelles peuvent modifiées le message induit par l'ARNm. De plus, l'expression de l'ARNm d'Akt n'a pas été augmenté. Ces 2 facteurs montrent que la prolifération/survie cellulaire ne sera pas forcément réprimée même si les ARNm de 3 gènes inclus dans cette voie ont été réprimé.

L'expression de l'ARNm de JNK a été divisé par 2,13, le Sm n'a donc pas induit de stress faisant intervenir les HSP et p38, ces résultats sont similaires à ceux retrouvés dans le manteau.

L'expression de l'ARNm des métallothionéines a été augmenté 8,53 fois par rapport au contrôle ceci montre que les moules exposées ont probablement réagi au stress induit par le Cd en se liant à ce dernier, en effet, les MT jouent un rôle de protection cellulaire, elles ont une forte affinité de liaison avec les ions métalliques bivalents (les métaux comme le Cd se retrouve sous la forme d'ion bivalent dans les cellules) (N Thirumoorthy et al. 2007).

- La glande digestive

Une augmentation de l'expression des ARNm de HSP 70 et HSP 90, respectivement 2,31 et 2,39 fois supérieure au contrôle a été observée, cela suggérerait un possible stress engendré par le Cd cependant l'expression de l'ARNm de la MAP kinase p38 a été diminuée, les 2 familles de protéines réagiraient donc différemment au stress induit par le Cd. Une tendance similaire est retrouvée dans les branchies et la glande digestive des moules exposées au Gd ainsi que dans la glande digestive des moules exposées au Sm dans lesquelles l'expression des ARNm des HSP est augmentée alors que celle des kinases de stress p38 et JNK est diminuée. A l'heure actuelle aucune autre étude à mis en évidence cet effet contraire.

L'expression de l'ARNm des MT a été augmentée 30,17 fois par rapport au contrôle, ceci confirme d'autant plus les résultats obtenus dans les branchies (augmentation de 8,53 fois). Ces résultats suggèreraient que les MT se retrouvent en plus grande quantité chez les moules exposées que chez les moules non exposées. Une étude de Bebianno & Seràfilm (2003) sur *Ruditapes decussatus* (palourde) conforte cet argument, en effet, ils ont retrouvé de plus forte quantité de MT dans la glande digestive que dans les branchies après une exposition des moules à un gradient de Cd.

Si l'on compare les résultats obtenus avec l'exposition au Cd sur 3 tissus, aucune tendance claire ne se dessine à part l'augmentation de l'expression de l'ARNm des métallothionéines dans les branchies et dans la glande digestive. Cette augmentation a déjà été retrouvé dans plusieurs études (Espinoza et al. 2012 ; Liu et al. 2017) dont celle de Bian & Gao (2021) sur les embryons de poissons zèbre. Ces derniers présentaient une augmentation de l'expression des ARNm des métallothionéine 32 (exposition jusqu'à 12 heures post

fécondation) et 77 (exposition jusqu'à 24 heures post-fécondation) fois supérieure à celle du contrôle après une exposition à 0,89 µM de Cd, cette concentration est 5 fois inférieure à celle utilisée dans notre étude.

RT-qPCR après l'exposition de *M. edulis* à 0,5 mg/L de Gd :

- Le manteau

Pour ce tissu, peu de modifications ont été relevées, seulement l'expression de l'ARNm des métallothionéines a été divisé par 2,92 par rapport au contrôle. Ces résultats sont opposés aux résultats trouvés dans la glande digestive, dans laquelle l'ARNm des MT est multiplié par 4,42.

- Les branchies

Pour la voie Pi3k/Akt/mTOR, l'expression des ARNm de la Pi3k et de NfkB sont au minimum divisé 2 par rapport au contrôle. Ceci suggérerait une diminution de la prolifération comme c'est le cas pour dans les branchies avec l'exposition au Cd.

L'expression des ARNm de l'ATP synthase et de la citrate synthase a été augmentée 2,73 fois et 2,64 fois respectivement. L'ATP synthase fournit des fonctions essentielles pendant la respiration. Des niveaux d'expression plus élevées d'ATP synthase suggéreraient des performances métaboliques plus élevées avec davantage de production d'ATP chez les moules exposées au Gd que chez les moules contrôles (Kerambrun et al. 2016). Il en est de même pour la citrate synthase, en effet, cette dernière est augmentée lorsque les capacités métaboliques de la moule se retrouvent exacerbées.

L'expression des ARNm des HSP a été augmentée alors que celle de p38 et JNK a été diminuée. Ces 2 familles de protéines (HSP et kinases de stress) semblent réagir de manière différente au stress oxydant induit par le Gd. Les mêmes résultats ont été retrouvé dans la glande digestive après l'exposition au Gd ainsi que dans la glande digestive après exposition au Sm.

- La glande digestive

Pour la voie Pi3k/Akt/mTOR, l'expression des ARNm de Akt et de mTOR sont au minimum divisé 2 par rapport au contrôle. Cette régulation similaire des ARNm de Akt et de mTOR suggéreraient une diminution de la prolifération/survie cellulaire, cette tendance est aussi retrouvée dans les branchies.

Pour l'apoptose, une diminution de l'expression des ARNm de Bcl2 et de Bax respectivement 3,85 fois inférieure et 11,1 fois inférieure a été observée. Au vu de la très forte diminution pour le gène Bax qui est pro-apoptotique, l'exposition semblerait entraîner un effet anti-apoptotique. Une étude de Lacroix et al. (2014) a aussi montré une inhibition de l'expression des ARNm de gènes intervenant dans l'apoptose que sont les caspases 3 (sous type 7-3 et 7-4) dans la glande digestive des moules exposées à la pollution (moules introduites dans un port soumis à une multitude de contaminants incluant les métaux).

L'expression des ARNm de l'ATP synthase et de la citrate synthase a été augmentée de 1,48 et 3,45 fois respectivement, ces résultats sont très semblables à ceux retrouvés dans les branchies et suggéreraient une augmentation du métabolisme énergétique similaires dans ces deux organes suite à une exposition au Gd.

L'expression des ARNm des HSP a été augmentée alors que celle des ARNm de p38 et de JNK a été diminuée, les HSP et les kinases de stress (p38 et JNK) semblent traduire un message différent comme dans les branchies.

L'expression de l'ARNm des métallothionéines a été augmenté 4,42 fois par rapport au contrôle, ceci montre que les moules exposées ont réagi au stress induit par le Gd en se liant probablement à ce dernier (N Thirumoorthy et al. 2007).

Si l'on compare les résultats obtenus avec l'exposition au Gd sur les branchies et la glande digestive, il se dessine une tendance qui est en faveur d'une diminution de la prolifération et d'une augmentation de l'expression des HSP et d'une augmentation du métabolisme. Cette augmentation du métabolisme énergétique a déjà été décrite par Andrade et al., en effet les bivalves soumis à des conditions stressantes (privation d'air pendant 3 à 6 h) présentaient une augmentation de leur capacité métabolique. A l'inverse, les résultats observés sur le manteau ne semblent pas suivre la tendance néanmoins ce tissu est moins sensible à l'exposition au polluant.

#### RT-qPCR après l'exposition de *M. edulis* à 0,5 mg/L de Sm :

- Le manteau

Pour la voie Pi3k/Akt/mTOR, l'expression des ARNm de Pdk1, de Pi3k, de mTOR et de NfkB a été augmentée. La régulation similaire des ARNm de Pdk1 et de Pi3k suggérerait une augmentation de la prolifération/survie cellulaire. mTOR et NfkB jouent un rôle dans la prolifération cellulaire mais ont aussi d'autre rôle majeur comme la synthèse protéique et la régulation de l'apoptose respectivement. Dans les analyses métabolomiques (**Annexe 1**), le PIP3 avait été augmenté dans la glande digestive quel que soit le traitement, ce dernier est produit grâce à la Pi3k qui phosphoryle le PIP2. La surexpression de l'ARNm de la Pi3k est donc en accord avec les résultats des analyses métabolomiques. Le Sm tout comme le Cd induise une augmentation de la prolifération dans le manteau de *Mytilus edulis*.

L'expression des ARNm des HSP a aussi été augmentée ce qui affirme qu'un stress a été induit par le Sm.

- Les branchies

L'expression des ARNm de l'ATP synthase et de la citrate synthase a été légèrement augmentée, le métabolisme énergétique pourrait ainsi être augmenté comme dans les branchies des moules exposées au Gd.

Pour le stress, seule l'expression de l'ARNm de JNK a été divisé par 3,23, ces résultats sont différents de ceux trouvés sur le manteau, en effet, dans ce dernier, aucune expression significative de l'ARNm de JNK n'avait été trouvé. De plus l'ARNm des HSP n'a pas été surexprimé dans les branchies alors qu'ils l'étaient dans le manteau.

Pour l'apoptose, une diminution de l'expression de l'ARNm de Bcl2 ainsi que l'augmentation de celle des caspases semble montrer une tendance pro-apoptotique.

L'expression de l'ARNm des métallothionéines a été légèrement augmenté par rapport au contrôle ceci supposerait que les moules exposées ont réagi au Sm en se fixant à ce dernier de la même façon que les MT prennent en charge le Cd.

- La glande digestive

L'expression des ARNm de l'ATP synthase et de la citrate synthase a été légèrement augmentée dans la glande digestive, ceci suggère que le métabolisme énergétique pourrait être augmenté. Ces résultats sont similaires à ceux retrouvés dans le manteau.

Pour le stress, les HSP et les kinases de stress (p38 et JNK) semblent traduire un message différent. En effet l'expression des ARNm des HSP a été légèrement augmenté alors que celle de p38 et JNK a été légèrement diminué. Ces 2 familles de protéines réagiraient de manière différente au stress. Ces résultats se retrouvent aussi dans les branchies et la glande digestive des moules exposées au Gd.

Pour l'apoptose, une augmentation de l'expression de l'ARNm de Bcl2 ainsi que la diminution de celle de p53 semble montrer une tendance anti-apoptotique. Ceci est en contradiction avec les résultats obtenus sur les branchies.

L'expression de l'ARNm des métallothionéines a été multipliée par 6 par rapport au contrôle ceci confirmerait l'hypothèse déjà émise sur les branchies, c'est-à-dire que les métallothionéines prendraient en charge le Sm.

Si l'on compare les résultats obtenus avec l'exposition au Sm sur les 3 tissus, aucune tendance claire ne se dessine à part l'augmentation de l'expression de l'ARNm des MT dans les branchies et dans la glande digestive. Cette tendance se retrouve aussi pour les moules exposées au Cd ainsi que dans les branchies des moules exposées au Gd.

## 5) Conclusion et Perspectives

Cette étude visait à évaluer le mécanisme d'action du Cd, du Gd et du Sm *via* une l'analyse transcriptionnelle de la voie Pi3k/Akt/mTOR, de la voie apoptotique, du métabolisme énergétique, des kinases de stress, des HSP ainsi que de la détoxicification afin de mieux comprendre l'impact de ces métaux sur la physiologie de *Mytilus edulis*. Cette étude souligne une augmentation de l'expression de l'ARNm des métallothionéines dans les branchies des moules exposées au Cd et au Sm ainsi que dans la glande digestive pour tous les traitements (Cd, Gd et Sm). L'exposition de *Mytilus edulis* à 0,5 µg/L de Gd à montrer que ce métal induirait une diminution de l'expression transcriptionnelle de la voie Pi3k/Akt/mTOR ainsi qu'une augmentation de celle des HSP et du métabolisme énergétique ce qui pourrait affecter la physiologie de la moule bleue. Cependant, nos résultats restent très mitigés en effet, des signaux opposés se dessinent notamment pour la voie Pi3k/Akt/mTOR, en effet après l'exposition au Cd cette voie est réprimée dans les branchies, augmentée dans le manteau.

En plus de l'utilisation d'enzymes antioxydantes (GST, SOD, CAT) comme signes précurseurs de pollution, les voies de signalisation citées précédemment pourraient servir de nouvel indicateur physiologique pour la surveillance précoce du stress oxydant causé par les métaux, mais aussi causé par d'autres polluants environnementaux.

Les travaux futurs devraient étudier davantage les effets physiologiques en aval déclenchés par la voie Pi3k/Akt/mTOR, par l'apoptose, par les kinases de stress et les HSP, par le métabolisme énergétique et par la détoxicification en évaluant d'abord les principaux acteurs métaboliques aux niveaux protéiques à l'aide d'analyse Western Blot. De plus, des analyses protéomiques pourraient être utilisées pour déterminer la localisation et l'abondance de chaque protéine et vérifier si des modifications post-traductionnelles (ubiquitination, phosphorylation...) interviennent et induisent un signal différent des analyses transcriptionnelles. D'autres mécanismes peuvent induire un message protéique différent du message de l'ARNm, en effet, les microARN peuvent inhiber l'ARNm d'un gène ce qui empêche alors son expression protéique (Yimei et al. 2009).

Par ailleurs, des études, suggérant que la température a un impact sur l'expression de certains gènes (HSP, Cas 3, Cas 8), ont déjà été réalisées pour prendre en compte l'impact des changements climatiques futurs (Zhang et al. 2014 ; Kefaloyianni et al. 2005 ; Yao & Somero, 2012). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de ces 3 métaux combiné à une augmentation de la température de l'eau sur la moule *Mytilus edulis* (sujet de thèse interne au laboratoire ISOMer débuté en 2023).

A l'heure actuelle, il est long et coûteux d'étudier l'effet des contaminants dans l'environnement marin, notre étude a été réalisé sur 18 mois. Dans ce contexte, l'ambition du projet SPECTROBS est de développer des outils alternatifs et innovants, simples, rapide et peu coûteux, pour évaluer l'état de santé des organismes marins sentinelles. La spectroscopie infrarouge proche (NIRS) et la spectroscopie Raman peuvent être utilisées pour fournir des empreintes chimiques des échantillons étudiés qui pourraient aider à créer des modèles de prédiction à partir des données spectrales générées. Cela s'inscrit dans le projet SPECTROBS initiée par Aurore Zalouk-Vergnoux de Nantes Université, qui vise à utiliser la spectroscopie pour évaluer le bien-être des organismes sentinelles et confirmer l'utilisation de *M. edulis* comme bon indicateur biologique. Étant donné que peu d'articles peuvent être trouvés dans les revues scientifiques, le projet SPECTROBS semble être un projet pionnier dans l'utilisation de la spectroscopie dans les études écotoxicologiques et repose sur l'hypothèse que la qualité de l'environnement, entraînerait des changements spectraux spécifiques et importants chez les organismes exposés, qui pourraient être révélés par la NIRS et la spectroscopie Raman couplée à la chimiométrie.

## Références Bibliographiques

- Aceto, Serena, Giulia Formisano, Francesca Carella, Gionata De Vico, et Luciano Gaudio (2011). « The Metallothionein Genes of *Mytilus Galloprovincialis*: Genomic Organization, Tissue Expression and Evolution ». *Marine Genomics* 4, n° 1 (mars 2011): 61-68.
- Akagi, Tasuku, et Keisuke Edanami (2017). « Sources of Rare Earth Elements in Shells and Soft-Tissues of Bivalves from Tokyo Bay ». *Marine Chemistry* 194 (août 2017): 55-62.
- Alharbi, Khalid Saad, Neeraj Kumar Fuloria, Shivkanya Fuloria, Sk Batin Rahman, Waleed Hassan Al-Malki, Mohammad Arshad Javed Shaikh, Lakshmi Thangavelu, et al. (2020) « Nuclear Factor-Kappa B and Its Role in Inflammatory Lung Disease ». *Chemico-Biological Interactions* 345 (août 2021): 109568.
- Andrade, Madalena, Amadeu Soares, Etelvina Figueira, et Rosa Freitas (2018). « Biochemical Changes in Mussels Submitted to Different Time Periods of Air Exposure ». *Environmental Science and Pollution Research* 25, n° 9 (1 mars 2018): 8903-13.
- Balaram, V. (2019) « Rare Earth Elements: A Review of Applications, Occurrence, Exploration, Analysis, Recycling, and Environmental Impact ». *Geoscience Frontiers* 10, n° 4 (juillet 2019): 1285-1303.
- Bau, Michael, Andrea Knappe, et Peter Dulski (2006). « Anthropogenic Gadolinium as a Micropollutant in River Waters in Pennsylvania and in Lake Erie, Northeastern United States ». *Geochemistry* 66, n° 2 (mai 2006): 143-52.
- Bebianno, M. J., et M. A. Serafim. « Variation of Metal and Metallothionein Concentrations in a Natural Population of *Ruditapes Decussatus* ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, n° 1 (1 janvier 2003): 0053-0066.
- Bergsten-Torralba, L.R., D.P. Magalhães, E.C. Giese, C.R.S. Nascimento, J.V.A. Pinho, et D.F. Buss (2020). « Toxicity of Three Rare Earth Elements, and Their Combinations to Algae, Microcrustaceans, and Fungi ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 201 (septembre 2020): 110795.
- Beyer, Jonny, Norman W. Green, Steven Brooks, Ian J. Allan, Anders Ruus, Tânia Gomes, Inger Lise N. Bråte, et Merete Schøyen (2017). « Blue Mussels (*Mytilus Edulis* Spp.) as Sentinel Organisms in Coastal Pollution Monitoring: A Review ». *Marine Environmental Research* 130 (septembre 2017): 338-65.
- Bian, Xiaoxue, et Yongfei Gao (2021). « DNA Methylation and Gene Expression Alterations in Zebrafish Embryos Exposed to Cadmium ». *Environmental Science and Pollution Research* 28, n° 23 (1 juin 2021): 30101-10.
- Borgmann Uwe, Couillard Yves, Doyle Patrick, Dixon D. George (2009). « Toxicity of sixty-three metals and metalloids to *Hyalella azteca* at two levels of water hardness ». *Environmental Toxicology and Chemistry*
- Cai, Yimei, Xiaomin Yu, Songnian Hu, et Jun Yu (2009). « A Brief Review on the Mechanisms of MiRNA Regulation ». *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 7, n° 4 (décembre 2009): 147-54.

Collins, Christina L., Nicholas P. Burnett, Matthew J. Ramsey, Kaitlyn Wagner, et Mackenzie L. Zippay (2020). « Physiological Responses to Heat Stress in an Invasive Mussel *Mytilus Galloprovincialis* Depend on Tidal Habitat ». *Marine Environmental Research* 154 (février 2020): 104849.

Demirci-Çekiç, Sema, Gülay Özkan, Aslı Neslihan Avan, Seda Uzunboy, Esra Çapanoğlu, et Reşat Apak. « Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense » (2022). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 209 (février 2022): 114477.

Espinoza, Herbert M., Chase R. Williams, et Evan P. Gallagher (2012). « Effect of Cadmium on Glutathione S-Transferase and Metallothionein Gene Expression in Coho Salmon Liver, Gill and Olfactory Tissues ». *Aquatic Toxicology* 110-111 (avril 2012): 37-44.

Figueiredo, Cátia, Rui Oliveira, Clara Lopes, Pedro Brito, Miguel Caetano, et Joana Raimundo (2022). « Rare Earth Elements Biomonitoring Using the Mussel *Mytilus Galloprovincialis* in the Portuguese Coast: Seasonal Variations ». *Marine Pollution Bulletin* 175 (février 2022): 113335.

Freitas, Rosa, Celso E.D. Cardoso, Silvana Costa, Tiago Morais, Pedro Moleiro, André F.D. Lima, Márcio Soares, et al (2020 a). « New Insights on the Impacts of E-Waste towards Marine Bivalves: The Case of the Rare Earth Element Dysprosium ». *Environmental Pollution* 260 (mai 2020): 113859.

Freitas, Rosa, Silvana Costa, Celso E. D Cardoso, Tiago Morais, Pedro Moleiro, Ana C. Matias, Ana F. Pereira, et al (2020 b). « Toxicological Effects of the Rare Earth Element Neodymium in *Mytilus Galloprovincialis* ». *Chemosphere* 244 (avril 2020): 125457.

Frumian, David A., Honyin Chiu, Benjamin D. Hopkins, Shubha Bagrodia, Lewis C. Cantley, et Robert T. Abraham (2017). « The PI3K Pathway in Human Disease ». *Cell* 170, n° 4 (août 2017): 605-35.

Gwenzi, Willis, Lynda Mangori, Conelia Danha, Nhamo Chaukura, Nothando Dunjana, et Edmond Sanganyado. « Sources, Behaviour, and Environmental and Human Health Risks of High-Technology Rare Earth Elements as Emerging Contaminants ». *Science of The Total Environment* 636 (septembre 2018): 299-313.

Hamed, Mohamed A., et Ahmed M. Emara (2006). « Marine Molluscs as Biomonitor for Heavy Metal Levels in the Gulf of Suez, Red Sea ». *Journal of Marine Systems* 60, n° 3-4 (mai 2006): 220-34.

Hanana, Houda, Patrice Turcotte, Maxime Dubé, Christian Gagnon, et François Gagné (2018). « Response of the Freshwater Mussel, *Dreissena Polymorpha* to Sub-Lethal Concentrations of Samarium and Yttrium after Chronic Exposure ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 165 (décembre 2018): 662-70.

Hay, Nissim (2011). « Interplay between FOXO, TOR, and Akt ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813, n° 11 (novembre 2011): 1965-70.

Henriques, Bruno, Francesca Coppola, Rui Monteiro, João Pinto, Thainara Viana, Carlo Pretti, Amadeu Soares, Rosa Freitas, et Eduarda Pereira (2019). « Toxicological Assessment of Anthropogenic Gadolinium in Seawater: Biochemical Effects in Mussels *Mytilus Galloprovincialis* ». *Science of The Total Environment* 664 (mai 2019): 626-34.

İşıldar, Arda, Eldon R. Rene, Eric D. Van Hullebusch, et Piet N.L. Lens (2018). « Electronic Waste as a Secondary Source of Critical Metals: Management and Recovery Technologies ». *Resources, Conservation and Recycling* 135 (août 2018): 296-312.

Jebali, Jamel, Lassaad Chouba, Mohamed Banni, et Hamadi Boussetta (2014). « Comparative Study of the Bioaccumulation and Elimination of Trace Metals (Cd, Pb, Zn, Mn and Fe) in the Digestive Gland, Gills and Muscle of Bivalve *Pinna Nobilis* during a Field Transplant Experiment ». *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 28, n° 2 (avril 2014): 212-17.

Jenardhanan, Pranitha, Manivel Panneerselvam, et Premendu P. Mathur (2016). « Effect of Environmental Contaminants on Spermatogenesis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 59 (novembre 2016): 126-40.

Kefaloyianni, Erene, Eleni Gourgou, Vanessa Ferle, Efstatios Kotsakis, Catherine Gaitanaki, et Isidoros Beis (2005). « Acute Thermal Stress and Various Heavy Metals Induce Tissue-Specific pro-or Anti-Apoptotic Events via the P38-MAPK Signal Transduction Pathway in *Mytilus Galloprovincialis* (Lam.) ». *Journal of Experimental Biology* 208, n° 23 (1 décembre 2005): 4427-36.

Kerambrun, E., D. Rioult, L. Delahaut, L. Evariste, S. Pain-Devin, M. Auffret, A. Geffard, et E. David. (2016) « Variations in Gene Expression Levels in Four European Zebra Mussel, *Dreissena Polymorpha*, Populations in Relation to Metal Bioaccumulation: A Field Study ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 134 (décembre 2016): 53-63.

Khan, Aysha Masood, Shima Behkami, Ismail Yusoff, Sharifuddin Bin Md Zain, Nor Kartini Abu Bakar, Ahmad Farid Abu Bakar, et Yatimah Alias (2017). « Geochemical Characteristics of Rare Earth Elements in Different Types of Soil: A Chemometric Approach ». *Chemosphere* 184 (octobre 2017): 673-78.

Kubier, Andreas, Kay Hamer, et Thomas Pichler (2020). « Cadmium Background Levels in Groundwater in an Area Dominated by Agriculture ». *Integrated Environmental Assessment and Management* 16, n° 1 (1 janvier 2020): 103-13.

Kulaksız, Serkan, et Michael Bau (2011). « Anthropogenic Gadolinium as a Microcontaminant in Tap Water Used as Drinking Water in Urban Areas and Megacities ». *Applied Geochemistry* 26, n° 11 (novembre 2011): 1877-85.

Lacroix, C., V. Coquillé, J. Guyomarch, M. Auffret, et D. Moraga (2014). « A Selection of Reference Genes and Early-Warning mRNA Biomarkers for Environmental Monitoring Using *Mytilus* Spp. as Sentinel Species ». *Marine Pollution Bulletin* 86, n° 1-2 (septembre 2014): 304-13.

Le Saux, Aimie, Elise David, Stéphane Betouille, Florence Bultelle, Béatrice Rocher, Iris Barjhoux, et Claudia Cosio (2020). « New Insights into Cellular Impacts of Metals in Aquatic Animals ». *Environments* 7, n° 6 (16 juin 2020): 46.

Liu, Guo-Di, Zhang Sheng, Cong-Cong Hou, Jie Ni, Ying-Li Han, You-Fa Wang, Yang Zhou, Su-Yan Fu, et Jun-Quan Zhu. « Molecular Cloning, Characterization and Expression Analysis of Metallothionein in the Liver of the Teleost *Acrossocheilus fasciatus* Exposed to Cadmium Chloride ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 53 (juillet 2017): 1-9.

Louis, Fanny, Béatrice Rocher, Iris Barjhoux, Florence Bultelle, Odile Dedourge-Geffard, Véronique Gaillet, Isabelle Bonnard, et al (2020). « Seasonal Monitoring of Cellular Energy Metabolism in a Sentinel Species, *Dreissena polymorpha* (Bivalve): Effect of Global Change? ». *Science of The Total Environment* 725 (juillet 2020): 138450.

Martino, Chiara, Roberto Chiarelli, Liana Bosco, et Maria Carmela Roccheri (2017). « Induction of Skeletal Abnormalities and Autophagy in *Paracentrotus lividus* Sea Urchin Embryos Exposed to Gadolinium ». *Marine Environmental Research* 130 (septembre 2017): 12-20.

Martino, Chiara, Caterina Costa, Maria Carmela Roccheri, Demian Koop, Rosaria Scudiero, et Maria Byrne (2018). « Gadolinium Perturbs Expression of Skeletogenic Genes, Calcium Uptake and Larval Development in Phylogenetically Distant Sea Urchin Species ». *Aquatic Toxicology* 194 (janvier 2018): 57-66.

Möller, Peter, Andrea Knappe, et Peter Dulski (2014). « Seasonal Variations of Rare Earths and Yttrium Distribution in the Lowland Havel River, Germany, by Agricultural Fertilization and Effluents of Sewage Treatment Plants ». *Applied Geochemistry* 41 (février 2014): 62-72.

Oluwasola, Idowu Ebenezer, Abdul Latif Ahmad, Noor Fazlani Shoparwe, et Suzylawati Ismail (2022). « Gadolinium Based Contrast Agents (GBCAs): Uniqueness, Aquatic Toxicity Concerns, and Prospective Remediation ». *Journal of Contaminant Hydrology* 250 (octobre 2022): 104057.

Orbea, Amaia, Maren Ortiz-Zarragoitia, et Miren P. Cajaraville (2008). « Interactive Effects of Benzo(a)Pyrene and Cadmium and Effects of Di(2-Ethylhexyl) Phthalate on Antioxidant and Peroxisomal Enzymes and Peroxisomal Volume Density in the Digestive Gland of Mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk ». *Biomarkers*, 29 septembre 2008.

Parant, Marc, Emilie Perrat, Philippe Wagner, Christophe Rosin, Jean-Sebastien Py, et Carole Cossu-Leguille (2018). « Variations of Anthropogenic Gadolinium in Rivers Close to Waste Water Treatment Plant Discharges ». *Environmental Science and Pollution Research* 25, n° 36 (1 décembre 2018): 36207-22.

Rabiet, M., F. Brissaud, J.L. Seidel, S. Pistre, et F. Elbaz-Poulichet (2009). « Positive Gadolinium Anomalies in Wastewater Treatment Plant Effluents and Aquatic Environment in the Hérault Watershed (South France) ». *Chemosphere* 75, n° 8 (mai 2009): 1057-64.

Raftopoulou, E.K., et V.K. Dimitriadis (2011). « Comparative Study of the Accumulation and Detoxification of Cu (Essential Metal) and Hg (Nonessential Metal) in the Digestive Gland and Gills of Mussels *Mytilus Galloprovincialis*, Using Analytical and Histochemical Techniques ». *Chemosphere* 83, n° 8 (mai 2011): 1155-65.

Ricciardi Karen L, Poynton Helen C, Duphily Brian J, Blalock Bonnie J, Robinson William E (2015). « Bioconcentration and depuration of <sup>14</sup>C-labeled 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol and 4-nonylphenol in individual organs of the marine bivalve *Mytilus edulis* L. » *Environmental Toxicology and Chemistry*

Rocha, Thiago Lopes, Eider Bilbao, Cátia Cardoso, Manu Soto, et Maria João Bebianno (2018). « Changes in Metallothionein Transcription Levels in the Mussel *Mytilus Galloprovincialis* Exposed to CdTe Quantum Dots ». *Ecotoxicology* 27, n° 4 (1 mai 2018): 402-10.

Rocha, Thiago Lopes, Tânia Gomes, Nélia C. Mestre, Cátia Cardoso, et Maria João Bebianno (2015). « Tissue Specific Responses to Cadmium-Based Quantum Dots in the Marine Mussel *Mytilus Galloprovincialis* ». *Aquatic Toxicology* 169 (décembre 2015): 10-18.

Schmidt, Katja, Michael Bau, Gila Merschel, et Nathalie Tepe (2019). « Anthropogenic Gadolinium in Tap Water and in Tap Water-Based Beverages from Fast-Food Franchises in Six Major Cities in Germany ». *Science of The Total Environment* 687 (octobre 2019): 1401-8.

Schmittgen, Thomas D., et Kenneth J. Livak (2008). « Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method ». *Nature Protocols* 3, n° 6 (juin 2008): 1101-8.

Simon, H.-U., A. Haj-Yehia, et F. Levi-Schaffer (2000). « Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Apoptosis Induction ». *Apoptosis* 5, n° 5 (1 novembre 2000): 415-18.

Skipper, Anthony, Jennifer N. Sims, Clement G. Yedjou, et Paul B. Tchounwou (2016). « Cadmium Chloride Induces DNA Damage and Apoptosis of Human Liver Carcinoma Cells via Oxidative Stress ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13, n° 1 (janvier 2016).

Soazig, Lemoine, et Laulier Marc (2003). « Potential Use of the Levels of the mRNA of a Specific Metallothionein Isoform (MT-20) in Mussel (*Mytilus Edulis*) as a Biomarker of Cadmium Contamination ». *Marine Pollution Bulletin* 46, n° 11 (novembre 2003): 1450-55.

Sulmon, Cécile, Joan Van Baaren, Francisco Cabello-Hurtado, Gwenola Gouesbet, Françoise Hennion, Cendrine Mony, David Renault, et al (2015). « Abiotic Stressors and Stress Responses: What Commonalities Appear between Species across Biological Organization Levels? » *Environmental Pollution* 202 (juillet 2015): 66-77.

Tamele, Isidro José, et Patricia Vázquez Loureiro (2020). « Lead, Mercury and Cadmium in Fish and Shellfish from the Indian Ocean and Red Sea (African Countries): Public Health Challenges ». *Journal of Marine Science and Engineering* 8, n° 5 (mai 2020): 344.

- Thirumoorthy, N., KT Manisenthil Kumar, A. Shyam Sundar, L. Panayappan, et Malay Chatterjee (2007). « Metallothionein: An Overview ». *World Journal of Gastroenterology : WJG* 13, n° 7 (2 février 2007): 993.
- Trapasso, Giacomo, Stefania Chiesa, Rosa Freitas, et Eduarda Pereira (2021). « What Do We Know about the Ecotoxicological Implications of the Rare Earth Element Gadolinium in Aquatic Ecosystems? » *Science of The Total Environment* 781 (août 2021): 146273.
- Wright, Anita C., Ying Fan, et George L. Baker (2018). « Nutritional Value and Food Safety of Bivalve Molluscan Shellfish ». *Journal of Shellfish Research* 37, n° 4 (octobre 2018): 695-708.
- Yao, Cui-Luan, et George N. Somero (2012). « The Impact of Acute Temperature Stress on Hemocytes of Invasive and Native Mussels ( *Mytilus Galloprovincialis* and *M. Californianus* ): DNA Damage, Membrane Integrity, Apoptosis and Signalling Pathways ». *Journal of Experimental Biology*, 1 janvier 2012, jeb.073577.
- Zhang, Chunhong, Qianquan Li, Muxin Zhang, Na Zhang, et Minhui Li (2013). « Effects of Rare Earth Elements on Growth and Metabolism of Medicinal Plants ». *Acta Pharmaceutica Sinica B* 3, n° 1 (février 2013): 20-24.
- Zhang, Duo, Hong-Wei Wang, et Cui-Luan Yao. « Molecular and Acute Temperature Stress Response Characterizations of Caspase-8 Gene in Two Mussels, *Mytilus Coruscus* and *Mytilus Galloprovincialis* ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 177-178 (novembre 2014): 10-20.
- Zhu, Qiqi, Xiaoheng Li, et Ren-Shan Ge (2020). « Toxicological Effects of Cadmium on Mammalian Testis ». *Frontiers in Genetics* 11 (2020).

## Résumé

Le rejet croissant de métaux lourds et de terre rares dans le milieu aquatique a soulevé des préoccupations en aquaculture. Ces métaux ont été identifiés en concentrations significatives dans la moule bleue *Mytilus edulis*. Cette étude visait à évaluer l'impact du cadmium, du gadolinium et du samarium sur *Mytilus edulis* en se concentrant sur les voies de signalisation pouvant être altérées par le stress oxydant. Dans les études préliminaires, les moules ont été exposées pendant huit jours à cinq traitements métalliques (cadmium dissous – 0,05 et 0,5 mg/L, gadolinium dissous – 0,5 mg/L, samarium dissous – 0,5mg/L). Les marqueurs de stress oxydant que sont la Glutathione-S-Transferase (GST) et la Superoxide dismutase (SOD) ont été affectés par la concentration de 0,5mg/L de cadmium, gadolinium et samarium dissous dans les branchies, le manteau et la glande digestive. Les analyses métabolomiques sur la glande digestive ont également révélées une augmentation du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate membranaire (PIP3) à une concentration de 0,5mg/L pour les 3 traitements. La RTqPCR (RetroTranscription quantitative Polymerase Chain Reaction) a été utilisée pour évaluer le niveau d'expression de l'ARNm de gènes impliqués dans différentes voies cellulaire telle que la voie Pi3k/Akt/mTOR (Akt-Pdk1-Pi3k-mTOR-NfkB), l'apoptose (Bcl2-Bax-Caspase3-Caspase8-p53), le métabolisme énergétique (ATP synthase-Citrate synthase), le stress (HSP70-HSP90-p38-JNK) et la détoxicification (Métallothionéine). Les résultats obtenus ont montré une augmentation significative de l'ARNm des métallothionéines dans la glande digestive de *Mytilus edulis* quel que soit le métal.

Mots clés : ARNm, Métallothionéine, voie Pi3k/Akt/mTOR, apoptose, métabolisme énergétique

## Abstract

The increasing release of heavy metals and rare earth into the aquatic environment has raised concerns in aquaculture. These metals were identified in significant concentrations in the blue mussel *Mytilus edulis*. The purpose of this study was to assess the impact of cadmium, gadolinium and samarium on *Mytilus edulis* by focusing on signalling pathways that may be altered by oxidative stress. In the preliminary studies, mussels were exposed for eight days to five metal treatments (dissolved cadmium – 0.05 and 0.5 mg/L, dissolved gadolinium – 0.5 mg/L, dissolved samarium – 0.5 mg/L). The oxidizing stress markers Glutathione-S-Transferase (GST) and Superoxide dismutase (SOD) were affected by the 0.5mg/L concentration of cadmium, gadolinium and samarium dissolved in the gills, mantle and digestive gland. Metabolomic analyses of the digestive gland also revealed an increase in 3,4,5-Membranary Phosphatidylinositol (PIP3) at a concentration of 0.5mg/L for all 3 treatments. RTqPCR (RetroTranscription quantitative Polymerase Chain Reaction) was used to assess the level of mRNA expression of genes involved in different cell pathways such as Pi3k/Akt/mTOR (Akt-Pdk1-Pi3k-mTOR-NfkB), apoptosis (Bcl2-Bax-Caspase3-Caspase8-p53), energy metabolism (ATP synthase-Citrate synthase), stress (HSP70-HSP90-p38-JNK) and detoxification (Metallothionein). The results obtained showed a significant increase in mRNA of metallothioneins in the digestive gland of *Mytilus edulis* regardless of the metal.

Keywords : mRNA, Metallothionein, Pi3k/Akt/mTOR pathway, apoptosis, energy metabolism

**Annexe 3 :** Tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées

Gène	Organisme de base	N° d'accession de l'organisme de base	Amorces après Bioedit	Taille amplicon en pb	GC%
ATP synthase	<i>M.edulis</i>	AY580269.1	-TCTCTTGGTGGAGCAGGAG	106	55
			-CTCCCCCTACTCCTGCAAACA		
Citrate synthase	<i>D.polymorpha</i>	MN579511 + Blastn	-AGGAGGAAATGTCAGTGCTCA	100	48
			-TGGTCCAGCTAACGCCATTCA		50
Métallothionéine 10	<i>M.galloprovincialis</i>	AY566248.1 + Blastn	-GTGTAGCGGTGAAGGTTGTC	122	55
			-TACATCCTCCTTCACACGCA		50
Métallothionéine 20	<i>M.galloprovincialis</i>	FL495847.1 + Blastn	-GTGTAGCGGTGAAGGTTGTC	122	55
			-TACATCCTCCTTCACACGCA		50
Hsp70	<i>M.edulis</i>	AF172607.1	-AGTGAAAACAAGCGTGCTGT	144	45
			-CCTGGCTCTTGTATGCTTG		55
Hsp90	<i>M.coruscus</i>	KT946644.1 + Blastn	-CTCCGCTTACCTTGTGCTG	135	55
			-CCTCTACCGACAGACTCACC		60

Les 2 isoformes des métallothionéines trouvé chez *M.galloprovincialis* ne sont pas distinguables chez *M.edulis*, en effet, les amorces suggérées sont les mêmes. Nous avons donc décidé d'étudier les métallothionéines sans prendre en compte les différents isoformes possibles.

Annexe 4 : Tableau récapitulatif des amores utilisées antérieurement (2022)

Name of the gene	Primer name	Primer sequence	TM	Length	%GC	Length of cDNA	Secondary hits
AKT	Akt_fw	AAGAACGTCAAAGGCCAATAC	59,18	22	45,45	1250	0
	Akt_rev	GCTGCTATCCACTCTCTCT	59,04	22	50		0
BAX	Bax_fw	GGTTGGGAAGGCCATTGAAGA	58,08	20	50	630	3
	Bax_rev	CCCAACAGTTAATGCC	59,11	20	55		1
Caspase 3	Cas3_fw	GAGACGTGGAATAGCACTGC	58,72	20	55	1002	0
	Cas3_rev	AAATCTCCACTATCCCCGGG	58,56	20	55		0
Caspase 8	Cas8_fw	GTGGAGGTCGTGACATAGCT	59,18	20	55	1152	0
	Cas8_rev	GGCTGAATCCGGTATTGCAA	58,61	20	50		0
NFkB	NFkB_fw	GCAATTCCCCAGCACATCTT	58,81	20	50	3053	0
	NFkB_rev	TGGCTGCGTTACATCTTGG	58,84	20	50		0
Bcl-2	Bcl2_fw	TGGTGGGTCTTGTCACTGA	58,79	20	50	558	0
	Bcl2_rev	CCTTGCCAACCACCGTTATC	59,19	20	55		0
Ras	Ras_fw	ATGAGAACGGGAGAAGGATTTC	57,86	22	45,45	515	0
	Ras_rev	AAGACCATTGGCACTTCATCTG	58,91	22	45,45		1
p53	p53_fw	GCTAGGTAGACGGGCAGTAG	59,05	20	60	1310	0
	p53_rev	TTTGGGGACTGTTGCATGG	58,95	20	50		0
Pi3K alpha	Pi3K_fw	GATGGGCCATTGCACTGAGCTA	58,89	20	50	2186	0
	Pi3k_rev	TGGATTGAAACCTGGAGAC	59,01	20	55		0
Alpha tubulin	Tubulin_fw	GAAACAGGAGCAGGAAACA	58,97	20	50	297	1
	Tubulin_rev	GTTCTGTACGCCACCTCATC	58,36	20	55		0
Beta actin	Actin_fw	AGTAGCACCAGAGGAACACC	59,02	20	55	575	3
	Actin_rev	TACATATGTGGCTGGCGAGT	58,88	20	50		1
PTEN	Pten_fw	TGTGAGGACCTGGATGAGTG	58,73	20	55	484	0
	Pten_rev	CCGCAGTGCTCTTTAGTGT	58,49	20	50		1
PDK1	Pdk1_fw	GCTTGATCCACTAGCCAGAG	58,44	21	52,38	227	1
	Pdk1_rev	AGCTGTTCCATTCCACCCAA	59,52	20	50		2
RAC1	Rac1_fw	TCCAGCCAGTTTGAAAACGTT	59,51	22	40,91	536	1
	Rac1_rev	GCGACAGTTCTCTCTCTCAG	58,76	22	50		1
CDC42	Cdc42_fw	AGAGAACTAAGGGCGGTCAA	58,36	20	50	579	0
	Cdc42_rev	TTCTGGAGGTTCTAAGGCCG	59,1	20	55		0
GSK3 Beta	Gsk3beta_fw	CTAGGCACCCAAACAGAGA	59,02	20	55	734	0
	Gsk3beta_rev	GCCTCTGTGGTGTCTTGG	59,05	20	55		0
p38 MAPK	p38mapk_fw	ACTCGTGTCACTGCAGAAGA	58,97	20	50	1062	0
	p38mapk_rev	GCTGCTGCGTTCTCATT	58,91	20	50		1
JNKK1	Jnkk1_fw	AGAATAGATCACGAGCCTCA	58,05	21	47,62	695	0
	Jnkk1_rev	TGATCAAAGACACTGTTCACT	57,58	22	40,91		0
mTOR	mTOR_fw	AGGACGAGAGAGTGATGCAG	58,9	20	55	1670	1
	mTOR_rev	ACATGAGGTACCCAGCCAA	58,93	20	50		0

order placed 25-03-22

18S Mytilus edulis 18S\_Me\_F CATTAGTCAGAACGAAAGTCAGAG  
18S\_Me\_R GCCTGCCAGTCATTGAAG

amplico lenght =  
114bp

from Cubero-Leon E Environ Sci Pollut Res (2012) 19:2728–2733 DOI 10.1007/s11356-012-0772-9

**Annexe 5 :** Tableau représentant la pureté et les concentrations (ng/L) des ARNm extrait par Oluwabunmi Abigail Eleyele en 2022 avec le kit d'isolation d'ARN NucleoSpin® (Macherey – Nagel) sans modification.

Tissu	Echantillon	A260/A280	A260/A230	Concentration
Manteau	C1	2,14	2,35	568,13
	C2	2,16	2,37	330,32
	C3	2,16	1,81	595,34
	Cd1	2,14	2,22	230,78
Branchies	Cd2	2,13	2,05	239,26
	Cd3	2,13	1,86	404,96
	Sm1	2,11	2,18	543,23
Glande digestive	Sm2	2,2	2,44	986
	Sm3	2,12	2,22	345,38
	C1	2,15	2,22	353,16
	C2	2,13	2,12	102,49
	C3	2,13	1,94	108,51
	Gd1	2,10	1,86	189,76
	Gd2	2,16	1,47	333,45
	Gd3	2,18	2,05	194,68
	Sm1	2,21	1,21	256,87
Sm	Sm2	2,13	2,20	372,18
	Sm3	2,14	2,17	356,92
	C1	2,02	1,76	112,01
	C2	2,18	2,33	573,48
	C3	2,15	2,08	148,51
	C4	2,17	1,70	183,99
	C5	2,17	2,16	201,81
	Cd1	2,11	1,82	144,47
	Cd2	2,04	2,03	233,27
Sm	Cd3	2,09	1,98	92,23
	Cd4	1,65	0,64	36,15
	Cd5	2,00	1,41	101,82
	Gd1	2,13	1,64	304,73
	Gd2	1,98	1,24	93,43
	Gd3	2,08	1,66	50,30
	Sm1	2,09	1,92	120,49
	Sm2	2,11	2,13	352,01
	Sm3	2,18	2,05	547,42
Sm	Sm4	2,02	1,62	144,94
	Sm5	2,14	2,22	122,6