

2022-2023

Mention Toxicologie Ecotoxicologie

Spécialité Toxicologie Humaine et Environnementale

Effet de la qualité nutritive sur les trade-offs énergétiques chez la moule d'eau douce *Dreissena bugensis*

–
Benjamin TOUZE

Sous la direction de :

Fanny Louis | Maître de conférences

Pascal Poupin | Maître de conférences

Hélène Tricoire | Maître de conférences



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



LABORATOIRE
INTERDISCIPLINAIRE
DES ENVIRONNEMENTS
CONTINENTAUX

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) TOUZE Benjamin, déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :



Effet de la qualité nutritive sur les trade-offs énergétiques chez la moule d'eau douce *Dreissena bugensis*

Benjamin Touzé

Résumé

*La moule quagga, espèce invasive originaire du bassin du Dniepr en Ukraine, a connu une expansion mondiale depuis le début du 19ème siècle. Dans cette étude, nous avons évalué l'impact indirect du lithium sur l'énergie disponible chez la moule quagga. L'énergie disponible correspond à la quantité d'ATP produite par l'individu. Différentes souches d'algues ont été cultivées puis leurs quantités de protéines et de triglycérides ont été mesurées. Certaines de ces souches ont été identifiées à partir de leur ADN. Ensuite une des souche d'algues (*Chlorella vulgaris*) a été sélectionnée pour la suite de l'étude. Cette souche a été exposée à 1 mg.L⁻¹ de lithium. Nous avons mesuré la quantité de protéines et de lipides chez cette souche (qualité nutritive). Cette même souche a servi à nourrir les moules quagga pour évaluer le ratio ADP/ATP. Les résultats de notre étude ont montré que le lithium permet d'augmenter la croissance des algues et la production d'ATP. Cependant, le lithium semble avoir un impact négatif sur la qualité nutritive. Une diminution significative a été constatée sur les résultats de la quantité de protéines et de triglycérides sur les algues exposées au lithium. Cette étude a permis de montrer un potentiel effet bénéfique du lithium à court terme lors d'une exposition indirecte sur la balance énergétique chez la moule quagga.*

Mots-clés : *Dreissena Bugensis, lithium, métabolisme énergétique, protéines, triglycérides*

Abstract

*The quagga mussel, an invasive species native to the Dnieper basin in Ukraine, has been expanding worldwide since the early 19th century. In this study, we assessed the impact of lithium on the energy balance in quagga mussels. Available energy corresponds to the amount of ATP produced by the individual. Different strains of algae were cultivated and their protein and triglyceride levels measured. Some of these strains were identified from their DNA. One of the algal strains (*Chlorella vulgaris*) was then selected for further study. This strain was exposed to 1 mg.L⁻¹ of lithium. The concentration of proteins and lipids in this strain were measured corresponding to the nutritional quality. The same strain was fed to quagga mussels to assess the ADP/ATP ratio. The results of our study showed that lithium increased algal growth and ATP production. However, lithium appears to have a negative impact on nutrient quality. A significant decrease in protein and triglyceride levels was observed in algae exposed to lithium. This study showed that lithium has a beneficial effect on the energy balance in quagga mussels at short term.*

Keywords : *Dreissena Bugensis, lithium, energy metabolism, proteins, triglycerides*



Abréviations

- SOD : superoxyde dismutases
- GPx : glutathion peroxydase
- ATP : Adénosine triphosphate
- ADP : Adénosine diphosphate
- NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide
- FADH₂ : flavine adénine dinucléotide
- LC50 : Concentration léthal 50
- Li : Lithium
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- SDS : Laurylsulfate de sodium
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
- PBS : Phosphate-buffered saline
- GSK-3 : Glycogen synthase kinase 3
- IP₃ : Inositol triphosphate
- AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
- IPPase : l'inositol poliphosphatase
- IMPase : l'inositol monophosphatase



Introduction

Dreissena bugensis Andrusov, 1897 ou moule quagga (figure 1), est une espèce invasive originaire du bassin du Dniepr, en Ukraine. Dans ce bassin, les populations de *D. polymorpha* ont été progressivement remplacées par son espèce sœur *D. bugensis* (Mills et al, 1996). A partir du début du 19^{ème} siècle, la distribution mondiale de la moule quagga a fortement augmenté. Cette expansion est notamment liée à la construction de nouveaux canaux pour la navigation commerciale (à travers les eaux des ballasts) (Quinn et al, 2014 ; Molloy et al, 2007 ; Karatayev et al, 2015). La moule quagga est capable de filtrer de plus grands volumes d'eau (Diggins, 2001). Au niveau des lacs profonds, *D. bugensis* est beaucoup plus présente. Les moules zébrées ont besoin d'un substrat dur pour se fixer alors que *D. bugensis* peut se fixer sur des substrats limoneux. (Karatayev, 2015).



Figure 1 Photo d'une *Dreissena bugensis* ou moule quagga

Dreissena bugensis appartient à la famille des dreissenidae faisant partie de la sous-classe des hétérodontes. C'est un organisme filtreur qui possède des organes dédiés à la filtration : le siphon inhalant qui permet l'entrée de l'eau dans l'organisme et le siphon exhalant permettant d'éjecter l'eau. Le flux d'eau traverse les branchies pour atteindre l'appareil digestif où sont digérées les particules de petites tailles. Les particules de grosses tailles sont excrétées par le siphon exhalant sous forme de pseudo-

fèces. Les déchets métaboliques sont eux aussi excrétés par le siphon exhalant. La moule quagga possède un organe lui permettant de se fixer à des surfaces, le byssus (filaments collants durcissant au contact de l'eau ; Claudi et Mackie, 1994).

La moule quagga est utilisée comme modèle d'étude dans l'évaluation écotoxicologique (Péden et al, 2019 ; Vijayavel et al, 2019 ; Yenn et al, 2011). Cette espèce sentinelle possède plusieurs critères permettant de justifier son utilisation. L'espèce est abondante, comme dit précédemment, elle a colonisé une grande partie des cours d'eau de l'hémisphère nord permettant ainsi de faciliter son prélèvement. La moule quagga est très sensible aux contaminants liés, en partie, à sa grande capacité de filtration (Diggins, 2001). Des études *in situ* sont aussi possibles avec cette espèce en l'utilisant la méthode de l'encagement (MacIsaac et Hugh, 1994 ; Waajen et al, 2016).

Les biomarqueurs sont tous les paramètres physiologiques, cellulaires ou biochimiques pouvant être mesurés chez un organisme et permettant de mettre en évidence l'exposition ou l'effet à un ou plusieurs contaminants (Depledge, 1994). Les biomarqueurs peuvent concerner les défenses contre les espèces réactives de l'oxygène (supéroxyde dismutases (SOD), catalase ou la glutathion peroxydase (GPx) ; Ziech et al, 2010) ou peuvent aussi concerner le métabolisme énergétique (ATPase, pyruvate, lactate ; Boenzi et al, 2018 ; Roche et al, 2003).

Les réserves énergétiques (figure 2) comprennent les lipides, les protéines et le glycogène. Lorsque l'organisme subit un stress, la demande énergétique va augmenter se traduisant par une consommation plus élevée des réserves énergétiques. Le métabolisme énergétique rassemble toutes les réactions liées à la production d'adénosine triphosphate (ATP) (Foretz et al, 2006). La production d'ATP peut se réaliser en milieu aérobie (36-38 molécules d'ATP produites pour une molécule de glucose) ou en milieu anaérobie (2 molécules d'ATP

produites). La majorité de la production des molécules d'ATP se situe au niveau de la mitochondrie lors de la phosphorylation oxydative (condition aérobie).

La production d'énergie se fait via l'alimentation. Les dreissènes sont des organismes filtreurs qui se nourrissent de petites particules, telles que des bactéries, du phytoplancton, des algues et d'autres matières organiques présentes dans la colonne d'eau (Horgan et Mills, 1997). Dans notre étude, l'évaluation de la qualité nutritive a été réalisée via une alimentation à base d'algues. Une partie de l'énergie assimilée est stockée pour produire ensuite de l'ATP grâce à la métabolisation du glucose (glycolyse) et/ou de la bêta-oxydation des acides gras. Dans certaines conditions, la production d'ATP se fait à partir des protéines.

La glycolyse convertit le glucose en deux molécules de pyruvate. Cette réaction se déroule dans le cytoplasme de la cellule. Le pyruvate est ensuite utilisé dans différentes

voies métaboliques : en condition aérobie, le pyruvate est converti en acétyl CoA et rejoint le cycle de Krebs (suivi de la phosphorylation oxydative) tandis qu'en condition anaérobie, le pyruvate subit une fermentation pour générer du NAD⁺ et du lactate. La glycolyse est la voie métabolique majoritaire pour fournir de l'ATP (Larger et Ferré, 2016).

La bêta oxydation des acides gras saturés permet de produire les cofacteurs NADH (Nicotinamide adénine dinucléotide), flavine adénine dinucléotide (FADH₂) et de l'acétyl-CoA qui seront utilisés dans la respiration mitochondriale (phosphorylation oxydative) et donc produira de l'ATP (Nguyen et al, 2008).

Les acides aminés peuvent être utilisés pour générer de l'énergie dans des conditions particulières (périodes de jeûne ou de dépenses énergétiques intenses). Les acides aminés sont catabolisés pour donner plusieurs produits, dont l'alpha-céto glutarate appartenant au cycle de Krebs (Larger et Ferré, 2016).

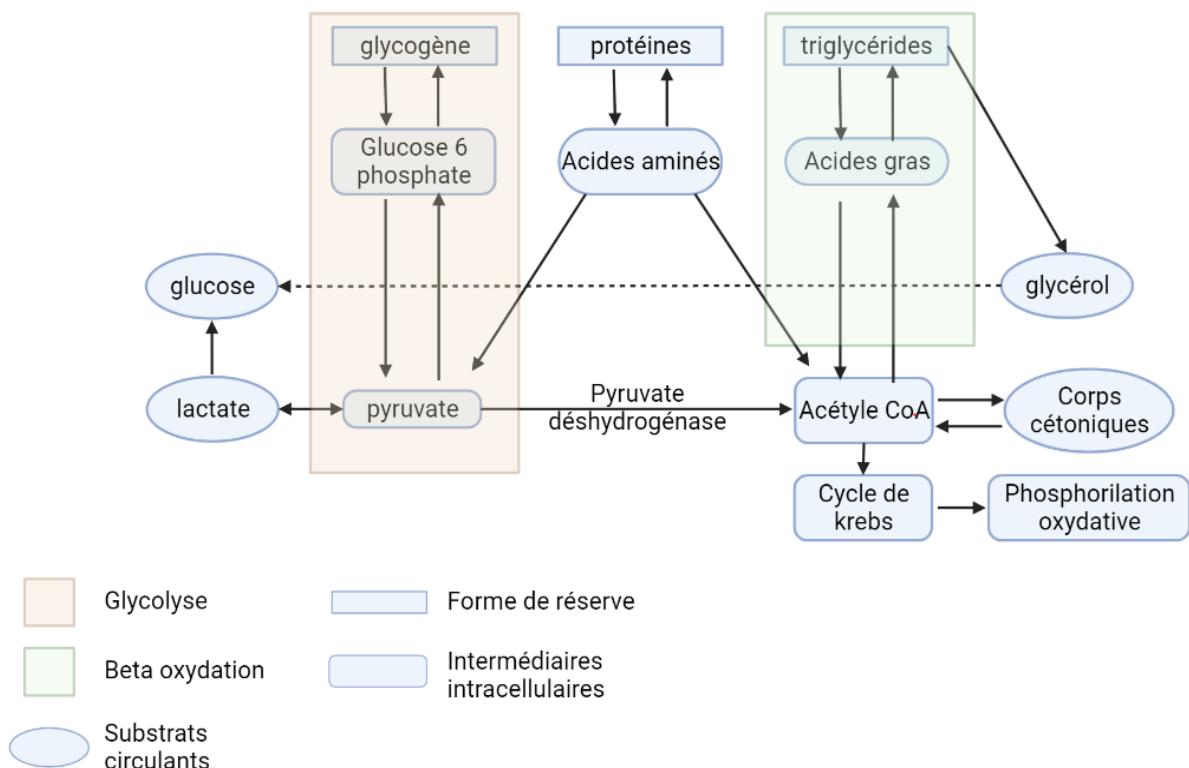


Figure 2 Interconversion des substrats énergétiques

La balance énergétique est un indicateur de l'activité métabolique. Le ratio ADP/ATP reflète l'état énergétique de la cellule. Une augmentation de ce ratio représente une dépense d'énergie liée à un stress environnemental (Sokolova et al, 2012).

Dans cette étude, les effets du lithium ont été étudiés sur la qualité nutritive des algues et les répercussions sur les moules (activité métabolique). Le lithium est présent dans l'environnement majoritairement sous forme ionique dans l'eau. Il va réagir avec l'eau pour donner de l'hydroxyde de lithium (LiOH). Le lithium est présent à des concentrations faibles (Sposito, 1986). L'eau de surface à une concentration en lithium de 1 à 10 µg/L selon les régions. A l'échelle mondiale, la teneur en lithium au niveau des eaux souterraines varie de 0,05 à 1 mg/L de lithium. Dans certaines sources d'eau, la concentration peut atteindre 100 mg/L (Schrauzer, 2002). La concentration létale (LC50) pour 50% des organismes mesurée chez *Dreissena polymorpha* est de 185-232 mg/L.

Le lithium est un élément chimique relativement abondant dans la croûte terrestre (silicates, micas et phosphates) qui, par lixiviation, se retrouve dans les milieux aquatiques. En plus des sources naturelles, le lithium provient également de source anthropique. Une origine anthropique importante de ce métal provient des batteries au lithium usagé qui sont jetées dans les déchets ménagers. De nos jours, l'utilisation du lithium a fortement augmenté ce qui est lié à la production en masse de batteries. Cette augmentation doit être prise en compte pour prévenir les futurs effets néfastes sur l'environnement (Peiro et al, 2013).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact du Li sur la qualité nutritive des ressources alimentaires et ses répercussions sur l'énergie disponible chez la *Dreissena bugensis*.

Matériels & Méthodes

1) Détermination des souches d'algues

Extraction de l'ADN :

Avant l'extraction, les inoculums d'algues ont été centrifugés à 10 000 g pendant 30 mns. Le culot est récupéré pour la suite de l'identification.

L'ADN des différentes souches d'algues sont extraits à l'aide du DNeasy UltraClean Microbial kit (Qiagen, Hilden, Allemagne). Les algues sont lysées par la combinaison de force mécanique, de chaleur et de détergent. L'ADN libéré est récupéré dans une colonne de filtration pour subir différents lavages. Il est ensuite récupéré dans une solution de Tris-HCL à 10mM.

Plus précisément, les algues sont suspendues dans une solution contenant des sels et un tampon permettant de les disperser et de les stabiliser avant la lyse. Les algues sont ensuite transférées dans un tube contenant des billes (lyse mécanique) et une solution de lyse (contenant du SDS). Après l'étape de lyse, un réactif permettant de faire précipiter les matières inorganiques, les débris cellulaires et les protéines est ajouté afin d'augmenter la pureté de l'ADN. Une solution de sel très concentré est apportée permettant à l'ADN de se lier à la membrane de la colonne de filtration. L'ajout d'une solution de lavage à base d'éthanol permet d'éliminer les résidus de sel et d'autres contaminants en laissant l'ADN lié à la membrane de silice. La dernière étape consiste à ajouter un tampon d'élution (Tris-HCL 10 mM) permettant de récupérer l'ADN de la membrane en silice.

La quantité d'ADN est déterminée par spectrophotomètres Nanodrop™ à 260 nm. La pureté des échantillons d'ADN est déterminée par les rapports A260/A280 (ADN/protéine) et A260/A230 (ADN/acide humique). Les ADN ont ensuite été stockés à -20°C.



Amplification par PCR :

L'ADN est amplifié par PCR avec des amores universelles : ITS1 (5'TCCGTAGGTGAAACCTGC GG, Eurofins Genomics, Ebersberg) et ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC, Eurofins Genomics, Ebersberg). La PCR a été réalisée dans un volume final de 50 µL, contenant 5 µL d'amorce (ITS1 + ITS2), 1 µL d'ADN, 25 µL de master MIX et 19 µL d'eau. La première étape de dénaturation est réalisée à 95 °C pendant 3 min, suivis de 35 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 5 secondes, l'hybridation à 55°C durant 15 secondes et l'elongation à 72 °C pendant 45 secondes. L'elongation finale est effectuée à 72°C pendant 5 min.

Les résultats de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le tampon TAE (Tris-acétate-EDTA) et du GelRed sont utilisés pour l'électrophorèse avec un voltage de 80 V pendant 60 min. Les résultats sont visualisés par imagerie.

Purification de l'ADN :

La purification des échantillons a été réalisée avec le kit GenElute™ Gel Extraction (NA1111, Sigma Aldrich). L'ADN se fixe spécifiquement sur une membrane en silice pour subir différents lavages. Les contaminants tels que les protéines sont éliminés à travers la colonne. L'ADN est ensuite récupéré grâce à une solution d'élution appropriée.

2) Etude cinétique de croissance (exposition au lithium)

La souche A1 est exposée à 5 concentrations différentes en lithium (0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 et 1 mg/L) dans un milieu de 100 mg/L de KNO₃. En parallèle, cette même souche est exposée à trois concentrations différentes en KNO₃ (20, 50 et 100 mg/L).

La cinétique de croissance des microalgues est mesurée par comptage sur une cellule de Malassez. Le comptage est effectué à l'objectif X40 sur 4 « unité de comptage » de 0,01 µL. La concentration cellulaire est exprimée en nombre de cellules par mL en utilisant le calcul suivant :

$$N = \frac{n}{a \cdot v} \times Fd$$

Nombre de cellules comptées

Nombre de cellules par unité de volume (Cellules / mL)

Nombre d'unités de comptage dénombrées

Facteur de dilution

Volume d'une unité de comptage

3) Dosage des protéines - Méthode de Bradford

La quantité de protéine est mesurée par la méthode de Bradford (1976). Le bleu de Coomassie change de couleur lorsqu'il se lie avec les acides aminés basiques (lysine, histidine, arginine) et les acides aminés hydrophobes qui sont présents dans les protéines. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon et se lie à 595 nm.

Le réactif de dosage (Bradford Working Solution)

est préparé en amont et conservé à l'obscurité à température ambiante. Ce réactif est composé de 212.5 mL d'eau, 12.5 mL d'éthanol (95%), 25 mL d'acide phosphorique (88%) et de 17.5 mg de bleu de Coomassie G-250.

La gamme étalon est réalisée à partir de BSA à 1 mg/mL. Différentes concentrations sont réalisées (0 ; 2.5 ; 5 ; 7.5 ; 10 ; 12.5 ; 15 ; 20 µg) avec un volume final de 20 µL complété avec de l'eau distillée, suivi d'un ajout de 10 µL de PBS.

En parallèle, les algues sont broyées au bead beater dans 1 mL de PBS, seul le surnageant est



récupéré. Trois volumes différents (2, 5 et 10 μ L) sont dilués dans un volume final de 10 μ L de PBS. Ensuite, 20 μ L d'eau déminéralisée sont ajoutés.

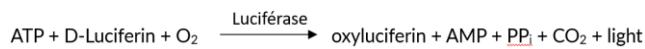
Dans chaque échantillon et dans la gamme étalon, 1 mL du réactif de dosage (Bradford Working Solution) est ajouté. Les échantillons sont ensuite incubés à température ambiante 5 min à l'obscurité. L'absorbance est lue à 595 nm.

4) Dosage des triglycérides

La quantité de triglycérides est mesurée avec un kit (MAK266, Sigma Aldrich). Le principe du kit repose sur une réaction enzymatique (lipase) convertissant les triglycérides en glycérol et en acide gras. Le glycérol est ensuite oxydé pour générer une coloration proportionnelle à sa quantité présente dans l'échantillon. En colorimétrie la longueur d'onde d'absorbance est de 570 nm (Pour la fluorimétrique : $\lambda_{ex} = 535 \text{ nm}/\lambda_{em} = 587 \text{ nm}$).

5) Dosage ADP/ATP

Le ratio ADP/ATP a été mesuré avec le kit ADP/ATP Ratio Assay (MAL135, Sigma Aldrich). Les cellules sont lysées pour libérer l'ATP et l'ADP. En présence de luciférase, l'ATP va réagir avec le substrat D-luciférine et libérer de la lumière :



L'intensité lumineuse est proportionnelle à la quantité d'ATP intracellulaire. Dans un second temps, l'ADP est converti en ATP grâce à l'ATP synthase. L'ATP formé réagit ensuite avec la D-Luciferin comme dans l'étape précédente. L'évaluation de ce ratio se fera à partir des glandes digestives des dreissènes.

6) Culture algue

Les microalgues proviennent d'eau stagnante de la région grand EST (Souche A2, A3, A4 et A5) et de banque d'algue (A1 : *Chlorella vulgaris*). Elles ont été isolées par dilution puis cultivées.

Les microalgues sont cultivées dans des erlenmeyers de différents volumes (250 à 1000

mL) contenant entre 20 et 50 % de leur volume total en milieu de culture. L'inoculum représente entre 2 et 10 % du volume final du milieu de culture. Les différentes fioles sont exposées à un cycle jour/nuit de 16/8h sous agitation.

La composition du milieu est détaillée dans l'Annexe. Les différentes souches de microalgues sont exposées à des concentrations en KNO_3 différentes (20, 50 ou 100 mg/L).

7) Déroulement de l'étude

La qualité nutritive sera évaluée avec des études préliminaires sur différentes souches d'algues et levures en mesurant la quantité de protéines et de lipides.

Après cette étape de quantification, une souche d'algue est sélectionnée pour l'alimentation des dreissènes. Cette même souche d'algue sera exposée au lithium pour mettre en avant un potentiel impact sur la qualité (quantité de lipides et protéines) des algues et s'il y a une répercussion sur l'activité métabolique des dreissènes (ratio ADP/ATP).

Au niveau de l'étude (figure 3) sur les moules, une acclimatation des individus de 7 jours a été réalisée avant l'expérience pour les détoxifier. Les dreissènes ont été exposés à 3 conditions différentes (Condition 1 : non nourrit ; Condition 2 : nourrit avec la souche A1 et la condition 3 : nourrit avec A1 exposée au lithium) durant 7 jours. Dans chaque bêcher, 3 moules sont disposées avec 5 réplicats (soit 15 individus par condition). Dans chaque bêcher, le milieu d'élevage est composé d'eau minérale. Chaque jour, le milieu est renouvelé. Pour les conditions 2 et 3, les moules sont nourries de 50 mL d'inoculum d'algue de la souche A1 à 100 mg/L de KNO_3 à une concentration d'environ 10^6 cellules / mL. Durant l'expérience, les algues sont stockées en chambre froide à 4°C. Après les 7 jours, les glandes digestives sont récupérées puis broyées pour la quantification du ratio ADP/ATP. Les broyas sont conservés à -80°C.



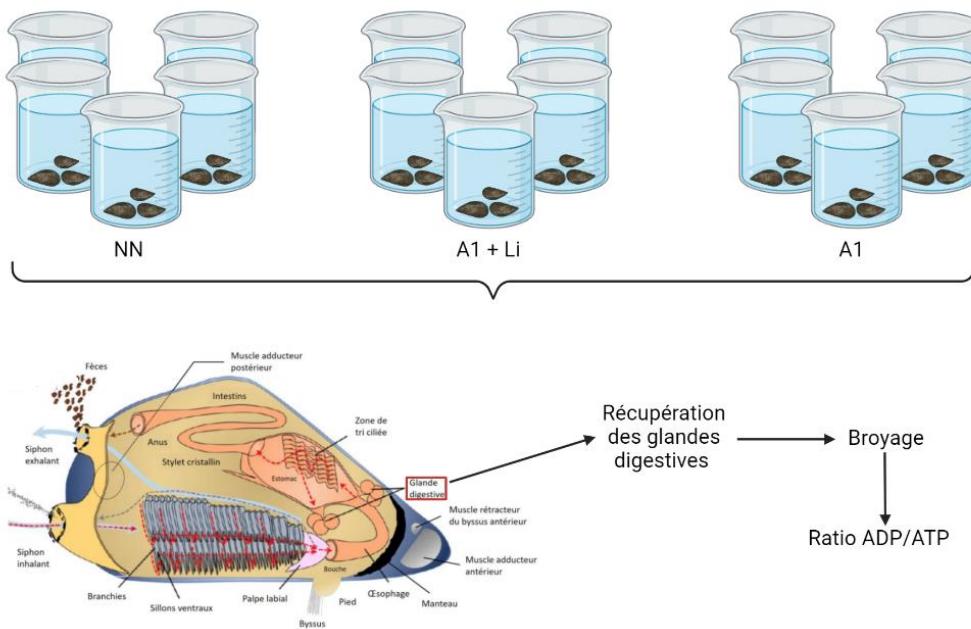


Figure 3 Schéma résumant le protocole de l'évaluation de la qualité nutritive des *Dreissena bugensis* (d'après Louis, 2020)

8) Tests statistiques

Les résultats ont été analysés avec R studio. La distribution des variables a été analysée avec le test de Shapiro. L'homogénéité des variances a été vérifiée avec le test de Bartlett. Les résultats obtenus ont été comparés avec le test de Kruskal-Wallis. Le test de Dunn's a été utilisé comme test

post-hoc après le test de Kruskal-Wallis. Les différences statistiquement significatives ont aussi été évaluées par le test de Wilcoxon Mann Whitney. Les valeurs ayant une probabilité inférieure à 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives.

Résultats

1. Déterminaison des souches d'algues

Tableau 1 Quantité d'ADN et ratio de pureté des différentes souches d'algues avant la PCR

Avant PCR (extraction ADN)	ng/µL	A260/A280	A260/A230
A2	40,9	1,86	1,93
A3	14,9	1,91	1,78
A4	13,4	1,94	1,18
A5	16,9	2	1,26

Avant la PCR (tableau 1), la concentration d'ADN était de 40,9 ng/µL pour A2 et une moyenne de 15,07 ng/µL pour les souches A3, A4 et A5. Le ratio A260/A280 est compris entre 1,86 (souche

A2) et 2 (souche A5). Pour le ratio A260/A230, les valeurs se situent entre 1,18 (souche A4) et 1,93 (souche A2).

Tableau 2 Quantité d'ADN et ratio de pureté des différentes souches d'algues après la PCR

Après PCR	ng/µL	A260/A280	A260/A230
A2	69,3	8,75	-10,15
A3	66,8	8,85	-10,6
A4	67,8	12,51	-10,94
A5	85,2	10,84	-11,17

Après la PCR (Tableau 2), la moyenne de la concentration en ADN était de 67,97 ng/µL pour les souches A2, A3 et A4. Au niveau de la souche A5, la concentration en ADN était de 85,2 ng/µL. Le ratio A260/A280 se situe entre 8,75 (souche A2) et 12,51 (souche A4). Au niveau du ratio A260/A230 les résultats se situent entre -11,17 et -10,15.

Les résultats de l'électrophorèse montrent une intensité plus faible de luminescence pour A4. Une purification a été réalisée pour les 4 échantillons. Les résultats du séquençage pour les différentes souches sont présents dans le tableau ci-dessous (Tableau 3):

Tableau 3 Résultats du séquençage de l'ADN des différentes souches

Nom de la souche	
A2	<i>Chlorella vulgaris</i>
A3	<i>Jaagichlorella roystonensis</i> strain
A4	<i>Unclutured</i> <i>klebsormidiophyceae</i>
A5	<i>Stichococcus bacillaris</i>

2. Cinétique de croissance

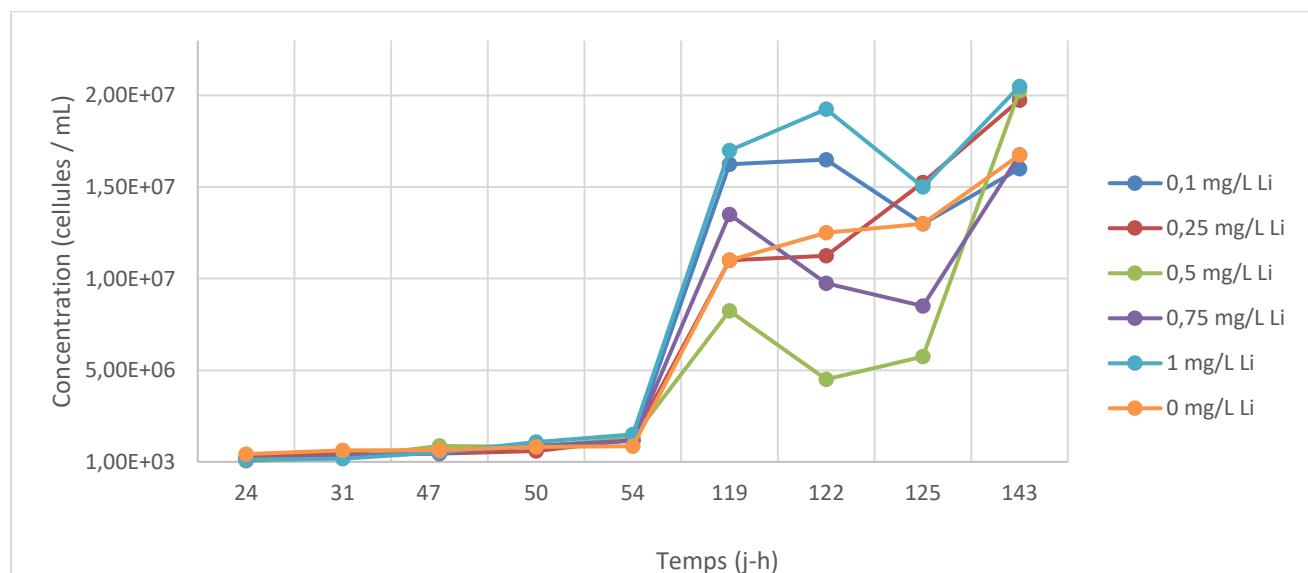


Figure 4 Cinétique de croissance de la souche A1 (*Chlorella vulgaris*) selon différentes concentrations d'exposition au lithium (0 à 1 mg/L de lithium).

La cinétique de croissance (figure 6) montre que certaines concentrations de lithium semblent

favoriser la croissance des algues. A partir de 54 heures, une croissance exponentielle est



observable avec un facteur de 100 sur le nombre d'algue / mL. Au bout de 143 heures, le nombre de cellule est le plus élevé pour la souche exposée à 1mg/L de lithium et le plus faible pour

la souche exposée à 0,1 mg/L de lithium. Les concentrations de 0,25 ; 0.5 ; 0.75 et 1 mg/L de lithium montre une croissance supérieur par rapport au témoin (Milieu à 0 mg/L de Lithium).

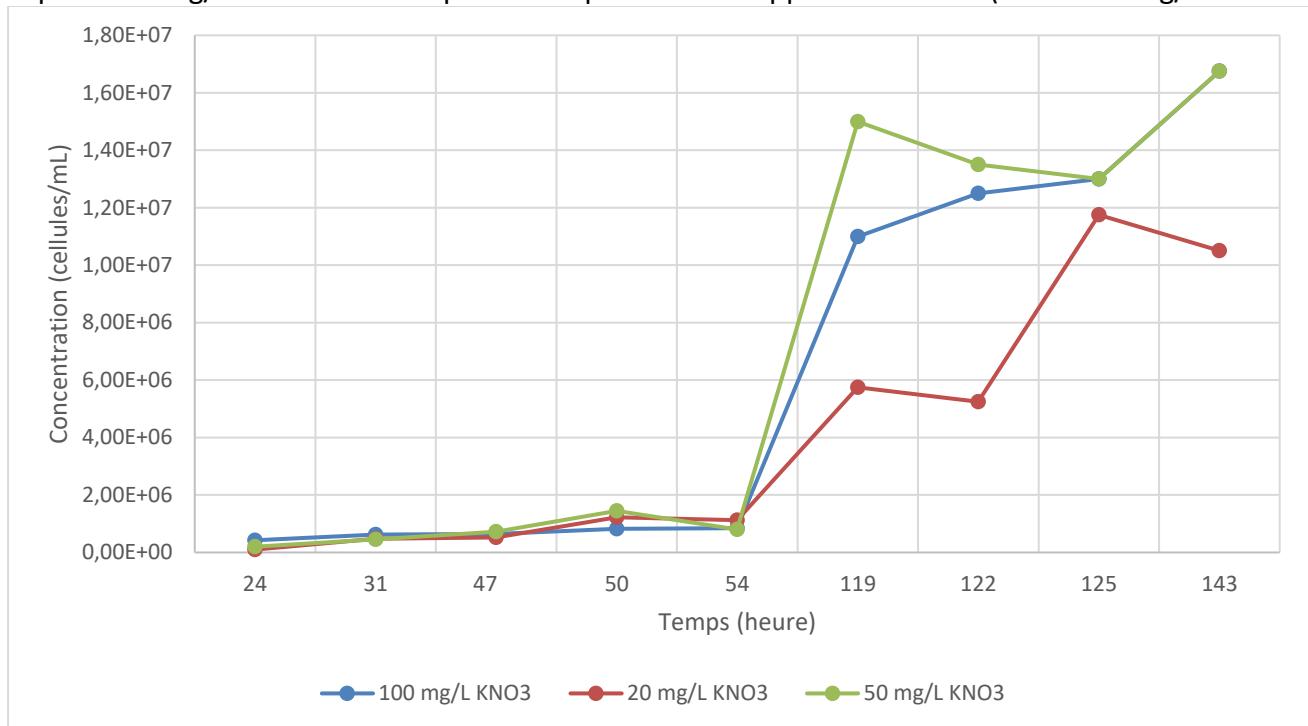


Figure 5 Cinétique de croissance de la souche A1 (*Chlorella vulgaris*) selon 3 concentrations de KNO₃ (20, 50 et 100 mg/L de KNO₃)

Au niveau des résultats de la cinétique de croissance des algues (Figure 7) en faisant varier l'apport en azote, nous pouvons voir que la concentration à 20 mg/L de KNO₃ à la plus faible concentration d'algue ($1,05 \times 10^7$ cellules/mL).

3. Dosage protéines et triglycérides des différentes souches

Pour les résultats des triglycérides (figure 8), les groupes A1 et A5 suivent une loi normale ($p=0.649$ et $p=0.953$, respectivement). Le groupe A2 ne suit pas de loi normale ($p=0.02$). Le nombre d'échantillon est trop faible ($n=2$) pour analyser la distribution des variables. L'analyse statistique ne montre pas de différence significative entre les différents concentration de protéines ($p < 0,05$).

Concernant les résultats des protéines, les 5 groupes suivent une loi normale ($p= 0.296$; 0.261 ; 0.504 ; 0.176 et 0.61 pour A1, A2, A5, L1

Les concentrations de 100 et 50 mg/L de KNO₃ ont une concentration d'algue similaire ($1,68 \times 10^7$ cellules/mL). Cependant entre 47 et 125 heures, la concentration en algue est plus élevée pour les algues exposées à 50 mg/L de KNO₃.

et L2, respectivement). L'homogénéité des variances n'est pas validée ($p=0.03 < 0.05$). Le groupe L1 a une concentration en triglycérides significativement supérieure par rapport au groupe A2 et A5 ($p= 0.0025$ et $p=0.0008$, respectivement). Le groupe L2 est significativement supérieur par rapport à A2 et A5 ($p=0.0099$ et $p=0.0036$, respectivement). La souche sélectionnée pour évaluer la qualité nutritive des dreissènes est la souche A1 (*Chlorella vulgaris*) liée à sa rapidité de croissance. Cette souche est également déjà utilisée dans l'alimentation des dreissènes (Kryger et al, 1988 ; Xuewen Ma et al, 1999).

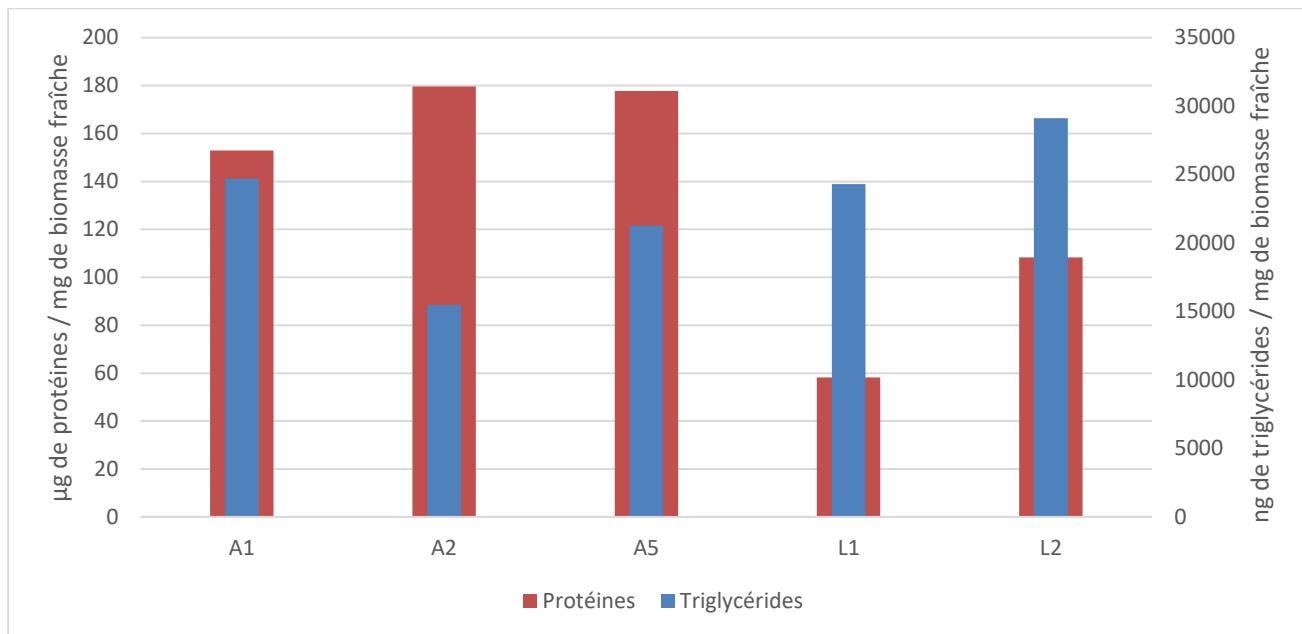


Figure 6 Concentration en protéines et en lipides de 3 souches d'algues (A1? A2 et A5) et de 2 souches de levures (L1 et L2).

4. Dosage protéines et triglycérides des souches A1 et A1+Li

Au bout de 6 jours d'incubation, la concentration en algue a atteint 1.95×10^7 et 1.6×10^7 cellules / mL pour A1 et A1+Li, respectivement. Les résultats des groupes A1 et A1+Li (Figure 9) suivent une loi normale ($p = 0,274$ et $p = 0,831$, respectivement). La concentration de protéines

est plus élevée ($p = 0,01$) pour la souche A1 avec une concentration de $317,68 \mu\text{g}$ de protéine / mg de biomasse fraîche ($A1+Li = 210,04 \mu\text{g}/\text{mg}$). Les résultats obtenus des deux groupes sont statistiquement différents ($p = 0,01 < 0,05$). Nous avons obtenu pour les triglycérides $2613,878 \text{ ng} / \text{mg}$ de matière fraîche et $2144,452 \text{ ng} / \text{mg}$ de matière fraîche pour A1 et A1+Li, respectivement.

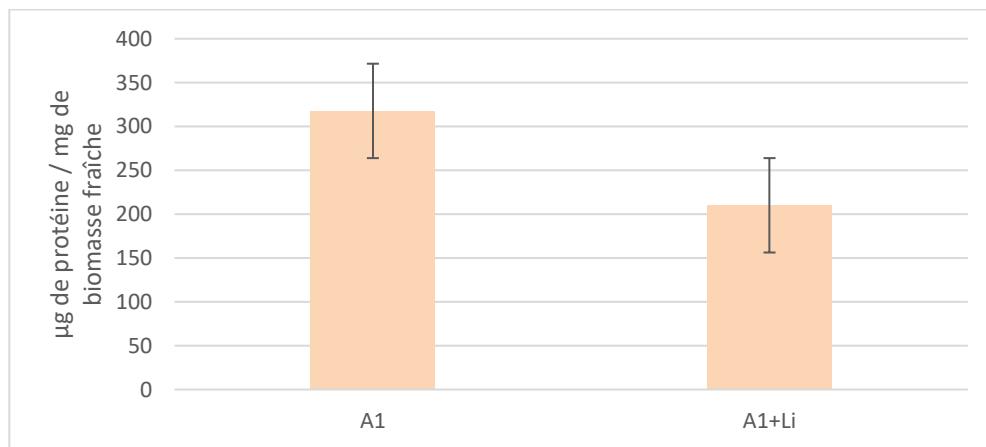


Figure 9 Concentration en protéine pour les souches exposées sans (A1) et avec lithium (A1+Li). Les données sont représentées sous forme de moyenne ($n=3$)

Kruskal-Wallis : chi-squared = 16,0079 ; p = 0,0003341 ; n = 37

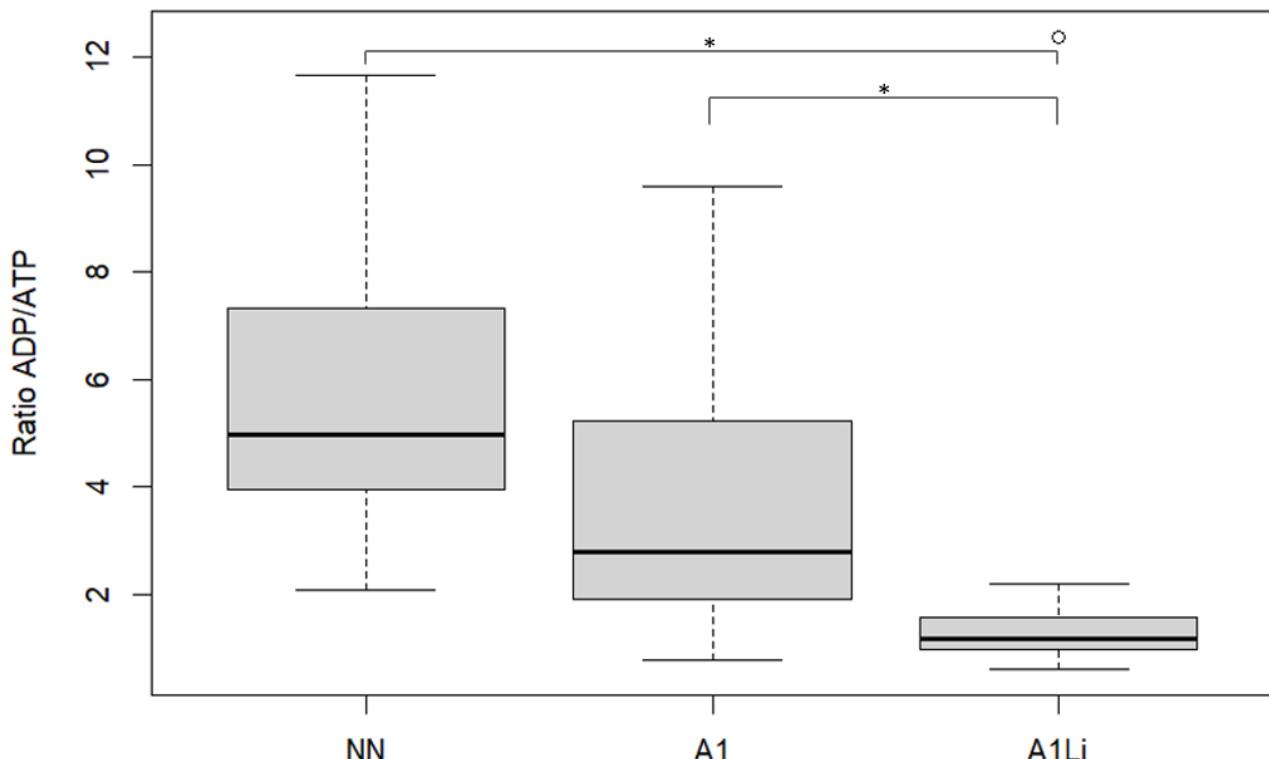


Figure 10 Ratio ADP/ATP des glandes digestives des moules en fonction des conditions NN (non nourrit), A1 (nourrit avec la souche A1) et A1+Li (Nourrit avec la souche A1 exposée au lithium)

5. Dosage ADP/ATP

Au niveau des résultats des ratio ADP/ATP (Figure 10), les groupes NN ($p = 0,406 > 0,05$) et A1 ($p = 0,098 > 0,05$) suivent une loi normale. Cependant, le groupe A1+Li ne suit pas de loi normale ($p = 1.57e-06 < 0,05$). L'homogénéité

des variances est validée pour les 3 groupes ($p = 0,919 > 0,05$). Nous trouvons des différences significatives entre les groupes NN et A1+Li ($p < \alpha/2$) et les groupes A1 et A1+Li ($p < \alpha/2$). Nous avons donc par ordre croissant pour le ratio ADP/ATP : A1+Li < A1 < NN. Les détails des résultats sont en annexe.

Discussion/Conclusion

Dans le cadre de l'évaluation de la qualité nutritive sur les trade-offs énergétiques chez la dreissena bugensis, nous avons évalué l'impact du lithium sur les algues et les deissènes. Nous avons observé des effets bénéfiques au niveau des algues (augmentation de la croissance) et des moules. Plusieurs hypothèses peuvent être émises à la suite de nos résultats.

La glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) est impliqué dans de nombreux processus

cellulaires. Parmi ces processus, la GSK-3 intervient dans le métabolisme du glycogène. La GSK-3 régule l'activité de la glycogène synthase (figure 11) (enzyme synthétisant le glycogène à partir du glucose ; Kaidanovich-Beilin et al, 2011). Le lithium a des effets inhibiteurs sur la GSK3 β en ayant des propriétés d'inhibiteur compétitif sur le magnésium (Ryeves et al, 2001). L'affinité du lithium est relativement élevée pour le magnésium ($K_d = 1,6 \text{ mM}$; Briggs

et al, 2016). Le lithium inhibe la GSK-3 de deux

- De façon indirecte : la phospho-sérine-GSK-3 inactive peut être réactivée grâce à des phosphatases. Cependant, en présence du lithium, l'activité de ces phosphatases est réduite laissant la GSK-3 sous forme inactive. Le lithium va donc augmenter la phosphorylation inhibitrice de GSK-3.

manières :

- De façon directe : La GSK-3 catalyse la phosphorylation de substrats protéiques en présence du complexe Mg^{2+} -ATP. Le lithium entraîne une inhibition de l'activité de la GSK-3 de façon directe (Richard 2003).

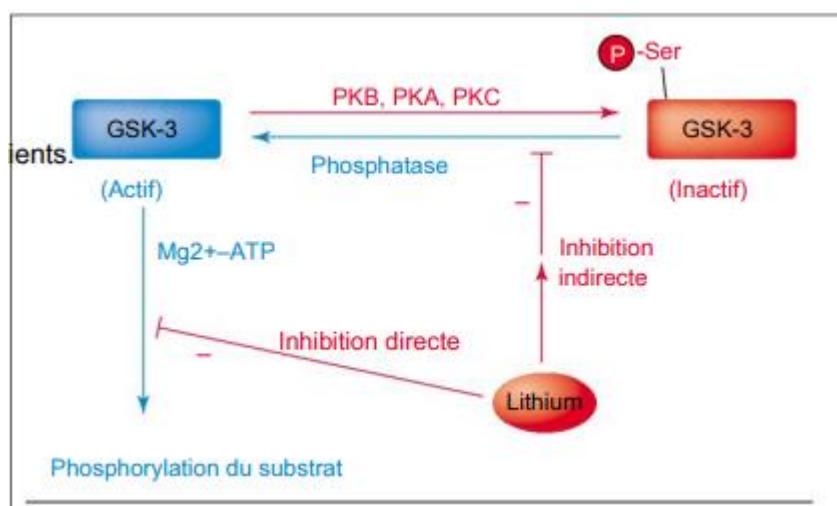


Figure 11 Interaction du lithium de façon directe et indirecte sur la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3) (Richard 2003).

La GSK3 inhibe la glycogène synthase qui entraîne des répercussions sur la production d'ATP. Le lithium peut donc lever cette inhibition de la glycogène synthase et donc favoriser la production d'ATP. Les résultats obtenus dans notre étude pourraient être expliqués en partie par l'inhibition de GSK-3 par le lithium. (Cohen et Goedert, 2004).

L'inhibition de la GSK3 entraîne d'autres effets. Shen et al. 2020, ont montré que le lithium entraînait une inhibition de la prolifération cellulaire des cardiomyocytes ainsi qu'une augmentation de l'apoptose de ces cellules. Ces résultats sont aussi expliqués par l'inhibition de la GSK3- β . Ces résultats montrent aussi que l'inhibition directe et indirecte du lithium sur la GSK3- β dépend de la concentration en lithium (l'inhibition indirecte intervient à des concentrations plus faibles en lithium ; Shen et al, 2020).

Le lithium se fixe sur le complexe Mg^{2+} -ATP, du à son affinité pour l'ion Mg^{2+} (Dudev et al, 2017). Dans notre étude, les ratios ADP/ATP obtenus

sont beaucoup trop élevés par rapport au ratio de base. Normalement ce ratio est aux alentours de 0,20 (Berg et al, 2009). Ces résultats pourraient être associés à une mauvaise conservation des échantillons. D'autant plus que l'ATP se dégrade très rapidement. Cependant au niveau des résultats du lithium, les ratios ADP/ATP étaient significativement plus faibles par rapport aux deux autres conditions (NN : non nourrie et A1 : nourrie avec la souche A1). Ces résultats pourraient être expliqués par la formation de complexes ATP- Mg^{2+} -Li. La fixation du lithium pourrait donc stabiliser l'ATP et diminuer sa dégradation (Dudev et al, 2019).

Au niveau des résultats de la cinétique de croissance, nous pouvons voir que la souche A1 se développe plus rapidement en présence de Li. Les résultats obtenus ne peuvent pas conclure sur un effet concentration-dépendant. Cette augmentation de la croissance en présence de lithium pourrait être expliquée par l'inhibition de l'inositol poliphosphatase (IPPIase) et de l'inositol poliphosphatase (IMPase). Ces deux enzymes

interviennent dans le métabolisme de l'inositol (Holub, 1986). Le lithium inhibe l'activité de ces deux enzymes entraînant une accumulation d'IMP et d'inositol intracellulaire. Cette accumulation peut perturber la signalisation cellulaire de l'organisme (Serretti et al, 2009). Les signalisations cellulaires impactées par le lithium peuvent être celles impliquées dans la division cellulaire. En présence de lithium, le niveau d'inositol triphosphate (IP3) diminue dû à l'inhibition de IPPase et IMPase. L'IP3 est un messager secondaire de la signalisation lipidique (Berridge et al, 2009). L'inhibition de cette enzyme peut expliquer les résultats obtenus au cours de cette étude.

La diminution des protéines chez les algues exposées au lithium pourrait être expliquée par les différentes enzymes ciblées par le lithium. Ses différentes voies cellulaires peuvent entraîner une diminution de la production de protéines. La méthode utilisée pour doser les protéines donne une valeur totale en protéines et ne permet pas d'évaluer le taux de protéines spécifiques (Marshall et al, 1986). Cette diminution de protéine entraîne donc une diminution de la qualité nutritive chez les algues exposées au lithium. Au niveau du cerveau, le lithium régule la pompe Na^+/K^+ -ATPase. En effet le lithium entre aussi en compétition avec d'autres ions : le sodium, le potassium ainsi que le calcium. Cette affinité pour ces ions va engendrer une régulation de l'AMPc et du Ca^{2+} et donc réguler les cascades de signalisation intracellulaires dépendantes de ces deux facteurs (Médic et al, 2020). L'AMPc peut influencer indirectement la production d'ATP en régulant l'activité enzymatique de certaines voies métaboliques (Mehrani et al, 1993).

En conclusion ces résultats permettent de montrer certains effets du lithium sur le métabolisme énergétique des organismes aquatiques tels que la moule d'eau douce *Dreissena bugensis*. Bien que le lithium puisse avoir des effets négatifs sur le taux de protéines et de lipides, il semble également augmenter la production d'ATP et de stimuler la croissance

des algues. Cependant, il est important de poursuivre les recherches pour mieux connaître les mécanismes moléculaires de ces observations ainsi que les conséquences de ce métal sur l'écosystème aquatique à long terme. Dans le cadre de cette étude, il serait intéressant de mesurer le taux de glucose chez les moules exposées au lithium et aussi chez les algues. Il serait aussi bénéfique d'évaluer la présence de biomarqueurs permettant de donner des indications sur l'état de santé des individus. Dans le cadre de cette étude, les dreissènes ont été exposées pendant une semaine. Une exposition sur une période plus longue permettrait de voir si ces effets bénéfiques du lithium sont toujours observables. Évaluer l'activité de la glycogène kinase synthase 3, de l'inositol poliphosphatase (IPPase) et de l'inositol poliphosphatase (IMPase) permettrait de voir si l'augmentation de l'ATP liée à l'exposition au lithium provient de la modification de l'activité de ces molécules.



Remerciements

Je tiens à remercier Fanny Louis et Pascal Poupin de m'avoir accompagné durant ce stage, vous m'avez permis de découvrir le monde de la recherche ce qui fut une expérience très enrichissante. Vous m'avez partagé votre passion et m'avez encouragé dans mon projet.

Merci au Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements continentaux de m'avoir accueilli au sein de votre structure.

Je tiens aussi à remercier tout le personnel du laboratoire.

Merci à Antoine, mon coéquipier de laboratoire de m'avoir accompagné ces dernières semaines.



Références bibliographiques

- Adeva-Andany, M.M., et al. Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion* 46, 73–90 (2019).
- Berg, J. et al. A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio. *Nat Methods* 6, 161–166 (2009)
- Berg, J., Hung, Y. & Yellen, G. A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio. *Nat Methods* 6, 161–166 (2009)
- Boenzi, S., Diodato, D. Biomarkers for mitochondrial energy metabolism diseases. *Essays In Biochemistry*, 62(3), 443–454 (2018)
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254 (1976).
- Briggs, K.T et al. A Molecular Model for Lithium's Bioactive Form. *Biophysical Journal*, 111(2), 294–300 (2016).
- Claudi, R., Mackie, G.L. Practical manual for zebra mussel monitoring and control. Lewis Publishers, Boca Raton (1994).
- Depledge, M.H. The rationale basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Non destructive biomarkers in vertebrates, in: FOSSI, M.C, LEONIZIO, C, Eds. Lewis Publishers, p. 271-296 (1994)
- Diggins, T. A seasonal comparison of suspended sediment filtration by quagga (*Dreissena bugensis*) and zebra (*D. polymorpha*) mussels. *J. Freshw. Ecol.* 27(4), 0–466 (2001).
- Dudev, T. et al. Free and Bound Therapeutic Lithium in Brain Signaling. *Acc. Chem. Res.* (), acs.accounts.9b00389– (2019).
- Dudev, T. et al. How Native and Alien Metal Cations Bind ATP: Implications for Lithium as a Therapeutic Agent. *Sci Rep* 7, 42377 (2017)
- Evariste, L et al. Field biomonitoring using the zebra mussel *Dreissena polymorpha* and the quagga mussel *Dreissena bugensis* following immunotoxic responses. Is there a need to separate the two species?. *Environ. Pollut.* 238(), 706–716 (2018).
- Foretz, M., et al. "Du métabolisme énergétique par l'AMPK." *Med Sci* 22.4, 381-388 (2006).
- Holub, B.J. Metabolism and Function of myo-Inositol and Inositol Phospholipids. *Annu. Rev. Nutr.* 6(1), 563–597 (1986)
- Horgan, M.J., Mills, E.L. Clearance rates and filtering activity of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Implications for freshwater lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(2), 249–255 (1997)



Johns, C. Quagga mussels (*Dreissena bugensis*) as biomonitor of metal contamination: A case study in the upper St. Lawrence River. *J. Great Lakes Res.* 37(1), 0–146 (2011).

Kaidanovich-Beilin, O., Woodgett, J.R. GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4, – (2011)

Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K. Zebra versus quagga mussels: A review of their spread, population dynamics, and ecosystem impacts. *Hydrobiologia*, 746, 97–112 (2015)

Kinzelbach, R. The main features of the phylogeny and dispersal of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. In: Neumann, D., Jenner, H.A. (eds) *The Zebra Mussel *Dreissena polymorpha*: Ecology, Biological Monitoring and First Applications in the Water Quality Management*, pp 5–17 (1992).

Kryger, J., Riisgård, H.U. Capacités de taux de filtration dans 6 espèces de bivalves européens d'eau douce. *Océologie*, 77, 34–38 (1988).

Larger, É., Ferré, P. Physiologie du métabolisme énergétique. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 10(6), 560–567 (2016).

Louis, F. Métabolisme énergétique : synthèse et gestion de l'énergie cellulaire chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Thèse de doctorat de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

MacIsaac, H.J. Comparative Growth and Survival of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*, Exotic Molluscs Introduced to the Great Lakes, 20(4), 783–790 (1994)

Mehrani, H., Storey, K.B. Control of glycogenesis and effects of exercise on phosphorylase kinase and cAMP-dependent protein kinase in rainbow trout organs. *Biochemistry and Cell Biology*, 71(11-12), 501–506 (1993)

Michael J. Berridge. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(6), 933–940 (2009).

Mills, E.L., et al. A Review of the Biology and Ecology of the Quagga Mussel (*Dreissena bugensis*), a Second Species of Freshwater Dreissenid Introduced to North America, 36(3), 271–286 (1996)

Molloy, D.P. et al. Discovery of *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov 1897) in Western Europe. *Biological Invasions*, 9(7), 871–874 (2007).

Nguyen, P. et al. Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92(3), 272–283 (2008).

Péden, R. et al. Environmental transcriptomes of invasive *Dreissena*, a model species in ecotoxicology and invasion biology. *Scientific Data*, 6, 234- (2019).

Peiró, T, et al. Lithium: sources, production, utilisations et perspectives de récupération. *JOM* 65, 986 – 996 (2013).



Quinn, A. et al. Quantifying the ecological niche overlap between two interacting invasive species: the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and the quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 24(3), 324–337 (2014).

Richard S Jope. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. , 24(9), 0–443. (2003).

Roche, H et al. Mise en évidence et validation de biomarqueurs écotoxicologiques dans la population d'anguilles d'un étang de la réserve naturelle nationale de Camargue.

Schrauzer, G.N. Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality. *J. Am. Coll. Nutr.* 21 (1), 14–21 (2002).

Serretti, A. et al. Lithium Pharmacodynamics and Pharmacogenetics: Focus on Inositol Mono Phosphatase (IMPase), Inositol Poliphosphatase (IPase) and Glycogen Synthase Kinase 3 Beta (GSK-3 Beta). *Current Medicinal Chemistry*, 16(15), 1917–1948. (2009).

Shen et al. The toxicity of lithium to human cardiomyocytes. *Environmental Sciences Europe*, 32(1), 59–. (2020).

Sokolova, I M. et al. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79(), 1–15 (2012).

Sposito, G. Distribution of potentially hazardous trace metals. In: fourth edSigel, H. (Ed.), *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 20. Marcel Dekker, New York, pp. 1–20 (1986).

Thomas Marshall; Katherine M. Williams. Phenol addition to the Bradford dye binding assay improves sensitivity and gives a characteristic response with different proteins. , 13(3), 145–150. (1986).

Vijayavel, K., Kashian, D.R. Toxic effect and physiological disruption of sodium phosphate to the quagga mussel (*Dreissena bugensis*). *Environ Sci Pollut Res* 26, 1576–1583 (2019).

W.Jonathan Ryves; Adrian J. Harwood. Lithium Inhibits Glycogen Synthase Kinase-3 by Competition for Magnesium. , 280(3), 0–725. (2001).

Waagen, G et al. Biomanipulation with quagga mussels (*Dreissena rostriformis bugensis*) to control harmful algal blooms in eutrophic urban ponds. *Ecological Engineering*, 90(), 141–150. (2016).

Xuewen M. et al. Absorption of Hydrophobic Contaminants from Ingested *Chlamydomonas rheinhardtii* and *Chlorella vulgaris* by Zebra Mussels, *Dreissena polymorpha*. , 25(2), 0–317. (1999).

Yen T.T.. Modeling metal bioaccumulation in the invasive mussels *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* in the rivers Rhine and Meuse. , 30(12), 2825–2830 (2011).

Ziech, D. et al. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem. Biol. Interact.* 188(2), 334–339 (2010).



Annexes

Tableau 4 Composition du milieu de culture des algues

Nom	Formule brute	Masse prélevée	Volume prélevé (en μ L)	Dilution pour le milieu
Chlorure de cobalt	CoCl ₂	5 mg	50	1/10000
Sulfate de cuivre	CuSO ₄ 5H ₂ O	5 mg	50	1/10000
Chlorure de nickel	NiCl ₂ 6H ₂ O	5 mg	50	1/10000
Chlorure de manganèse	MnCl ₂	5 mg	50	1/10000
Molybdate de sodium	Na ₂ MoO ₄	10 mg	50	1/10000
Oxyde de vanadium	V ₂ O ₅	5 mg	50	1/10000
Chlorure de zinc	ZnCl ₂	5 mg	50	1/10000
Chlorure de calcium	CaCl ₂	750 mg	50	1/10000
Sulfate de magnésium	MgSO ₄ 7H ₂ O	5 g	250	1/2000
Hydrogénophosphate de potassium	K ₂ HPO ₄	5 g	250	1/2000
Phosphate de monopotassium	KH ₂ PO ₄	5 g	250	1/2000
Chlorure ferrique	FeCl ₃	200 mg	250	1/2000
Bicarbonate de soude	NaHCO ₃	1 g	500	1/1000
Acide borique	H ₃ BO ₃	0,5 g	50	1/10000
Nitrate de potassium	KNO ₃	2 g	500	0
			100	

Tableau 5 Détail des données de l' du ratio ADP/ATP

Groupes	Nombre d'échantillons	Moyenne	Variance	Ecart-type
NN	11	5,789	7,181	2,679
A1	12	3,826	7,701	2,775
A1+Li	14	2,003	9,096	3,016

