



FACULTÉ DES SCIENCES

Réponses à un stress environnemental induit
par le cadmium chez un crustacé euryhalin,
Eriocheir sinensis.

Approche intégrative incluant une analyse du
protéome

Dissertation présentée par

Frédéric SILVESTRE

en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Composition du jury :

P. Devos (Promoteur, FUNDP)

M. Raes (Présidente du jury, FUNDP)

R. Blust (Ecophysiology & Biochemistry, UIA)

P. Kestemont (FUNDP)

A. Péqueux (Physiologie animale, ULg)

© Presses universitaires de Namur & Frédéric Silvestre
Rempart de la Vierge, 13
B - 5000 Namur (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre,
hors des limites restrictives prévues par la loi,
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou scanner,
est strictement interdite pour tous pays.

Imprimé en Belgique
ISBN: 2-87037-492-5
Dépôt légal: D / 2005 / 1881 / 16

**7. MISE EN ÉVIDENCE DES PROFILS
D'EXPRESSION DE PROTÉINES DANS
LES BRANCHIES**

7.1. Résumé

Depuis plusieurs années, l'analyse protéomique s'est largement développée (voir chapitre 1.7). Elle répond notamment à la nécessité d'obtenir une vision sans *a priori* des modifications du niveau d'expression des protéines dans un tissu donné, à un moment donné et sous une condition donnée. A ce titre, elle est le complément de la génomique au niveau du produit final de l'expression des gènes : la protéine. Toutefois, la majeure partie de ces études concerne des organismes modèles pour lesquels un grand nombre de séquences nucléotidiques et peptidiques sont connues. Il est aisé de comprendre que les principales avancées ont d'abord concerné le domaine biomédical. Pourtant, le potentiel de développement de cette méthodologie dans le domaine de l'écotoxicologie où les organismes sont encore peu caractérisés au niveau moléculaire, est bien réel.

Au cours des chapitres précédents, il est apparu qu'une exposition chronique à du Cd 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ permettait au crabe chinois de devenir plus résistant vis-à-vis d'une exposition aiguë. De plus, il a été montré que la séquestration de ce métal par des métallothionéines n'était probablement pas suffisante pour expliquer la résistance accrue observée dans les branchies antérieures. D'autres mécanismes se mettant en place pendant le processus d'acclimatation sont donc à rechercher. L'analyse protéomique sans *a priori* nous a semblé être la voie la plus prometteuse et la plus originale pour identifier ceux-ci.

Pour ce faire, deux conditions expérimentales ont été testées : une exposition aiguë (0,5 mg Cd l^{-1} pendant 3 jours) et une exposition chronique (50 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ pendant 30 jours), en plus d'un contrôle. Une branchie antérieure provenant de 6 individus différents pour chaque condition a été prélevée et homogénéisée dans un tampon de lyse. Des gels d'électrophorèse en 2 dimensions ont été réalisés pour un gradient de pH 4-7 et dans un pourcentage d'acrylamide total de 12,5%. Les gels ont ensuite été colorés grâce au nitrate d'argent, scannés par un densitomètre, analysés et comparés grâce au logiciel ImageMasterTM 2D Elite software (Amersham Biosciences). Les spots de protéines d'intérêt ont ensuite été excisés et, après digestion par la trypsine, micro-séquencés grâce à un spectromètre de masse de type *nanoelectrospray Q-tof 2 MS/MS* (Waters, Milford, USA). Les séquences en acides aminés obtenues ont été comparées par homologie avec les séquences présentes dans les bases de

données grâce au logiciel MS BLAST (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html>).

Les gels d'électrophorèse 2D attestent l'existence de profils d'expression de protéines spécifiques au type d'exposition. Ainsi, à partir d'un nombre total moyen de 1205 spots de protéines, nous avons pu montrer que 6 d'entre eux présentaient un niveau d'expression modifié par rapport au contrôle, après une exposition aiguë. Un résultat plus probant encore fut obtenu après une exposition chronique puisque, dans ce cas, 31 spots ont été sur- ou sous-exprimés en comparaison au contrôle.

Sur 25 spots excisés, 15 ont été identifiés. Une alpha tubuline, une glutathion S-transférase et une *crustacean calcium-binding protein 23* sont sous-exprimées lors d'une exposition aiguë alors qu'une autre isoforme de la glutathion S-transférase est sur-exprimée sous cette même condition. Cette méthodologie a également révélé la sur-expression d'une protéine disulfure isomérase, d'une thiorédoxine peroxydase, d'une glutathion S-transférase, d'une sous-unité du protéasome et d'une cathepsine D après une exposition chronique. Sous cette dernière condition, une ATP synthase bêta, 3 isoformes de l'alpha tubuline, une arginine kinase, 2 isoformes de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ainsi qu'une malate déshydrogénase sont sous-exprimées.

Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle la toxicité du Cd envers les branchies antérieures du crabe chinois serait liée à l'induction d'un stress oxydant ainsi qu'à la liaison (oxydation) du Cd sur les ponts disulfures présents dans les protéines et nécessaires à leur conformation tridimensionnelle. Pendant une phase d'acclimatation, les branchies antérieures synthétiseraient des enzymes antioxydantes et des chaperones afin de protéger les macromolécules. L'acclimatation entraînerait en outre l'augmentation de la capacité protéolytique, ce qui pourrait refléter une dégradation accrue de protéines endommagées. D'un autre côté, la sous-expression de plusieurs enzymes impliquées dans différentes voies métaboliques suppose que le crabe pourrait modifier son métabolisme pendant une exposition chronique afin de favoriser les mécanismes compensatoires nécessaires pour résister à de fortes concentrations en Cd. Ces données suggèrent que des équivalents glucose puissent être détournés vers la voie des pentoses phosphates afin de régénérer des équivalents réducteurs sous forme de NADPH.

7.2. Publication 5 : Differential protein expression profiles in anterior gills of *Eriocheir sinensis* induced by cadmium exposure. New findings on acclimation mechanisms.

Frédéric Silvestre, Jean-François Dierick, Valéry Dumont, Marc Dieu, Martine Raes, Pierre Devos

Aquatic Toxicology - soumis (link to the journal home page). A slightly modified version of this article has been published in "Aquatic Toxicology" (Elsevier) Vol. 76, p 46-58 (2006). It is available via Science Direct (link).

Abstract

Cadmium (Cd) is well-known to affect aquatic organisms. However, the molecular mechanisms involved in the response to this metal are only poorly understood. One approach to unravel these mechanisms is the proteomic analysis, already applied successfully to investigate the effects of Cd on model organisms, such as yeast. In this paper, we used the proteomic approach to characterize differential protein expression profiles induced by Cd in anterior gills of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, despite the few sequences available for this organism. Two experimental conditions were tested : (i) a so-called acute exposure (i.e. 500 µg Cd l⁻¹ for 3 days) for which physiological, biochemical and ultrastructural damage have been observed previously; (ii) a so-called chronic exposure (i.e. 50 µg Cd l⁻¹ for 30 days) resulting in physiological acclimation, i.e. increased resistance to a subsequent acute exposure. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) reveal 6 protein spots differentially expressed after acute, and 31 after chronic Cd exposure. From these spots, 15 protein species were identified using MS/MS micro-sequencing and MS BLAST database searches. Alpha tubulin, glutathione S-transferase and crustacean calcium-binding protein 23 are down-regulated after an acute exposure, whereas another glutathione S-transferase isoform is up-regulated. Furthermore, this proteomic methodology revealed the over-expression of protein disulfide isomerase, thioredoxin peroxidase, glutathione S-transferase, a proteasome subunit and cathepsin D after chronic exposure. Under the same condition, ATP synthase beta, alpha tubulin, arginine kinase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and malate dehydrogenase were down-regulated. These results demonstrate that waterborne Cd induces differential signatures of protein expression in gills

of decapod crustaceans, that are distinct in acute and chronic exposure. Protein identification supports the idea that Cd mainly exerts its toxicity through oxidative stress induction and sulfhydryl-group binding. As a result, we suggest the up-regulation of several antioxidant enzymes and chaperonins during acclimation process. The gill proteolytic capacity seems also to be increased. On the other hand, the clearly decreased abundance of several enzymes involved in metabolic pathways, suggests that during chronic metal exposure, crabs could switch over their metabolism towards a compensatory state to cope with a polluted environment. These data are in agreement with the hypothesis of metabolic reshuffling through the pentose phosphate pathway for the regeneration of NADPH reducing equivalents.

Keywords: acclimation; anterior gill; cadmium; *Eriocheir sinensis*; proteomics

Introduction

Cadmium (Cd) is a non-essential and highly toxic metal widespread in the environment. It coexists with zinc in zinc ore and is widely mined. As a major water pollutant, it can penetrate into aquatic organisms and induce detrimental effects such as respiratory or osmoregulatory dysfunctions (Thurberg et al., 1973; Bjerregaard and Vislie, 1985; Zyadah and Abdel-Baky, 2000). As for mercury, lead and arsenic, Cd is known to be sulfhydryl-reactive (Quig, 1998). Its toxicity is believed to be originated mainly from its strong binding capacity to sensitive groups such as thiols and histidyls, resulting in the deterioration of biologically important molecules (Vallee and Ulmer, 1972). Moreover, there is an increasing body of evidence that Cd can exert its effects at the cellular level through the induction of reactive oxygen species (ROS), resulting in lipid peroxidation, DNA damage and *S*-glutathionylation of proteins (Stohs and Bagchi, 1995; Risso-de Faverney et al., 2001).

In the aquatic environment, organisms usually face relatively low pollutant concentrations but over a rather long duration. Such a chronic exposure to sub-lethal metal concentrations is known to possibly induce an acclimation process. This process is defined as increased tolerance to an elevated, usually lethal, concentration of a toxicant arising from chronic exposure to a sub-lethal concentration of that toxicant (McDonald and Wood, 1993). Increased tolerance to Cd following a pre-treatment has been shown for different organisms such as the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pascoe and Beattie, 1979 ; Hollis et al., 1999; Chowdhury et al., 2004), *Bufo arenarum* embryos (Herkovits and Perez-Coll, 1995), *Daphnia magna* (Bodar et al., 1990 ; Stuhlbacher and Maltby, 1992) and *Gammarus pulex* (Stuhlbacher et al., 1992).

In a previous study, we found such an acclimation process for the euryhaline Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, submitted to Cd. A chronic exposure at 50 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ for 30 days in freshwater, subsequently followed by an acute exposure at 500 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ for 3 days, maintained the hemolymph osmolality (i.e. $508 \pm 67 \text{ mOsm kg}^{-1}$) and ionic concentrations (i.e. $276 \pm 32 \text{ mM Na}^+$) at higher levels than in crabs directly submitted to 500 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ for 3 days (i.e. $423 \pm 41 \text{ mOsm kg}^{-1}$ and $201 \pm 22 \text{ mM Na}^+$) (Silvestre et al., in press b). In this species, the so-called anterior gills (considered as respiratory) are more sensitive and more permeable to Cd than the so-called posterior gills (considered as osmoregulatory) (Silvestre et al., 2004; in press b). Biochemical and physiological data, strengthened by a high degree of structural alterations, suggest that after a direct acute

exposure, anterior gills could have lost their permeability properties. Under such conditions, we have proposed that an increase of the dissipative flows of ions and water through anterior gills would contribute to the observed hyper-osmoregulatory capacity impairment. These alterations are prevented when the acute exposure follows a chronic exposure. In consequence, it is reasonable to think that during chronic Cd exposure, acclimation mechanisms have occurred within anterior gills that confer increased resistance to Cd.

Our understanding of defence mechanisms that develop in cells to overcome the toxic effects of metals and their relevance in the acclimation process, is far from being complete. In bacteria, we know that toxic ions are exported outside the cell by efflux pumps (Silver and Phung, 1996). In eukaryotes, cell sequestration of the metal by cysteine-rich peptides/proteins such as glutathione (GSH), phytochelatins (PCs) and metallothioneins (MTs) is the most described mechanism (Singhal et al., 1987; Klaassen et al., 1999; Sterenborg and Roelofs, 2003). However, some findings indicate that there must exist other mechanisms than a change in MTs dynamic contributing to Cd resistance in animals. Indeed, in Least killifish *Heterandria formosa* resistant to Cd, a maximal Cd-binding capacity of 26.5% implies that much of the accumulated Cd was not detoxified via MTs (Xie and Klerks, 2004). Similar conclusion was drawn for the Chinese crab. When quantifying the Cd accumulation in *E. sinensis*, we found high concentrations in anterior gills ($111 \pm 50 \mu\text{g g}^{-1}$ wet weight) from crabs exposed to $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ for 30 days (Silvestre et al., in press a). If we assume that all the metallothionein-like proteins are fully saturated with Cd, in a proportion of 1 MT molecule binding 6 atoms of Cd, only 5.5% of the Cd can be sequestered.

Proteomic analysis is a powerful tool to investigate the cellular response to toxicants, and thus to uncover new acclimation mechanisms. The term “proteome” was first defined in 1995 to describe the protein complement of a genome (Wasinger et al., 1995). Protein expression levels, post-translational modifications or protein-protein interactions can be approached in a given biological system using proteomic techniques, resulting in an integrated overview of disease and cellular processes at the protein level (Blackstock and Weir, 1999). So far, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) has been widely used to separate complex protein mixtures (O'Farrell, 1975), while mass spectrometry and bioinformatics enable protein identification. Among this emerging field of research, protein expression mapping gives a global view of protein expression changes within tissues, cells or body fluids, under a defined condition versus a control condition.

So far, most proteomic studies have focused on drug discovery, biomarker identification or protein-protein interactions in human disease processes (Hanash, 2003; Walgren and Thompson, 2004). Consequently, the benefits have been realised for model species that are rarely relevant in environmental biology. Nevertheless, some authors have shown that an environmental stress like salinity, temperature or pollutant contamination, can modify protein expression in different tissues of relevant aquatic organisms (Kültz and Somero, 1996; Shepard and Bradley, 2000; Shepard et al., 2000; Meiller and Bradley, 2002). Unfortunately, such studies are scarce and most of them only focus on protein expression mapping with limited protein identification. One of the reasons is the low output of protein identification using sequence similarity searches. Proteomic studies involving identification of proteins differentially expressed after Cd exposure were undertaken in model organisms only, such as yeast, whose complete genomic sequences are available (Vido et al., 2001; Bae and Chen, 2004). Nevertheless, understanding the mechanisms of molecular and subcellular interactions with pollutants using the genomic and proteomic approaches, is viewed as one of the crucial challenges for environmental toxicologists in the next decade (Moore, 2002).

The aim of the present study was to investigate anterior gill cellular response to Cd in *E. sinensis* submitted to acute or chronic waterborne Cd exposure. To achieve this goal, we used 2-DE to analyse the modifications in protein expression profiles. Mass spectrometric *de novo* sequencing of tryptic peptides associated with database search via mass spectrometry-driven BLAST (MS BLAST), allowed the identification of 15 protein species either under or over-expressed after chronic and/or acute metal exposure.

Materials and methods

Chemicals

Cadmium chloride (CdCl_2), protease inhibitor cocktail (P8340), DTT, thiourea, SB 3-10 and iodoacetamide were purchased from Sigma-Aldrich (USA); sequencing grade modified trypsin (V511A) was purchased from Promega (USA); urea, CHAPS, glycine, SDS were of PlusOne quality and were purchased, as pharmalyte pH 3-10, immobiline DryStrips and IPG buffer pH 4-7, from Amersham Biosciences (England); Tris was purchased

from Fluka (Switzerland); glycerol and AgNO_3 were purchased from Merck (Germany).

Animals, cadmium exposure and gill excision

Chinese mitten crabs, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards 1854) (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) were caught in freshwater lakes near Emden (Germany) in spring 2002, and kept in tap water tanks ($14.9 \pm 0.6^\circ\text{C}$; 2 mOsm kg^{-1} ; $64 \text{ mg Ca}^{2+} \text{ l}^{-1}$) for at least 2 weeks before experiments. Water was changed and animals were fed every other day. Intermolt males ($69.7 \pm 18.6 \text{ gr}$) were distributed in three tanks. The first group was used as control; the second group was exposed to $500 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ for 3 days (acute exposure); the third group was exposed to $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ for 30 days (chronic exposure). Six individuals per group were sacrificed. For each animal, the fifth anterior gill was excised and manually perfused with crab Ringer solution (240 mM NaCl , 5 mM KCl , 5 mM MgCl_2 , 12.5 mM CaCl_2 , $8.8 \text{ mM H}_3\text{BO}_3$, pH 7.6) to remove hemolymph. Gills were then snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein extraction.

Protein extraction and determination

Proteins were extracted in lysis buffer by homogenizing gill tissue in a glass homogenizer, using a glass pestle, the shaft of which was driven up to 2,800 rpm for twice 25 s. Lysis buffer solution contained 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 2% SB 3-10, 1% DTT, 2% pharmalyte pH 3-10 and 0.25% protease inhibitor cocktail. Solubilisation was achieved after having shaken the samples 2 hours at room temperature. Samples were then centrifuged 15 min at $12,000 \times g$ and the soluble protein concentration was measured in the supernatant using the BioRad protein assay.

Electrophoresis and staining procedures

Immobiline DryStrips (pH 4-7; 18cm) were directly rehydrated for 30 min into $340 \mu\text{l}$ of a solution containing $70 \mu\text{g}$ of sample proteins mixed with 8 M urea, 2% CHAPS, 18 mM DTT and 0.5% IPG buffer pH 4-7 and then actively rehydrated at 20 V for 12 h. First-dimension isoelectric-focusing (IEF) was then run on an IPGphor system (Amersham Biosciences) at 200 V for 1 h, 500 V for 1 h, 1000 V for 1 h and 8000 V for 5 h ($50 \mu\text{A/strip}$). Afterwards, gels were equilibrated in 6 M urea, 30%

glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue, 50 mM Tris pH 8.8 and 65 mM DTT for 15 min and thereafter 15 other min in the same buffer except for 200 mM iodoacetamide replacing DTT. The second-dimension SDS-PAGE (12.5% T, 2.6% C, 200 x 160 x 1.5 mm) was carried out at constant 1.5 W per gel for 18 h at 15°C in the Ettan DALT Twelve system (Amersham Biosciences). Proteins were stained with silver nitrate similarly to the methods described by Swain and Ross (1995). Proteins to be sequenced were excised from silver-stained gels according to modified protocols avoiding glutaraldehyde (a cross-linking and sensitizing agent) and with methanol replacing ethanol during the fixation step (Shevchenko et al., 1996).

Densitometry and image analysis

Each gel was scanned on a flatbed densitometer (ImageScanner™, Amersham Biosciences) and analysed with the ImageMaster™ 2D Elite software (Amersham Biosciences). Spot abundance was determined by the area of the spot multiplied by the density and referred to as the spot volume. After background subtraction, normalization calculates the ratio between one spot volume and the sum of the volumes of all the spots detected on the same gel, then multiplied by the sum of the areas of all the spots detected on the same gel. Afterwards, the gels were matched together and only spots present at least in 5 out of 6 gels, were selected for statistical analysis.

Statistics

Mean normalized volumes (NV) for each spot were compared between Cd exposed and control gills. Induction and repression factors (IF and RF) correspond to the ratio: NV Cd / NV controls. MW and pI were calculated on the basis of mean computed values. Statistical significance was tested for protein spot NV by t-student test for unpaired samples after normality (Shapiro-Wilks' W test) and homogeneity of variances (Levene's test) testing. Variables were log transformed if one of these conditions was not encountered. If necessary, we proceeded with the Mann-Whitney non parametric test. Significance level was defined as $p < 0.05$.

NV coefficients of variability (CV) were calculated for each spot between all the gels of the same condition, using the formula: $CV = \text{standard deviation} \times \text{mean}^{-1} \times 100$.

Spot excision and protein identification

Protein spots were excised from the gel before in-gel tryptic digestion performed as previously described (Shevchenko et al., 1996). The resulting peptides were purified and concentrated on home-made nano-scale reversed phase disposable columns prior to MS analysis.

The proteins were micro-sequenced using a nanoelectrospray Q-tof 2 MS/MS instrument (Waters, Milford, USA). The sequence elements obtained were used to carry out a MS BLAST search to identify proteins by sequence similarity against the available sequence databases (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html>) (Shevchenko et al., 2001).

Gill oxygen consumption

In parallel to the proteomic analysis, some anterior gills were excised after Cd exposure and directly used for O₂ consumption measurements. They were fit in an incubation chamber filled with 2.11 ml of a buffer

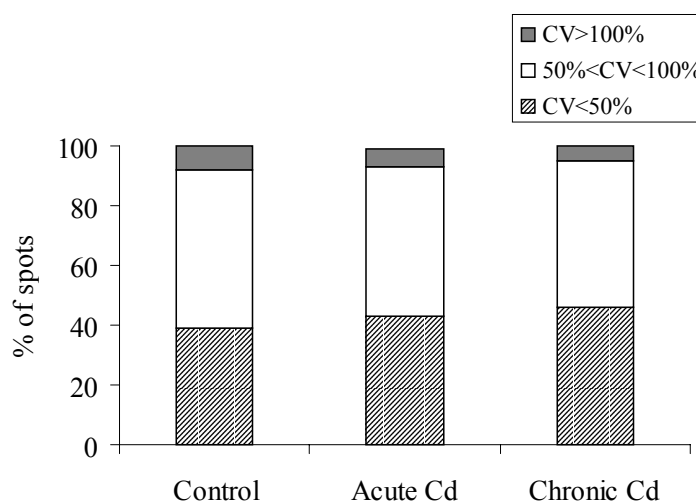


Fig. 1. Percentage of protein spots that have a normalized volume coefficient of variability below 50%, between 50 and 100% and above 100% for each condition.

solution containing: 240 mM NaCl, 5 mM KCl, 12.5 mM CaCl₂, 9 mM H₃BO₃, pH 7.6. Oxygen consumption rates were measured during 2 min using a Clarck electrode connected to a millivoltmeter. Respiration is expressed in nmol O₂ min⁻¹ g⁻¹ wet weight.

Results

Using a proteomic approach, we analysed the Cd response in anterior gills of the Chinese crab submitted to acute (i.e. 500 µg Cd l⁻¹ for 3 days) or chronic exposure (i.e. 50 µg Cd l⁻¹ for 30 days). One of the most critical points when studying the proteome of tissues derived from different individuals, is the potential high variability resulting from genetic disparity. In our experiment, most spots have a CV below 100% as shown in Fig.1. Spots with a CV higher than 100% are scarce and represent only 8, 6 and 5% of all the spots for the control, acute and chronic Cd exposed gills, respectively. Moreover, the three treatments present the same pattern of variability. These preliminary results indicate that even if the biological material analysed in the present study comes from different organisms, variability of NV is acceptable and is comparable for the different treatments, which allow comparisons with high reliability.

Protein expression profiles

Fig. 2 shows typical 2-DE gels obtained from gills after acute (A) or chronic (B) Cd exposure. A mean of 1205 ± 200 protein spots per gel was detected using silver nitrate staining and ImageMaster™ 2D Elite software analysis.

From the comparative analysis of the gills, it comes out that both acute and chronic metal treatments induce significant changes in protein expression profiles. A total of 34 protein spots are reported to be differentially expressed after cadmium exposure (Fig. 3; Tables 1, 2). The chronic condition induced the highest number of changes with a total of 31 protein spots presenting a modified NV, 10 spots being significantly over-expressed and 21 under-expressed. On the other hand, we could show only 6 spots with significantly modified abundance after an acute Cd exposure. Among them, 5 are under-expressed and only one, spot number 919, is over-expressed. Surprisingly, amongst the 34 spots displaying altered

expression, only 3 were common to both acute and chronic exposure. Spots number 567 and 909 are down-regulated after both types of Cd exposure, while spot number 894 is down-regulated after acute exposure but is up-regulated after chronic exposure.

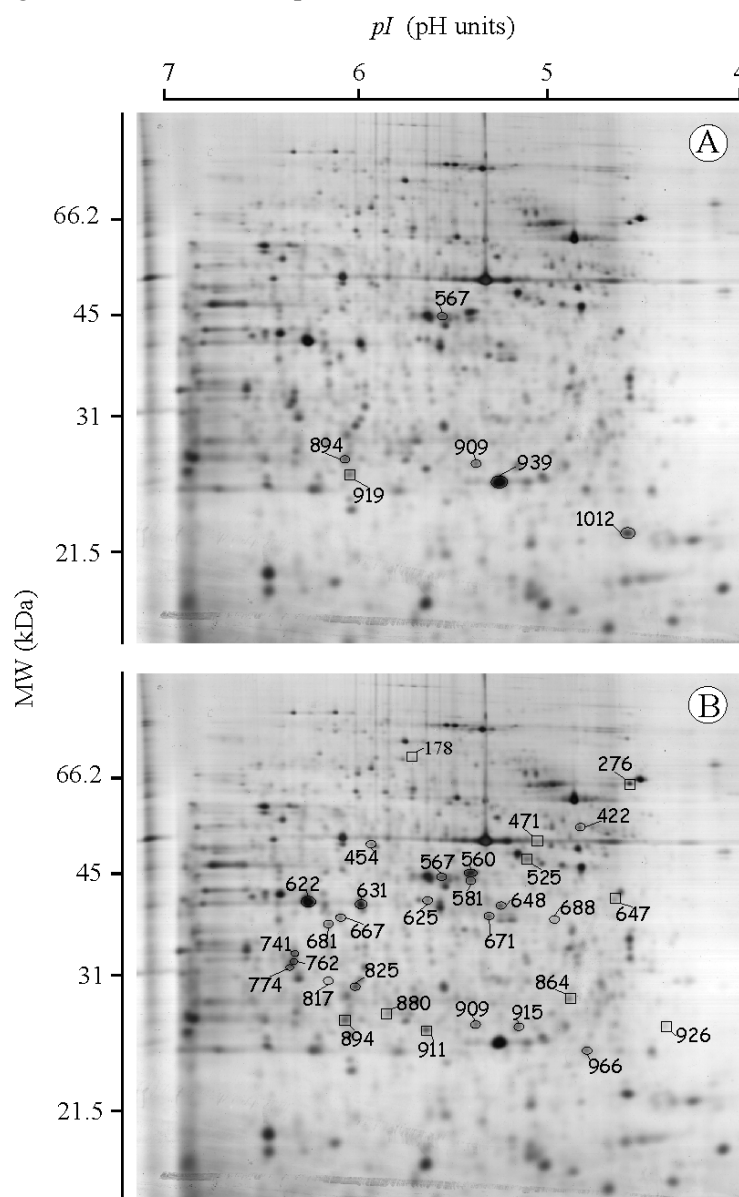


Fig. 2. Protein expression profiles in 2-DE gels obtained from anterior gills of *Eriocheir sinensis* exposed to acute (500 µg l⁻¹ 3 days) (A) or chronic (50 µg l⁻¹ 30 days) (B) cadmium. □ : over-expressed spots; ○ : under-expressed spots.

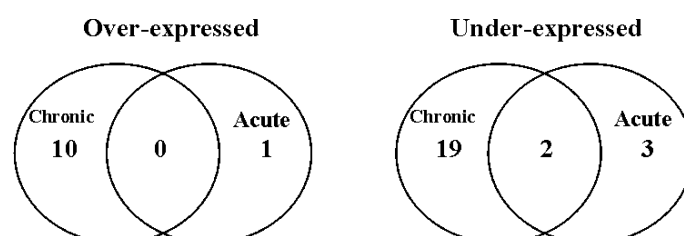


Fig. 3. Venn diagrams of over and under-expressed protein spots from anterior gills of *Eriocheir sinensis* exposed to chronic ($50 \mu\text{g l}^{-1}$ 30 days) or acute ($500 \mu\text{g l}^{-1}$ 3 days) cadmium. Features that are shared by both treatments are indicated in the overlapping areas.

Table 1. Up-regulated and down-regulated protein spots and identified proteins in anterior gills of *Eriocheir sinensis* exposed to acute Cd ($500 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ for 3 days).

Spot number	Protein	IF	RF	MW (kDa)	pI (pH unit)	sequences
567	Alpha tubulin		0.5 *	45	5.6	LLGQLVSSLTASLR ACFEPANQMVK GDDSFNTFFSE
894	Glutathione S-transferase (GST)		0.55 *	27	6.1	LPDLYYMMLSPPCR YFDMGTLFHR
909	unidentified		0.63 *	27	5.5	ITVES
919	Glutathione S-transferase (GST)	2.5 **		26	6.1	LNYPDMGTLFHR YAAAGDNLTADHTLLTTVLQNK
939	Crustacean calcium-binding protein 23 (CCBP-23)		0.56 *	25	5.4	AIDDDYFVSVV
1012	unidentified		0.44 *	22	4.7	no sequence

^{a, b} The induction (IF) and repression (RF) factors are the ratios between normalized volumes in exposed and controls.

^c MW and pI correspond to experimental calculated values.

^d unidentified proteins were analysed by MS/MS but identification was not achieved.

^e no sequence means that MS/MS data did not lead to amino acids sequence for this protein.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Table 2. Up-regulated and down-regulated protein spots and identified proteins in anterior gills of *Eriocheir sinensis* exposed to chronic Cd (50 µg Cd l⁻¹ for 30 days).

Spot number	Protein	IF	RF	MW (kDa)	pI (pH unit)	sequences
178	not excised	14.8**		73	5.8	/
276	Protein disulfide isomerase (PDI)	4.9 **		65	4.7	VLVASNFDEVAFSK TLEALSDFLEGK SESGLTTFVQK FVSANSL VDATEETELA
422	ATP synthase beta chain		0.3 *	54	4.9	TIAMDGTKGNVR FTQAGSEVSALLGR LLNVLGE LGLYPAV
454	unidentified		0.36**	51	6.0	no sequence
471	unidentified	3.1**		51	5.2	no sequence
525	Cathepsin D	2.2 *		48	5.2	CRSAIADASTSLIAAPAEER
560	Alpha tubulin		0.13 **	45	5.5	AVFVDLEP ELVDVVLDR NLDLERPSYIN LLGQLVSSLTASLR
567	Alpha tubulin		0.33 **	45	5.6	LLGQLVSSLTASLR ACFEPANQMVK GDDSFNTFFSE
581	Alpha tubulin		0.14 **	44	5.5	AVFVDLEPSVVDEVK
622	GAPDH		0.31 **	41	6.3	AQNII VVSWYDPEFGYFLN
625	not excised		0.19**	41	5.7	/
631	GAPDH		0.45 **	41	6.0	QAAGNIIPSST VSWYDDKFGYSNR
647	unidentified	3.1**		41	4.8	no sequence
648	unidentified		0.51**	40	5.4	no sequence
667	not excised		0.20**	39	6.1	/
671	unidentified		0.26**	39	5.4	no sequence
681	not excised		0.40**	38	6.2	/
688	not excised		0.36**	38	5.1	/
741	not excised		0.29**	34	6.4	/
762	not excised		0.23**	33	6.4	/
774	not excised		0.29**	32	6.4	/
817	not excised		0.38*	31	6.2	/
825	Malate dehydrogenase		0.24 **	30	6.1	VLVVGNPANTNALIACK
864	unidentified	1.6**		29	5.0	no sequence
880	Proteasome subunit	2.1 **		28	5.9	FFPYVSNLAGVDEQK FVMLASDTR

894	Glutathione S-transferase (GST)	4.2 **	27	6.1	LPDLYYMMLSPPCR YFDMGTLFHR
909	unidentified	0.24**	27	5.5	ITVES
911	Thioredoxine peroxidase (TPx)	2.1 **	26	5.7	GLFIIDLKQNLK QVTINDLVE
915	Arginine kinase (AK)	0.18 **	26	5.3	VSSILSNLEGELKGYFFPLTGMTK
926	unidentified	2.9**	26	4.5	NQPMTFQLGV
966	unidentified	0.06**	25	4.9	no sequence

^{a,b} The induction (IF) and repression (RF) factors are the ratios between normalized volumes in exposed and controls.

^c MW and pI correspond to experimental calculated values.

^d not excised spots were not analysed by MS/MS.

^e unidentified proteins were analysed by MS/MS but identification was not achieved.

^f no sequence means that MS/MS data did not lead to amino acids sequence for this protein.

*p<0.05; **p<0.01.

Protein identification

We excised 25 out of the 34 protein spots that were differentially expressed after Cd exposure. The other 9 spots were too weak and/or were too close to other spots to be isolated and excised with certitude. A total of 15 proteins were identified using nanoelectrospray Q-tof 2 MS/MS micro-sequencing and MS BLAST search by sequence similarity. The remaining 10 unidentified proteins could not be identified due to poor MS/MS data.

MW, pI and IF/RF of the 34 protein spots are reported in Table 1 and 2 for acute and chronic Cd exposure respectively. In the same tables are reported the name and the partial sequences of the identified proteins.

Proteins induced or repressed after acute Cd exposure

Four protein species were identified to be over or under-expressed after acute Cd exposure. One glutathione S-transferase (GST) isoform (spot 894), with a MW of 27 kDa, is significantly down-regulated (RF: 0.55; p<0.05). On the contrary, another GST isoform (spot 919), with a MW of 26 kDa, is 2.5-fold up-regulated (p<0.01).

Three peptide partial sequences enabled the identification of an alpha tubulin isoform (spot 567), which is significantly down-regulated (RF: 0.50; p<0.05).

Finally, an EF-hand Ca²⁺-binding protein identified as the crustacean calcium-binding protein 23 (CCBP-23), is significantly under-expressed (RF:0.44; p<0.05).

Proteins induced or repressed after chronic Cd exposure

Eleven protein species induced or repressed after chronic Cd exposure were identified. Five peptide partial sequences obtained from spot 276 allowed to identify a protein disulfide isomerase (PDI) isoform. This enzyme, a chaperone involved in protein disulfide bond formation and isomerisation, is 4.9-fold over-expressed ($p < 0.01$) after Cd exposure to $50 \mu\text{g l}^{-1}$ for 30 days (Fig. 4).

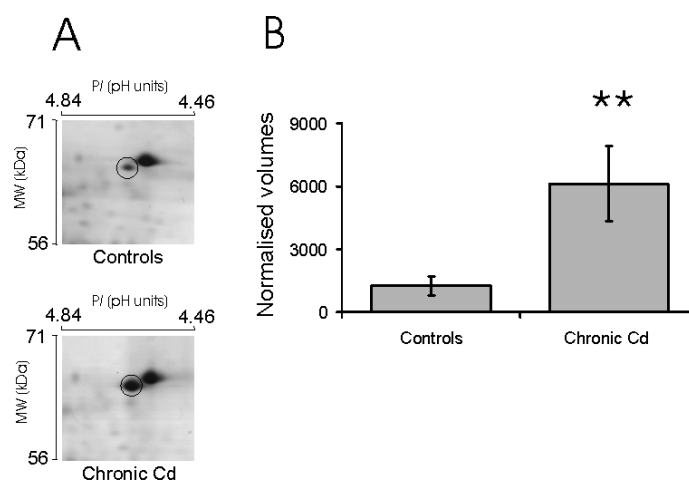


Fig. 4. A: Magnification of protein spot 276, over-expressed in anterior gills of *Eriocheir sinensis* exposed to chronic cadmium ($50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ for 30 days). This protein spot was identified as a protein disulfide isomerase (PDI) isoform. B: normalized volumes for PDI. Mean $\pm$ S.D. ** $p < 0.01$.

High IFs are also reported for two enzymes involved in cellular antioxidant defence mechanisms. On the one hand, a thioredoxine peroxidase isoform (TPx) (spot 911) is 2.1-fold over-expressed ($p < 0.01$). On the other hand, spot 894, identified as a GST isoform, is 4.2-fold over-expressed ($p < 0.01$).

Two protein species involved in protein degradation pathways are over-expressed after chronic Cd exposure. A cathepsin D isoform with an IF of 2.2 ($p < 0.05$) is identified on the basis of one 21 amino acid peptide sequence. We also identified a proteasome subunit which is 2.1-fold over-expressed ($p < 0.01$).

Three isoforms of the alpha tubulin were recognized to be down-regulated after chronic Cd exposure. Their RF are 0.13, 0.14 and 0.50 and are all significant at $p < 0.01$.

All other protein spots identified to be under-expressed after chronic Cd exposure are involved in metabolic pathways and ATP supply at different levels. From them, the arginine kinase (AK), a phosphagen kinase found in invertebrates (Ellington, 2001), is highly down-regulated (RF: 0.18; $p < 0.01$). Similarly, two isoforms of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (RF: 0.31 and 0.45; $p < 0.01$), one isoform of the malate dehydrogenase (RF: 0.24; $p < 0.01$) and one isoform of the ATP synthase beta (RF: 0.30; $p < 0.05$) are significantly under-expressed.

Gill oxygen consumption

As physiological sign of altered oxidative metabolism, O_2 consumption was directly measured on isolated anterior gills after Cd exposure (Fig. 5). O_2 consumption drops from 1175 ± 432 $\text{nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ w.w.}$ for controls to 661 ± 426 $\text{nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ w.w.}$ for chronically exposed gills ($p < 0.05$), whereas no modification is observed after acute exposure (1312 ± 475 $\text{nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ w.w.}$).

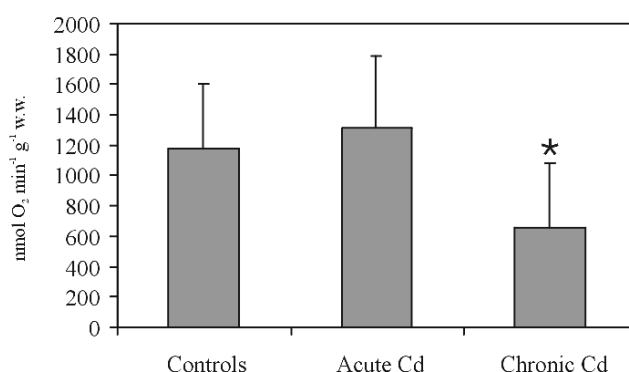


Fig. 5. Oxygen consumption of isolated anterior gills from *Eriocheir sinensis* exposed to acute ($500 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ for 3 days) or chronic ($50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ for 30 days) cadmium. Mean $\pm$ S.D. * $p < 0.05$.

Discussion

The proteomic approach developed in the present study provides new evidence that a toxicant can affect the protein expression profiles in tissues of an exposed aquatic organism. Similar conclusions were already drawn in mollusc and fish tissues for pollutants like copper, zinc, PCBs and EDCs (Shepard and Bradley, 2000; Shepard et al., 2000; Bradley et al., 2002; Meiller and Bradley, 2002; Shrader et al., 2003). To our knowledge, it is the first demonstration of such an effect of Cd in a decapod crustacean by using the proteomic approach.

One of the main possible problems when studying wild animals at the proteomic level is the genetic disparity that could induce high variability in protein expression profiles due to interindividual discrepancy. Even if such a variability exists in tissues of Chinese crabs, we showed that less than 10% of all the protein spots present at least in 5 out of 6 gels had a normalized volume CV higher than 100%, and that the three conditions tested in the present study showed the same pattern of variability. Therefore, reliable comparisons could be undertaken. For protein spots that have their NV modified by Cd exposure, IF are comprised between 1.6 and 14.8 and RF between 0.06 and 0.63. A total of 86% of these protein spots have IF/RF higher/lower than 2.0/0.50. Therefore, we propose that this developed methodology can be generalised to analyse the effects of pollutant on a large scale protein expression level in aquatic organisms. However, it is best suited when at least 2-fold variations (increase or decrease) of protein expression are induced. There is no doubt that more protein expression changes occur in our experimental conditions, but that they are either too small to be detected, or concern poorly abundant proteins. If we want to decrease the threshold of expression variations that can be discerned, other more sophisticated methodologies such as fluorescent 2-D differential in gel electrophoresis (DIGE) should be used (Unlu et al., 1997).

Proteomics has burst onto the scientific community over the last few years. However, most studies have focused on drug discovery, biomarker identification or protein-protein interactions in human pathological processes (Hanash, 2003; Walgren and Thompson, 2004). Consequently, the benefits have been realised for model species that are seldom relevant in environmental biology. In the present study, we demonstrate that the proteomic analysis, using 2-DE and *de novo* sequencing, is a reliable and powerful approach to investigate the cellular responses to pollutants in a non model organism with few genomic sequences available in databases. MS/MS micro-sequencing and MS BLAST search by sequence similarity as described by Shevchenko et al. (2001), enabled the identification of 15

out of 25 protein species over or under-expressed in anterior gills of the Chinese crab. On this basis, some cellular responses to Cd and some mechanisms of toxicity can be hypothesized :

Binding to sulfhydryl groups

To our knowledge, the present study is the first to report a strong induction of a protein disulfide isomerase (PDI) isoform in response to chronic Cd exposure. This enzyme is known to catalyse the formation, reduction and isomerisation of disulfide bonds between appropriate cysteine residues (Laboissière et al., 1995; Frand et al., 2000; Freedman et al., 2002), which is essential for correct folding, stability, and/or multimerisation of many proteins. Moreover, PDI acts as a molecular chaperone and has the ability to bind to polypeptide chains, increasing the yield of correctly folded proteins (Noiva et al., 1993). Cd is known to be a sulfhydryl-reactive metal, such as mercury, lead and arsenic. It can disrupt the structure and function of numerous important proteins through direct binding to sulfhydryl groups (Vallee and Ulmer, 1972; Quig, 1998). Hence, we suggest that the induction of PDI in crabs chronically exposed to Cd is an essential mechanism to protect and/or repair target proteins and so to reduce the toxicity of the metal. This assumption is also corroborated by the demonstration in *E. coli* that mutated *DsbA* (a protein homologous to PDI in bacteria), decreases the resistance to Cd (Stafford et al., 1999).

Induction of oxidative stress

It is widely assumed that Cd exerts its toxicity at least in part through the induction of ROS, resulting in lipid peroxidation, DNA damage and S-glutathionylation of proteins (Risso-de Faverney et al., 2001). Nevertheless, unlike iron, copper and chromium, Cd is redox-inactive and does not directly generate free radicals (Ercal et al., 2001). Its pro-oxidant properties might be due to: 1) displacement of Fe^{2+} , which induces ROS via a Fenton-like reaction (Casalino et al., 1997); 2) inhibition of antioxidant enzyme activities such as catalase, superoxide dismutases (Casalino et al., 2002), thioltransferases and glutathione reductases (Chrestensen et al., 2000); 3) depletion of GSH (Figueiredo-Pereira et al., 1998); 4) alteration of the electron transfer chain in mitochondria (Wang et al., 2004).

The present study undertaken in an aquatic organism exposed to Cd through the surrounding water, shows that some antioxidant enzymes are over-expressed after the metal exposure, which is in agreement with the hypothesis of pro-oxidant properties of Cd. We indeed observe the induction in anterior gills of two enzymes classified as antioxidants: thioredoxin peroxidase (TPx) and glutathione S-transferase (GST). TPx is

known to exert a protective antioxidant role through its peroxidase activity ($\text{ROOH} + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$), whereby hydrogen peroxide and a wide range of organic hydroperoxides are reduced and detoxified (Wood et al., 2003). Afterwards, TPx is itself reduced by the NADPH-dependent thioredoxin/thioredoxin reductase system. Other studies have already shown the induction of TPx in yeast after Cd exposure (Vido et al., 2001; Bae and Chen, 2004). Moreover, Radyuk et al. (2003) found increased resistance to Cd in *Drosophila melanogaster* over-expressing TPx. In crab gills, it is worthwhile to note that a 2.1-fold TPx induction is only observed after chronic Cd exposure but not after acute. Hence, we assume that this TPx isoform could participate to the acclimation process by reducing the oxidative stress induced by the metal.

Like in rat liver cells (Casalino et al., 2004) and in the yeast *S. pombe* (Bae and Chen, 2004), in which either GST activity or expression are stimulated by Cd, anterior gills from crabs exposed to chronic Cd, over-express one GST isoform (spot 894) with a high induction factor of 4.2. GSTs are evolutionary conserved enzymes that detoxify many xenobiotic compounds. However, GSTs are also reported to protect cells from oxidative stress by detoxifying some of the secondary ROS produced when ROS react with cellular components (Ravichandran et al., 1994). As for TPx, our results indicate that the GST isoform induction could help the crab gills to cope with an oxidative stress induced by Cd. However, further studies are required to understand the role of GST in metal acclimation. As a matter of fact, we found the same isoform under-expressed after acute Cd exposure. Moreover, we observed that another isoform (spot 919) was over-expressed after acute and unmodified after chronic exposure. Different GST isoforms could thus react differently depending on the type of metal exposure. A possible explanation could be the simultaneous presence of a reduced and an oxidised forms of the enzyme. The reduced form would indicate the level of antioxidant defence by GST, and would logically be induced in acclimated animals, while the oxidised form would be more an indicator of the oxidative injury to the cells, and would consequently be present in higher amount in impaired gills. The only cysteine present in the peptide sequence obtained from spot 894 is a carbamidomethylcysteine and is insufficient to conclude about the oxidative status of this protein. More sequences are therefore necessary to investigate the oxidative state of each cysteine and confirm or invalidate the possibility of reduced and oxidised GST forms.

Metabolism shift

Anterior gills from crabs exposed to chronic Cd exhibit down-regulation of some enzymes involved at different levels of metabolic pathways. These protein species are GAPDH (glycolysis), malate dehydrogenase (tricarboxylic acid cycle), ATP synthase beta (oxidative phosphorylation) and arginine kinase (ATP buffering in the cytosol and energy shuttle between mitochondria and the cytosol).

GAPDH is the key enzyme regulating glycolysis. It catalyses the transformation of glyceraldehyde-3-phosphate into 1,3-biphosphoglycerate. This enzyme is known to be very sensitive to ROS and H₂O₂. Under such oxidative conditions, it is easily inactivated by S-thiolation and down-regulation, providing a rapid means of reversibly inhibiting the carbon flux through glycolysis (Grant et al., 1999; Costa et al., 2002; Shenton and Grant, 2003). It has been proposed previously that such a reversible inhibition of glycolysis could be beneficial during oxidative stress since it would result in a redirection of glucose equivalents flux through the pentose phosphate pathway (Ravichandran et al., 1994; Godon et al., 1998; Shanmuganathan et al., 2004). This pathway thus regenerates NADPH, the most effective reducing agent in the cell, that can be used as reducing equivalents for instance by the thioredoxin and glutaredoxin antioxidant systems (Holmgren, 1989). As a matter of fact, we observe in the Chinese crab chronically exposed to Cd, a significant down-regulation of two GAPDH isoforms. It indicates that during acclimation, glycolysis could be repressed. Consequently, we propose that glucose equivalents could be re-directed through the pentose phosphate pathway, contributing to the regeneration of NADPH in order to cope with a putative oxidative stress. In addition, emerging new functions of GAPDH in mammalian cells (e.g. in endocytosis, DNA repair and apoptosis) (Sirover, 1996 ; 1999), suggest that its observed down-regulation could have further unknown consequences in the cell physiology of crabs exposed to toxicants such as Cd.

Down-regulation of malate dehydrogenase and ATPsynthase beta could indicate decreased mitochondrial oxidation during chronic Cd exposure. Similar results were obtained by Reddy and Bhagyalakshmi (1994) for the crab *Scylla serrata* exposed to Cd since they showed a decrease in the activities of Krebs cycle enzymes, succinate and malate dehydrogenases. These results corroborate previous observations that mitochondria of Chinese crabs exposed to Cd lose their structural integrity, with a significant decrease of cytochrome c oxidase activity (Silvestre et al. in press b). Moreover, the present study reveals that a chronic - but not an acute - Cd exposure reduces anterior gills oxygen consumption.

Consequently, we propose that in response to mitochondrial disruption, crabs could down-regulate at least some of the enzymes achieving Krebs cycle and oxidative phosphorylation. This indicates a possible switch over of their metabolic profiles with the consequence of a slowing down of the oxidative metabolism. A possible stimulation of anaerobic metabolism under chronic exposure condition, as demonstrated by Reddy and Bhagyalakshmi (1994) for *Scylla serrata*, should be further investigated.

Down-regulation of one AK isoform could also be the result of mitochondrial disruption. This phosphagen kinase is widely distributed among invertebrates and is present in all arthropod species. It is homologous to creatine kinase of vertebrates and some invertebrates and functions in buffering the ATP supply during periods of high energy demand by regenerating depleted ATP supplies (Ellington, 2001). Another supposed role of AK is to function as an energy shuttle between mitochondria and the cytosol supplying the latter with ATP. If Cd actually disrupts mitochondria and decreases ATP synthesis via oxidative metabolism, we suggest that AK shuttle function could be consequently repressed.

All these observations suggest that the gill ATP/ADP balance is likely to be affected after a metal exposure of 30 days at $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ due to glycolysis and oxidative metabolism slowing down. Further studies, using techniques such as nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) (Viant et al., 2002), are now necessary to obtain a comprehensive view in cellular energetic changes during acclimation.

Increased protein degradation

Jungmann et al. (1993) have suggested that a significant part of Cd toxicity is due to the formation of abnormal proteins and that Cd resistance in yeast is mediated in part by ubiquitin-dependent proteolysis via the proteasome. Moreover, Grune et al. (1995) demonstrated that after an oxidative stress, mammalian cells overcome the potentially toxic accumulation of oxidatively modified proteins by increasing the rate of proteolysis of these proteins mainly by the proteasome complex. In anterior gills of Chinese crabs exposed to chronic Cd, we observe the over-expression of a proteasome complex subunit and of a cathepsin D (aspartic proteinase family) isoform. The up-regulation of these enzymes both involved in protein degradation, suggests that Cd exposure could generate abnormal proteins in anterior gills, perhaps via the generation of ROS. Hence, we propose that one acclimation mechanism to Cd could be an increased abnormal protein degradation potential.

Microtubule depolymerization

Cd is known to induce microtubule depolymerization by binding to the abundant sulfhydryl groups present on tubulin (Wallin et al., 1977; Li et al., 1993; Liliom et al., 2000). In the Chinese crab anterior gills, we observe the down-regulation of three alpha tubulin isoforms after chronic Cd exposure and of one of these isoforms after acute exposure, which could negatively affect the microtubule network. This finding corroborates microscopic observations revealing disorganisation of microtubules inside pilaster cells (the cells supporting gill epithelium) after an acute Cd exposure (Silvestre et al., in press b).

Calcium-binding protein repression

We observe the repression of a crustacean calcium-binding protein 23 (CCBP-23) in anterior gills of crabs exposed to acute Cd. This EF-hand Ca^{2+} -binding protein was first identified in abdominal muscle of the crayfish, *Orconectes limosus* by Sauter et al. (1995). Little is known on this protein but it probably plays a role in calcium signaling. Calcium and cadmium are known to be linked in physiological processes. Uptake as well as accumulation and toxicity of Cd depends on calcium concentration in the environment (Wright, 1977; Pärt et al., 1985). In this sense it would not be surprising that Cd could interfere with calcium signaling in exposed crab gill tissues.

Conclusion

For the first time, we report an overall view of the cellular response to waterborne Cd at the protein expression level in an aquatic organism with few genomic sequences available in databases. Unlike studies focusing on a limited number of expected and well-defined mechanisms (such as induction of metallothionein expression), the proteomic analysis developed here appears as a reliable and powerful tool to discover unsuspected mechanisms of toxicity and cellular processes occurring under stressful conditions in aquatic organisms. This study supports the assumption that waterborne Cd mainly exerts its toxicity in gills of crustaceans through oxidative stress induction and sulfhydryl-group binding. Moreover, organisms chronically exposed to a moderate level of a toxicant can develop an acclimation process that confers increased

resistance to this toxicant. Regardless of Cd binding to MTs, previous studies assumed that other mechanisms should contribute to increased resistance in aquatic organisms (Xie and Klerks, 2004; Silvestre et al., in press a). Our observations bring arguments in favour of the implication of disulfide bond protection, stimulation of the pentose phosphate pathway for the regeneration of the reducing agent NADPH, and enhancement of the cell antioxidant capacity and of the protein degradation potential. These results suggest that under chronic sublethal Cd exposure, Chinese crabs stimulate compensatory mechanisms allowing their survival in cadmium-polluted habitats. In addition, acclimation seems to involve important metabolic reshuffling, as indicated by the down-regulation of some metabolic enzymes. Accordingly, one major perspective is to investigate the cost of such a cellular stress response. Could the expression of a functional stress proteome (Kültz, 2003) confer increased resistance at the expense of other biological functions, such as reproduction?

Acknowledgements

We thank doctors G. Trausch and P. Kestemont for their scientific advices. We are very grateful to E. Delaive, C. Demazy and M. Albert for their technical expertise and assistance.

7.3. Notes complémentaires

Trois autres protéines non reprises dans la publication 5 ont été identifiées en utilisant la même méthodologie : excision du spot, digestion par la trypsine, microséquençage par *ESI Q-tof 2 MS/MS* et recherche dans des bases de données par homologie (MS BLAST). Ces trois protéines correspondent à des spots dont l'expression n'a pas été modifiée dans les branchies antérieures suite à une exposition au Cd (aiguë ou chronique).

Tableau 1. *E. sinensis*. Trois protéines supplémentaires identifiées à partir d'un gel d'électrophorèse 2D de branchies antérieures. Une exposition à 0,5 mg l⁻¹ Cd pendant 3 jours ou à 50 µg Cd l⁻¹ pendant 30 jours n'influence pas de manière significative leur niveau d'expression. MW, poids moléculaire ; pI, point isoélectrique.

Numéro de spot	Protéine	MW (kDa)	pI	Séquences
260	Protéine disulfure isomérase	66	4.6	SESGLTTFVGAK FVSANSLPLVVD VLVASNFDEVAFSK DVPKDEL EEELSLDEGVVLTK QAEELVNWLLK ATEDNEFILVEFYA
318	ATP synthase bêta	54	5.1	ILNVLGE AMDGTE TVLIMELINNVAK GSPLSLPVGGSL SLQDIILGM AELGIYPAVD FTQAGSEVSALLGR
451	Actine	52	5.4	SYELPDGQVITIGNER ELTALAPSTMK VAPEEHPVLLMVAPLNPK LCYVALDF TAASSSSLEK

Ces protéines sont présentées au tableau 1 et à la figure 1.

Nous pouvons observer que le spot numéro 451 correspond à l'actine. De manière intéressante, les deux autres protéines sont 2 isoformes de protéines identifiées dans la publication 5 et correspondent à une protéine disulfure isomérase et à une ATP synthase bêta. Cela indique que ces deux protéines possèdent des isoformes réagissant différemment à une exposition au Cd. Des études ultérieures permettront de comprendre les caractéristiques de ces isoformes afin d'expliquer leur sensibilité différente au Cd.

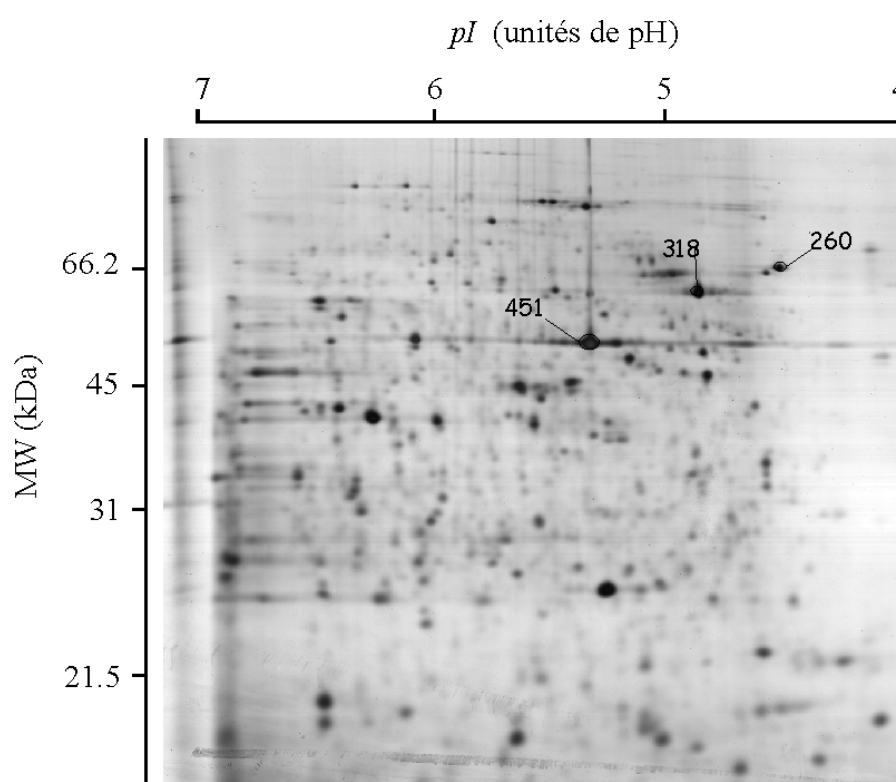


Fig. 1. *E. sinensis*. Gel d'électrophorèse 2D d'une branchie antérieure montrant l'emplacement de 3 protéines identifiées.

8. DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

8.1. Réponses à un stress environnemental induit par le Cd chez le crabe euryhalin *Eriocheir sinensis*

Le temps est maintenant venu de recadrer les résultats obtenus dans ce travail en fonction de l'objectif général et des objectifs spécifiques que l'on s'était fixés. Si des xénobiotiques comme le Cd, largement présents dans l'environnement, sont connus pour interagir avec les organismes vivants, nos connaissances de leurs modes d'action ainsi que des mécanismes mis en place aux niveaux physiologique, biochimique et moléculaire afin de contrer leurs effets, sont toutefois encore incomplètes. C'est principalement après une exposition de type chronique que le manque de données est le plus évident. Utilisant le crabe chinois comme modèle d'étude, nous l'avons soumis à différents types d'exposition au Cd afin d'analyser les réponses spécifiques à ce stress environnemental. Notre démarche a consisté à nous focaliser sur la fonction d'osmorégulation, y incluant une analyse poussée des branchies, organe d'échange avec le milieu. Une approche intégrant les réponses physiologiques, morphologiques, biochimiques et protéomiques, devait nous permettre de caractériser de la manière la plus complète possible, les changements biologiques prenant place chez un organisme aquatique soumis à une situation de stress environnemental due à la présence d'un xénobiotique.

Le Cd altère la capacité hyper-osmorégulatrice du crabe chinois

La première information importante que l'on puisse retirer de ce travail est **qu'une exposition aiguë au Cd peut provoquer une altération de la capacité hyper-osmorégulatrice du crabe chinois acclimaté à de l'eau douce**. Nous avons en effet observé que l'osmolalité de l'hémolymphe pouvait être fortement diminuée et atteindre des valeurs de 381 mOsm kg⁻¹ contre 558 mOsm kg⁻¹ chez des animaux non exposés. Cela traduit l'incapacité qu'a l'animal à maintenir un gradient d'osmolalité élevé entre l'hémolymphe et le milieu environnant.

Deux types de mécanismes peuvent être touchés et expliquer une chute de l'osmolalité. Premièrement, les mécanismes compensatoires permettent, en eau douce, de pomper activement des ions à partir du milieu environnant afin de compenser les pertes par diffusion et dans l'urine.

Plusieurs études, utilisant notamment la technique de perfusion de branchies, ont mis en évidence que seules les branchies postérieures d'*E. sinensis* pouvaient pomper activement des ions Na^+ et Cl^- (Péqueux et Gilles, 1981 ; Gilles et al., 1988). Une enzyme comme la Na^+/K^+ -ATPase (NKA), localisée dans la membrane baso-latérale de leurs cellules épithéliales, permet, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, de transporter le Na^+ du cytoplasme vers le compartiment contenant l'hémolymph, c'est-à-dire contre un gradient électro-chimique. **Nos résultats n'ont montré aucun effet du Cd sur les branchies postérieures.** Dans cet organe, l'activité de la NKA se maintient au même niveau que les organismes soient exposés ou non au Cd. De plus, l'absence de perturbation concernant l'activité de la cytochrome c oxydase (localisée dans la membrane interne des mitochondries) laisse présager que les mitochondries ne seraient pas endommagées par le métal. Les observations microscopiques n'ont quant à elles révélé aucune perturbation morphologique.

Tableau 1. Comparaison des concentrations moyennes en Cd dans les tissus de différentes espèces de crabes.

Espèce	Lieu de prélèvement	Salinité	Tissus	Concentration en Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$ de poids frais)	Référence
<i>Pseudocarcinus gigas</i>	Etat de Victoria (Australie)	Eau de mer	Muscles des pinces	0,05	(Turoczy et al., 2001)
			Muscles des pattes	0,43	
			Branchies	1,6	
			Hépatopancréas	5,6	
<i>Dorippe granulata</i>	Hong Kong	Eau de mer	Hémolymph ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	<0,1	(Depledge et al., 1993)
			Branchies	1,1	
			Cuticule	1,1	
			Hépatopancréas	2,1	
			Muscles	0,15	
<i>Cancer pagurus</i>	Côtes écossaises	Eau de mer	Hépatopancréas	6,4	(Falconer et al., 1986)
			Gonades	1,6	
			Branchies	0,78	
<i>Callinectes sapidus</i>	Estuaire de la rivière Quinnipiac (Connecticut, USA)	Estuaire	Muscles	0,05	(Jop et al., 1997)
			Hépatopancréas	1,18	
	Estuaire de la rivière Connecticut (Connecticut, USA)		Muscles	0,40	
			Hépatopancréas	0,93	

Pourtant, le Cd s'accumule dans les branchies postérieures. On y a en effet retrouvé une concentration moyenne avoisinant $14 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ p.f. après une exposition des animaux pendant 3 jours à $0,5 \text{ mg Cd l}^{-1}$, et atteignant $4,4 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ p.f. après une perfusion de 3 h. Cette accumulation est d'ailleurs importante si on la compare à ce qui est habituellement retrouvé chez des crabes prélevés dans leur environnement naturel (tableau 1) (Turoczy et al., 2001).

Cependant, aucun flux entrant de Cd n'a pu être mis en évidence en perfusant des branchies postérieures. Ce résultat suggère que le Cd serait séquestré dans ce type de branchie et ne pourrait atteindre d'éventuels transporteurs situés sur la membrane baso-latérale. Une première explication aurait pu être la séquestration du métal par les métallothionéines (MTs) des cellules épithéliales. Cependant, les concentrations en MTs sont faibles dans cet organe et ne sont théoriquement pas suffisantes pour séquestrer l'ensemble du Cd accumulé. Il faut donc chercher l'explication ailleurs. Nous avons avancé l'hypothèse que la cuticule pourrait empêcher le Cd d'atteindre les cellules épithéliales, ou tout au moins pourrait ralentir sa progression. En effet, la cuticule des branchies postérieures de crabes chinois est, par comparaison avec celle des branchies antérieures, moins perméable aux cations et notamment au Na^+ (Lignon, 1987). Même si, à notre connaissance, aucune donnée n'existe concernant la perméabilité au Cd^{2+} , nous suggérons que celui-ci passe difficilement la barrière cuticulaire de l'épithélium branchial de type transporteur d'ions. L'étude d'éventuels flux de Cd à travers l'épithélium de branchies postérieures auquel on aura préalablement retiré la cuticule, permettront vraisemblablement d'apporter une réponse définitive à cette question.

Une seconde possibilité pouvant expliquer une chute d'osmolalité de l'hémolymphe, serait que les mécanismes limitants puissent être touchés par le Cd. Ces mécanismes réduisent les flux dissipatifs d'eau et d'ions à travers les surfaces d'échange en contact avec le milieu extérieur. Ainsi, des espèces vivant en eau douce ont souvent une perméabilité tégumentaire à l'eau et aux ions inférieure par comparaison à des organismes vivant en eau salée (Kirschner, 1991).

Nos résultats montrent clairement que les branchies antérieures peuvent être affectées par le Cd. Nous avons en effet observé que l'activité de la NKA, ainsi que celle de la cytochrome c oxydase, pouvaient être fortement diminuées, et que l'ultrastructure de ces branchies était très endommagée. Ces effets occasionnés suite à une exposition aiguë peuvent être associés à l'accumulation élevée de Cd dans ces branchies rapportée

après 3 h de perfusion (moyenne maximale de $7,6 \mu\text{g g}^{-1}$ p.f.), et après une exposition des animaux dans de l'eau courante (moyenne maximale de $188 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ p.f.). De manière comparable à ce qui avait été déduit dans le cas des branchies postérieures, les MTs ne peuvent suffire à séquestrer la totalité du Cd accumulé. Ici aussi, le potentiel théorique de séquestration du Cd (CBP) est largement supérieur à 1, indiquant un excès de métal par rapport aux sites de fixation possibles. Toutefois, contrairement aux branchies postérieures, des flux entrants de Cd à travers des branchies antérieures perfusées ont été observés, ce qui signifie qu'une partie au moins du métal est libre et arrive en contact avec la membrane basolatérale. La cuticule ne jouerait donc pas ici un rôle de protection comparable à ce que nous avons suggéré pour les branchies postérieures, même si ceci n'exclut pas la possibilité qu'une partie du Cd puisse s'accumuler dans la cuticule, notamment suite à une compétition avec les ions Ca^{2+} . **En conséquence, nous pouvons affirmer qu'une partie du Cd au moins pénétrerait à l'intérieur de l'épithélium des branchies antérieures où il occasionnerait des dommages et d'où il passerait dans l'espace contenant l'hémolymphe.**

Les dommages occasionnés aux branchies antérieures nous poussent à croire que le Cd interférerait avec les mécanismes limitant les flux dissipatifs d'eau et d'ions. Nous suggérons que les altérations occasionnées aux branchies antérieures puissent leur avoir fait perdre leurs caractéristiques de perméabilité aux ions et notamment au Na^+ . En milieu hypotonique, cela se traduirait par une perte nette d'ions et un gain d'eau conduisant à une dilution de l'hémolymphe, comme cela fut observé dans ce travail. Afin de confirmer cette hypothèse, deux protocoles expérimentaux peuvent être proposés. Premièrement, la perméabilité apparente à l'eau (AWP) peut être évaluée sur des organismes exposés au Cd. Pour ce faire, les animaux peuvent être immergés dans de l'eau tritiée et la radioactivité être ensuite mesurée dans l'hémolymphe à différents intervalles de temps (Rainbow et Black, 2001). Deuxièmement, après avoir exposé des crabes au Cd, les branchies antérieures peuvent être perfusées afin d'évaluer les flux entrants et surtout sortants de Na^+ . La faisabilité de cette dernière expérience est toutefois à tester. Les branchies antérieures peuvent en effet devenir blanchâtres et turgescents suite à une exposition au Cd, ce qui rendrait difficile, voire impossible, une perfusion pendant plusieurs heures.

Voies de passage du Cd à travers l'épithélium des branchies antérieures

Nous avons montré de manière non équivoque que le Cd pouvait passer à travers les branchies antérieures du crabe chinois et ainsi se retrouver dans l'hémolymphe. Cependant, une grande incertitude plane encore sur les voies de passage du Cd à travers l'épithélium branchial. Il est considéré comme acquis que le Cd, tout comme le Zn, passe à travers les membranes sous sa forme ionique Cd^{2+} par l'intermédiaire de protéines transporteuses ou de canaux membranaires (Campbell, 1995). De plus, les ions Cd^{2+} et Ca^{2+} se ressemblent fortement. Leurs rayons ioniques sont proches (0,097 nm pour le Cd^{2+} contre 0,100 nm pour le Ca^{2+}), ils possèdent la même charge, et ont le même nombre d'électrons de valence. En conséquence, il a été montré que le Cd pouvait utiliser certaines voies de passage empruntées par le Ca afin de traverser les membranes biologiques,

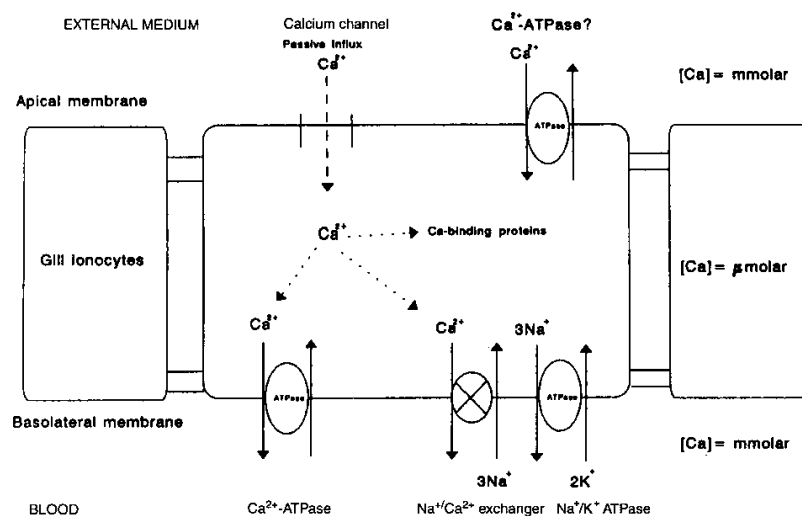


Fig. 1. Mécanismes pouvant intervenir dans le transport du calcium à travers une cellule épithéliale branchiale d'un crustacé (d'après Flick et al., 1994 ; Rainbow et Black, sous presse).

comme des canaux Ca, des échangeurs $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$, ou encore des Ca^{2+} -ATPases (Wright, 1977a; Pärt et al., 1985; Verbost et al., 1989; Bjerregaard et Depledge, 1994).

A partir de nos résultats, il n'a pas été possible de démontrer avec certitude quelles voies de passage le Cd empruntait pour passer à travers

l'épithélium des branchies antérieures. Toutefois, on observe que le flux entrant de Cd est largement dépendant du Ca, ce qui confirmerait l'utilisation de voies d'entrées communes. Des expériences préliminaires utilisant des inhibiteurs de transporteurs du Ca n'ont cependant pas donné de résultat significatif, même si une tendance à une diminution du flux entrant de Cd lorsqu'un inhibiteur potentiel de Ca^{2+} -ATPases fut introduit du côté IN permet de penser à l'implication de cette enzyme. Un autre indice va dans ce sens. Des branchies antérieures de crabes acclimatés à de l'eau salée présentent un flux entrant de Cd nettement diminué par rapport à des branchies provenant d'organismes acclimatés à de l'eau douce. L'explication pourrait être une diminution de l'activité de la Ca^{2+} -ATPase localisée du côté apical. En effet, en eau douce, le gradient électrochimique du Ca^{2+} entre l'eau et l'hémolymphe est beaucoup plus faible qu'en eau salée. D'une entrée utilisant essentiellement un transport passif à travers des canaux Ca pour des crabes d'eau de mer, le Ca entre de manière active grâce probablement à la Ca^{2+} -ATPase pour des crabes d'eau douce (Rainbow et Black, sous presse). Il pénétrerait ensuite dans l'espace de l'hémolymphe via de nouveau la Ca^{2+} -ATPase, ou via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Fig. 1.) (Flick et al., 1994 ; Rainbow et Black, sous presse). Une hypothèse plausible serait que l'activité de la Ca^{2+} -ATPase augmenterait en eau douce et que le Cd emprunterait préférentiellement cette voie d'entrée, expliquant de la sorte la forte augmentation de flux entrant pour des crabes acclimatés à de l'eau douce. Des études plus poussées devront cependant être réalisées afin de : (1) localiser avec certitude la Ca^{2+} -ATPase dans la membrane apicale des branchies antérieures du crabe chinois ; (2) caractériser une modulation de son activité en fonction de la salinité ; (3) vérifier si le Cd emprunte réellement cette voie.

Il nous semble cependant peu probable que la Ca^{2+} -ATPase soit la seule voie d'entrée du Cd. La dépendance du flux entrant de Cd vis-à-vis de la ddp indique qu'un transport passif, guidé par un gradient électrochimique, participerait également à l'entrée du Cd dans les branchies antérieures. De plus, la dépendance du flux vis-à-vis du Na^+ du côté IN rend également possible l'implication de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

En milieu naturel, le Cd ne pourrait affecter l'osmorégulation du crabe chinois que sous des conditions de très forte pollution

L'effet du Cd sur la capacité hyper-osmorégulatrice du crabe chinois, tel que nous l'observons dans ce travail, pourrait avoir des conséquences importantes si on se remémore le cycle de vie de cette espèce (voir chapitre

1.6.1) (Veldhuizen et Stanish, 1999). L'adulte vit en eau douce où il est hyper-osmorégulateur. Il migre toutefois en eau saumâtre ou en eau de mer afin de s'y reproduire. Les juvéniles entreprennent ensuite une migration anadrome pour se retrouver en milieu dulcicole. La présence de Cd dans l'eau douce pourrait, d'après nos résultats, affecter l'osmorégulation et donc s'avérer être préjudiciable non seulement pour la survie de l'adulte, mais également pour la migration des juvéniles. Toutefois, les effets du Cd sur la capacité hyper-osmorégulatrice ont été observés en exposant des crabes à une concentration de $500 \mu\text{g Cd l}^{-1}$. Cette concentration est très élevée en comparaison avec ce que l'on retrouve dans les rivières européennes puisque celle-ci se situe la plupart du temps entre 10 et 500 ng l^{-1} (Jensen et Bro-Rasmussen, 1992). De plus, une exposition pendant 30 jours à une concentration en Cd de 10 ou $50 \mu\text{g l}^{-1}$, n'a pas engendré les mêmes effets. Ces concentrations, si elles sont toujours supérieures aux valeurs habituellement rencontrées dans nos cours d'eau, sont néanmoins plausibles si nous les comparons à des rivières fortement polluées comme la *Molse Nete* en Flandres (Knapen et al., 2004) ou la *Reconquista River* en Argentine (Topalian et al., 1999). **Même si nous ne pouvons pas exclure une plus grande sensibilité des juvéniles, et si les paramètres physico-chimiques de l'eau utilisée dans ce travail sont différents de ceux des cours d'eau, nos résultats indiquent qu'il faudrait des conditions de pollution très importantes pour observer des effets du Cd sur la capacité hyper-osmorégulatrice du crabe chinois.**

Cette conclusion n'exclut toutefois pas la possibilité que le Cd puisse avoir des effets néfastes à des concentrations plus faibles sur d'autres fonctions physiologiques comme la respiration ou la reproduction. Cela sort toutefois du cadre de ce travail. Elle n'exclut pas non plus la possibilité qu'une exposition à une concentration plus faible puisse induire des effets comparables à ce qui fut observé dans ce travail si elle perdurait plus longtemps. Ce dernier point mériterait d'être approfondi même si, comme mentionné dans les objectifs (voir chapitre 2), il est pratiquement difficile de maintenir des crabes chinois en captivité pendant un laps de temps prolongé.

Pour des animaux acclimatés à de l'eau salée, la situation semble encore plus confortable. En plus de l'effet de spéciation du Cd qui implique que la forme biodisponible Cd^{2+} soit rare en eau salée car largement liée au Cl^- , nous avons montré que le flux entrant de Cd était très inférieur ($21 \times$) à travers des branchies antérieures de crabes acclimatés à de l'eau salée par rapport à des branchies provenant d'animaux acclimatés à de l'eau douce. Cet effet ne peut pas résulter d'une différence de spéciation du Cd car nous avons utilisé les mêmes milieux de perfusion. En conséquence, comme

discuté plus haut, l'acclimatation à de l'eau salée doit modifier certaines variables physiologiques dans les branchies antérieures, ayant comme résultat la diminution de l'entrée du Cd. En confirmation à cela, nous n'avons pas pu observer d'effet du Cd sur l'osmorégulation et sur les branchies lorsque les crabes étaient acclimatés à de l'eau salée. **Nous en concluons que des paramètres physico-chimiques et physiologiques s'associent afin d'expliquer les moindres disponibilité et toxicité du Cd en eau salée.**

Une exposition chronique au Cd peut induire un processus d'acclimatation

Nous avons montré dans ce travail qu'une exposition dite « chronique » pendant 30 jours à une concentration en Cd de 10 ou 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ n'induisait pas de modification de la capacité d'hyper-osmorégulation du crabe chinois. Toutefois, le fait de ne pas avoir observé d'effet délétère sur cette fonction physiologique ne signifie pas que le Cd n'induit aucune réponse biologique, notamment à un niveau d'intégration plus bas comme le niveau moléculaire. **De fait, des crabes soumis pendant 30 jours à une concentration de 50 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$, deviennent plus résistants à une exposition aiguë qui, sans acclimatation préalable, induirait des effets délétères sur l'osmorégulation.** Nous pouvons donc conclure qu'une telle exposition induit un processus d'acclimatation tel que défini dans son sens le plus restrictif par McDonald et Wood (1993) : « c'est une tolérance accrue à une concentration élevée, souvent létale, d'une substance toxique suite à une exposition chronique à une concentration sub-létale de cette même substance ».

La mise en évidence de l'existence d'un processus d'acclimatation suite à une exposition préalable à un xénobiotique n'est pas nouvelle. De semblables acclimations vis-à-vis du Cd ont déjà été rapportées pour des organismes aquatiques comme le poisson salmonidé *Oncorhynchus mykiss* (Pascoe et Beattie, 1979 ; Hollis et al., 1999 ; Chowdhury et al., 2004), les embryons de l'amphibien *Bufo arenarum* (Herkovits et Perez-Coll, 1995), le crustacé cladocère *Daphnia magna* (Bodar et al., 1990 ; Stuhlbacher et Maltby, 1992) et le crustacé amphipode *Gammarus pulex* (Stuhlbacher et al., 1992). **Toutefois, notre étude est la première, à notre connaissance, à mettre en évidence une acclimatation au Cd pour un crustacé décapode. C'est également la première à avoir observé une acclimatation vis-à-vis de la fonction d'osmorégulation.**

Nos résultats corroborent également l'hypothèse selon laquelle il existerait une fenêtre d'acclimation. En effet, la concentration à laquelle l'organisme est exposé est primordiale afin de provoquer un processus d'acclimation. McDonald et Wood (1993) ont ainsi défini l'existence d'une « **fenêtre d'acclimation** » pour des expositions à des métaux (Fig. 2.). En dessous d'un seuil, le stress n'est pas suffisamment élevé pour induire les mécanismes responsables de l'acclimation, bien que des effets morphologiques et physiologiques puissent être observés. Au-dessus de cette fenêtre, le seuil de sensibilisation définit une zone où les mécanismes de tolérance commencent à décliner et ne sont plus suffisants pour maintenir l'homéostasie. Au-delà d'un seuil de létalité, l'organisme finit par mourir. Ainsi, Taylor et al. (2000) ont observé une acclimation chez la truite après 30 jours de contamination par du Cu $60 \mu\text{g l}^{-1}$ mais n'ont rien observé avec $20 \mu\text{g l}^{-1}$. Chez le crapaud *Bufo arenarum*, le taux de survie des embryons soumis à un stress létal au Cd augmente lorsqu'un pré-traitement Zn/Cd augmente en concentration, jusqu'à atteindre un plateau et ensuite décroître (Herkovits et Perez-Coll, 1995). Pascoe et Beattie (1979) expliquent qu'à des concentrations très élevées en xénobiotiques, des dommages aigus infligés aux tissus empêchent les mécanismes de détoxification, aussi puissants soient-ils, de compenser les effets néfastes.

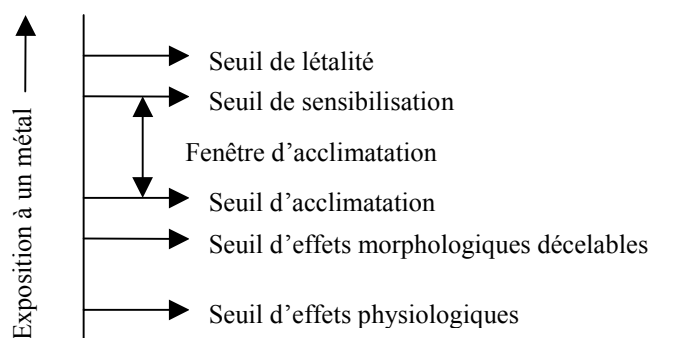


Fig. 2. Modèle général de l'acclimation à un métal (d'après McDonald et Wood, 1993).

Concernant l'hyper-osmorégulation du crabe chinois, **le seuil d'acclimation au Cd semble se trouver, dans nos conditions expérimentales, entre 10 et $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ pour une exposition de 30 jours.** Nous avons en effet observé qu'une exposition aiguë provoquait une

réduction de la capacité hyper-osmorégulatrice si les animaux avaient été précédemment exposés à 10 plutôt qu'à 50 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$, traduisant une non-acclimatation. Suite à cette exposition, l'accumulation moyenne de Cd dans les branchies antérieures est de 27 $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ p.f. alors qu'elle atteint 111 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.f. après une exposition à 50 $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ p.f. Par conséquent, le Cd ne pourrait pas induire la mise en place des processus d'acclimatation dans les branchies antérieures suite à une exposition à 10 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ car il serait accumulé en trop faible quantité. Le seuil d'acclimatation pour cet organe correspondrait donc à une accumulation comprise entre 27 et 111 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.f. Toutefois, cette concentration à l'intérieur de l'organe doit être atteinte graduellement pour induire la mise en place des mécanismes d'acclimatation puisqu'une exposition aiguë seule induit une accumulation comparable mais ne provoque pas d'acclimatation.

De plus, il est hautement probable que les caractéristiques physico-chimiques de l'eau modifient cette fenêtre d'acclimatation. Les scientifiques développent pour le moment un modèle appelé « *Biotic Ligand Model (BLM)* » qui tente de corréler la spéciation et la concentration du métal avec ses effets toxiques (Bell et al., 2002 ; Paquin et al., 2002) afin d'aider à la décision les gestionnaires et décideurs politiques. Celui-ci nécessite l'intégration dans un modèle mathématique d'un maximum de données concernant la qualité physico-chimique de l'eau comme les concentrations en Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , OH^- , HCO_3^- et en matière organique. Il nous semble que l'intégration de données concernant l'acclimatation (et non plus seulement la toxicité) dans un tel modèle permettrait d'obtenir une vision plus précise des impacts que les pollutions engendrent sur les organismes vivants. Pour le moment, ce modèle concerne essentiellement la toxicité aiguë mais son extrapolation à des expositions chroniques semble nécessaire afin d'aider les décideurs à prendre des mesures en adéquation avec les effets potentiels que peuvent produire les xénobiotiques métalliques.

Dans notre modèle expérimental, il apparaît qu'une exposition chronique au Cd, même si elle n'affecte pas une fonction physiologique essentielle comme l'osmorégulation, peut tout de même engendrer des modifications biologiques. **Ainsi, des populations naturelles de crabes chinois exposées à des concentrations en Cd plausibles pour des rivières fortement polluées, pourraient mettre en place des systèmes de défense contre le xénobiotique.**

Mécanismes d'acclimatation mis en place pendant une exposition chronique au Cd

Après avoir montré qu'une exposition de 30 jours au Cd pouvait induire un processus d'acclimatation de la fonction d'osmorégulation chez le crabe chinois, la plus grande originalité de notre travail réside dans la mise en évidence de mécanismes mis en place pendant une telle acclimatation et expliquant une résistance accrue.

Il est hautement probable que des mécanismes d'acclimatation par rapport au Cd prennent place dans les branchies antérieures du crabe chinois. En effet, dans ce type d'organe, une exposition chronique préalable peut réduire les effets d'une exposition aiguë sur la morphologie branchiale et sur l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase. Ces branchies garderaient alors des propriétés de perméabilité à un niveau suffisant pour que l'animal puisse maintenir l'osmolalité de l'hémolymphe largement supérieure à celle de l'eau. Nous avons donc décidé de nous focaliser principalement sur les mécanismes d'acclimatation qui pourraient être mis en place dans cet organe. Toutefois, il est important de se rendre compte que les branchies ne sont pas devenues complètement insensibles au Cd. Par exemple, des dommages aux mitochondries semblent toujours être occasionnés, ce qui peut être mis en relation avec une diminution de l'activité de la cytochrome c oxydase. Ces observations confortent l'idée que les mitochondries sont des cibles privilégiées du Cd (Bubel, 1976 ; Papathanassiou et King, 1983).

Plusieurs types de mécanismes peuvent expliquer une acclimatation à un métal (d'après Calow, 1991 ; McDonald et Wood, 1993) : l'exclusion du polluant (ex : mucus sécrété par les poissons), la diminution de l'entrée du polluant, l'augmentation de l'excrétion du polluant, la détoxification et/ou le stockage du polluant, les mécanismes compensatoires (protection et/ou réparation des structures/fonctions touchées,...). Ces différents mécanismes sont passés en revue ci-dessous pour le crabe chinois.

Même si nous n'avons pas de données directement en relation avec l'exclusion, l'entrée et l'excrétion du Cd, nous pouvons considérer que les concentrations en Cd mesurées dans les différents organes et tissus intègrent ces trois paramètres. Nous sommes cependant conscients qu'il s'agit ici d'une approximation et que des études portant directement sur ces paramètres sont nécessaires. Il ressort ainsi de nos résultats que les branchies antérieures accumulent un niveau comparable de Cd après une exposition aiguë, quelle que soit l'exposition chronique préalable. Tout comme pour les branchies antérieures, aucun autre organe ou tissu (branchies postérieures, hépatopancréas, muscles, carapace, hémolymphe)

ne montre une accumulation de Cd qui serait diminuée chez des organismes rendus plus résistants. **Il doit donc exister d'autres mécanismes d'acclimatation que ceux qui auraient pour effet de restreindre l'accumulation du métal.** Des conclusions comparables avaient déjà été tirées pour d'autres organismes et d'autres métaux (Dixon et Sprague, 1981 ; Donker et Bogert, 1991). Elles ne peuvent toutefois pas être généralisées à toutes les espèces (Posthuma et Van Straalen, 1993).

La situation observée dans l'hépatopancréas du crabe chinois est cependant un peu particulière. Dans cet organe, la concentration moyenne en Cd après une exposition aiguë est significativement supérieure pour des crabes ayant subi une exposition préalable à $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ par rapport à des animaux non-acclimatés. **Nous suggérons, comme mécanisme d'acclimatation, l'augmentation du stockage du Cd dans l'hépatopancréas, organe de détoxification pour un grand nombre de substances.**

La question qui vient à l'esprit maintenant est de savoir si le Cd accumulé dans les différents organes, et notamment dans les branchies antérieures et dans l'hépatopancréas, peut être détoxiqué en étant séquestré sous une forme non-toxique. Dans cet ordre d'idées, plusieurs études ont observé une corrélation entre une résistance accrue au Cd chez différents organismes et une teneur accrue en métallothionéines (MTs) (Stuhlbacher et Maltby, 1992; Stuhlbacher et al., 1992 ; Sterenborg et Roelofs, 2003). Les MTs sont des protéines riches en groupements sulfures qui permettent d'emprisonner certains métaux (Riordan et Vallee, 1991; Roesijadi, 1992; Klaassen et al., 1999). Ils sont de la sorte rendus biologiquement inactifs. Ainsi, si la teneur en MTs d'un organe croît, sa capacité à accumuler une plus grande quantité de Cd sans qu'il y ait de dommages occasionnés à la cellule croît également. L'évaluation des teneurs en MTs est donc une étape indispensable à la compréhension des mécanismes d'acclimatation vis-à-vis d'un polluant comme le Cd.

Chez le crabe chinois, les MTs sont surtout présentes dans l'hépatopancréas bien que des teneurs élevées aient également été rapportées dans les branchies antérieures. Il est intéressant de remarquer à ce stade qu'à un niveau basal, les MTs sont présentes en plus grande quantité dans les branchies antérieures ($42 \mu\text{g g}^{-1}$ p.f.) que dans les branchies postérieures ($< 2,3 \mu\text{g g}^{-1}$ p.f.). Par contre, le potentiel théorique d'accumulation du Cd est, en l'absence d'exposition à celui-ci, largement inférieur à l'unité pour ces deux organes, ce qui suggère que le Cd pourrait être entièrement pris en charge par les MTs. Il ne faut cependant pas oublier que ces protéines ont également un rôle à jouer dans l'homéostasie des métaux essentiels comme le Zn et le Cu. C'est notamment le cas chez

les crustacés pour lesquels ce métal joue un rôle essentiel dans le pigment respiratoire : l'hémocyanine. Ainsi, Brouwer et al. (2002) suggèrent que la transcription d'un gène codant pour une MT spécifiquement induite par le Cu chez le crabe bleu *Callinectes sapidus*, est étroitement impliquée dans l'homéostasie du Cu associée à la synthèse et la dégradation de l'hémocyanine. De plus, les MTs sont directement impliquées dans le cycle de mue du crabe bleu. En effet, avant de muer, ces animaux ne se nourrissent plus et utilisent l'hémocyanine comme réserve énergétique. Il en résulte un largage important de Cu. Après la mue, ils doivent restaurer une grande quantité d'hémocyanine, ce qui demande une grande quantité de Cu. Les MTs sont étroitement associées à ce mécanisme puisqu'elles servent de réserve en Cu au moment de la mue. Après celle-ci, elles permettent à l'hémocyanine d'être resynthétisée en lui fournissant directement ce métal (Engel et Brouwer, 1987; 1991).

Afin d'obtenir une vision plus complète du degré de saturation des MTs, il faudrait donc également obtenir des valeurs d'accumulation pour le Zn et le Cu. Au vu de la différence de teneur basale en MTs entre les deux types de branchies du crabe chinois, on pourrait se demander si la régulation de ces deux métaux est différente et s'ils pénètrent, tout comme le Cd, plus facilement à travers l'épithélium dit « respiratoire » qu'à travers l'épithélium dit « osmorégulateur ».

Il ressort également de nos résultats que le rôle joué par les MTs pendant une exposition au Cd est tout à fait différent selon qu'elles seraient présentes dans les branchies antérieures ou dans l'hépatopancréas. En effet, des crabes exposés pendant 30 jours à 50 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ possèdent une quantité accrue en MTs dans l'hépatopancréas, et celle-ci reste stable après une exposition aiguë consécutive. Par contre, une exposition aiguë seule ne provoque pas d'augmentation significative de la teneur en MTs. Dans cet organe, quelle que soit la condition expérimentale, le potentiel théorique de séquestration du Cd est largement inférieur à l'unité ou tout juste supérieur (CA50). **Nous suggérons par conséquent que le crabe chinois acquiert, pendant le processus d'acclimatation, la capacité d'accumuler davantage de Cd dans l'hépatopancréas grâce, en partie du moins, à une plus forte teneur en MTs.**

Par contre, la teneur en MTs dans les branchies antérieures est la plus élevée pour des organismes ayant subi une exposition aiguë sans acclimatation préalable. **Nous proposons que l'induction de MTs dans les branchies antérieures soit une réponse rapide à une exposition aiguë au Cd.** La majorité des MTs présentent un polymorphisme génétique, et deux formes principales (MT-1 et MT-2), codées par des

gènes non alléliques, sont généralement présentes. Des différences fonctionnelles ont été suggérées entre les isoformes de MTs existantes, sur base d'observations ayant montré différents modes d'expression en fonction du tissu et en fonction du métal concerné. Ainsi, des isoformes induites par le Cu et d'autres par le Cd et le Zn ont été mises en évidence chez le crabe bleu *Callinectes sapidus* et chez le crabe vert *Carcinus maenas* (Pedersen et al., 1998 ; Syring et al., 2000). De plus, Brouwer et al. (1995) ont montré qu'une isoforme MT-I était présente dans l'hépatopancréas du crabe bleu alors qu'elle était absente des branchies. En conséquence, nous proposons de rechercher d'éventuelles isoformes différentes dans l'hépatopancréas et les branchies antérieures d'*E. sinensis*, isoformes qui réagiraient différemment à une exposition au Cd.

En outre, le potentiel de séquestration du Cd dans les branchies antérieures est largement dépassé dans toutes les conditions testées. **Si on tient compte du fait que les MTs peuvent également séquestrer le Zn et le Cu, il est évident qu'elles ne sont pas suffisantes dans les branchies antérieures pour assurer une meilleure résistance au Cd. D'autres mécanismes prenant place dans cet organe pendant une exposition chronique doivent donc permettre à la branchie de résister à une forte accumulation du Cd.**

Xie et Klerks (2004b) étaient arrivés à une conclusion similaire en étudiant le poisson moustique *Heterandria formosa*. Pour une accumulation tissulaire en Cd égale à $45 \mu\text{g g}^{-1}$ de poids frais, correspondant à une concentration létale, et dans l'hypothèse où les MTs étaient complètement saturées par le métal (en comptant 1 molécule de MT séquestrant 7 atomes de Cd), ces protéines ne pouvaient séquestrer qu'un maximum de 26,5% du Cd. Ce chiffre signifie que la majorité du Cd accumulé dans le poisson moustique n'était pas séquestré par les MTs et donc que l'induction de MTs n'était pas seule responsable de la résistance accrue observée chez cette espèce. Cette valeur est pourtant supérieure à ce que nous avons observé dans les branchies antérieures du crabe chinois. Ainsi, si on prend la condition C50, la branchie a accumulé $111 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ p.f. et possède $55 \mu\text{g MTLPS g}^{-1}$ p.f. En supposant que le poids moléculaire des MTs est pour cette espèce de 6130 Da (<http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q95U92>) et qu'une molécule de MT séquestre au maximum 6 atomes de Cd (Roesijadi, 1992), nous avons calculé qu'un maximum de 5,5% du Cd accumulé dans les branchies antérieures pourrait être séquestré par des MTs !

Même si d'autres mécanismes de séquestration du Cd ne sont pas à exclure et nécessiteraient de nouvelles études, comme son stockage dans des granules riches en soufre présents dans les lysosomes (Lauverjat et al.,

1989 ; Klerks et Bartholomew, 1991a), il est probable que des mécanismes compensatoires se soient mis en place pendant une acclimatation.

Mécanismes compensatoires conférant une résistance accrue au Cd

Nous allons à présent discuter de la mise en place probable de mécanismes compensatoires dans les branchies antérieures de crabes chinois pendant une acclimatation au Cd. Ces mécanismes vont pouvoir réparer les dégâts occasionnés par le Cd ou vont pouvoir protéger les cibles visées par ce métal.

Le premier mécanisme étudié est l'induction de protéines de stress HSP70. Celles-ci sont des chaperones moléculaires. Elles se fixent sur des protéines et leur permettent de garder ou de recouvrer une structure tridimensionnelle compatible avec une activité biologique correcte. A ce titre, elles sont souvent utilisées comme biomarqueurs d'un stress qui provoque une dénaturation des protéines, comme la température ou l'exposition à des polluants (Sanders, 1993 ; Feder et Hofmann, 1999). Chez le crabe chinois, comme ce fut déjà montré chez d'autres espèces (Kohler et al., 1996 ; Bradley et al., 1998 ; Radlowska et Pempkowiak, 2002), nous avons observé une sur-expression de cette protéine dans les branchies antérieures d'organismes exposés au Cd. **Ce résultat indique que le Cd aurait un effet dénaturant sur certaines protéines des branchies. Toutefois, l'induction de HSP70 étant du même ordre de grandeur après une exposition aiguë seule ou après une acclimatation, nous pouvons penser qu'elle n'est pas suffisante à elle seule pour conférer une résistance accrue au Cd.**

Les mécanismes cellulaires induisant la sur-expression de la HSP70 sont, dans les grandes lignes, connus. Dans les cellules eucaryotes, l'expression de la HSP70 est régulée au niveau transcriptionnel. L'activation de la transcription des gènes hsp requiert l'activation et la translocation dans le noyau d'un facteur de transcription appelé HSF (*Heat Shock Factor*) (pour revue, voir Morimoto et al., 1992 ; Santoro, 2000) (Fig. 3.). Celui-ci se fixe sur des séquences spécifiques d'ADN appelées HSE (*Heat Shock Element*) et situées dans les zones promotrices des gènes hsp. Plusieurs HSF ont été clonés chez les vertébrés (HSF1, HSF2, HSF3 et HSF4) mais c'est principalement le HSF1 qui est responsable de l'activation des gènes hsp lors de la réponse au stress. Chez la levure et la drosophile, un seul HSF a été caractérisé et correspond au HSF1 des

vertébrés. En l'absence de stress, le HSF est présent sous forme monomérique lié aux HSPs dans le cytoplasme. L'activation du HSF dépend de l'apparition de protéines dénaturées qui requièrent des chaperones. Lorsque ces dernières se lient aux protéines endommagées, les

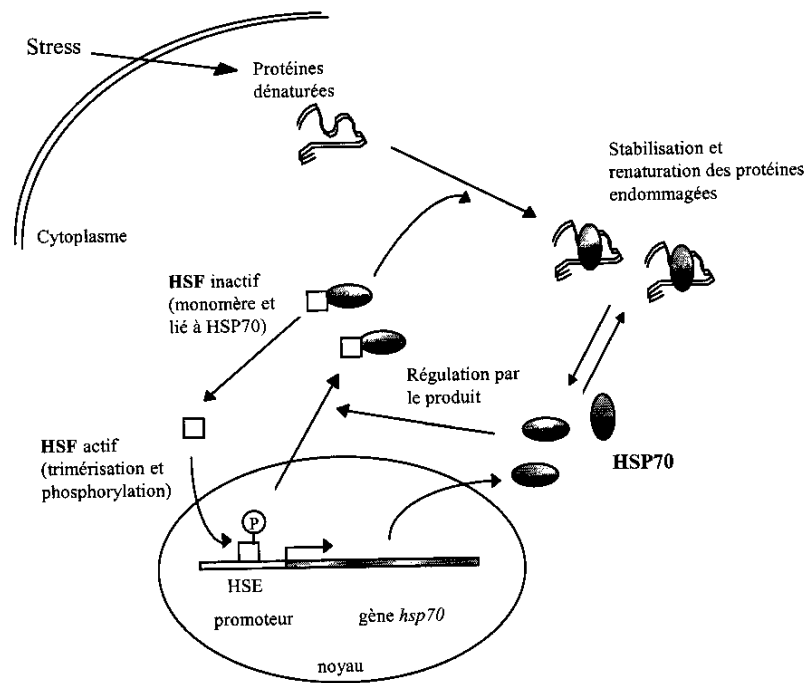


Fig. 3. Régulation de l'activation transcriptionnelle des gènes hsp : interactions entre la présence de protéines dénaturées et l'état d'équilibre du complexe HSP70-HSF (d'après Morimoto et al., 1992 ; Ait-Aissa, 2000 ; Santoro, 2000).

monomères de HSF s'en séparent et migrent dans le noyau. Là-bas, ils s'oligomérisent sous forme de trimère, sont phosphorylés sur des résidus sérine et se fixent sur les HSE, activant la transcription des gènes. Lorsque la quantité de HSPs synthétisée est suffisante pour se lier à toutes les protéines dénaturées, des HSPs rentrent dans le noyau, se fixent sur les HSF, inhibent ainsi la transcription et dissocient les trimères qui retrouvent alors leur état monomérique inactif. Il est donc probable que, dans nos conditions expérimentales, le Cd induirait la dénaturation de certaines protéines cytosoliques, elles-mêmes étant alors le signal déclenchant la synthèse de nouvelles HSP70.

D'un autre côté, l'analyse protéomique a permis de mettre en évidence d'autres mécanismes compensatoires qu'il aurait été difficile d'identifier par une méthode travaillant avec *a priori*. Ainsi, **le Cd semble exercer ses effets délétères sur les branchies antérieures en induisant un stress oxydant et en se fixant (oxydation) sur les groupements sulfures des protéines.** Ce type d'action du Cd a déjà été mis en évidence grâce à l'approche protéomique sur des organismes modèles comme la levure (Vido et al., 2001 ; Bae et Chen, 2004). C'est cependant la première fois qu'il est suggéré chez un crustacé et dans un contexte écotoxicologique.

En réponse à une exposition chronique au Cd, des enzymes anti-oxydantes, comme la glutathion S-transférase (GST) et la thiorédoxine peroxydase (TPx), sont sur-exprimées dans les branchies antérieures et sont probablement en partie responsables d'une résistance accrue vis-à-vis de ce métal. Le stress oxydant est largement étudié dans différents modèles biologiques suite à une exposition à des agents stressants. Ainsi, il y a de plus en plus d'études montrant que le Cd exerce sa toxicité au niveau cellulaire en partie en induisant la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), pouvant provoquer une peroxydation lipidique, des dommages à l'ADN ou encore une oxydation des protéines (Stohs et Bagchi, 1995 ; Risso-de Faverney et al., 2001). Il n'est donc pas étonnant que les branchies antérieures tentent de se protéger contre un stress oxydant lorsqu'elles sont exposées à du Cd. Il serait toutefois surprenant que la GST et la TPx soient les deux seules enzymes à être sur-exprimées lors d'une acclimation au Cd. D'autres enzymes antioxydantes, comme les superoxyde dismutases, les catalases, les glutathion réductase et

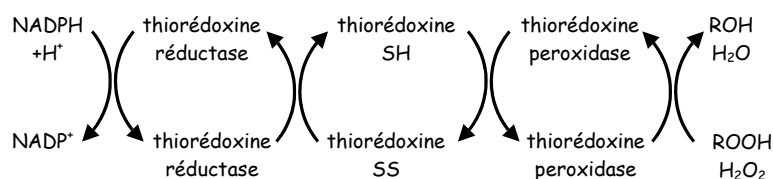


Fig. 4. Schéma du système thiorédoxine/thiorédoxine réductase couplé à la thiorédoxine peroxydase (d'après Mustacich et Powis, 2000). Ce système permet de réduire des groupements peroxydes produits dans les cellules soumises à un stress oxydant. Le NADPH est le réducteur final de la chaîne.

peroxydase, sont à rechercher spécifiquement et permettront d'obtenir une vision plus complète des défenses anti-oxydantes mises en place dans les branchies de crabes exposés à du Cd. Une attention particulière pourrait également être portée sur le rôle joué par le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase (Fig. 4.) (Mustacich et Powis, 2000). Ce système, couplé à la TPx, fonctionne en parallèle au système glutathion/glutathion réductase afin de maintenir constant le potentiel redox des cellules. Il est toutefois beaucoup moins connu que ce dernier. La sur-expression observée de la TPx suggère cependant qu'il soit impliqué dans la protection des branchies antérieures de crabes chinois.

Un autre résultat obtenu grâce à l'analyse protéomique et allant dans le sens d'une acclimatation vis-à-vis d'un stress oxydant, est la sous-expression d'enzymes impliquées dans différentes voies métaboliques. C'est spécialement le cas pour deux isoformes de la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), l'enzyme clé régulant la glycolyse. **Un détournement d'équivalents glucose de la glycolyse vers la voie des pentoses phosphates concourrait à produire davantage d'équivalents réducteurs sous la forme de NADPH** (Ravichandran et al., 1994 ; Godon et al., 1998 ; Shanmuganathan et al., 2004). En effet, ce dernier intervient en tant que donneur final d'électrons dans les systèmes thiorédoxine/thiorédoxine réductase et glutathion/glutathion réductase. Toutefois, un dosage de l'activité de certaines enzymes directement impliquées dans la voie des pentoses phosphates (ex : la glucose 6-phosphate déshydrogénase) est nécessaire avant de confirmer cette hypothèse.

Les sous-expressions d'une isoforme de la malate déshydrogénase (cycle de Krebs) et d'une ATP synthase bêta (phosphorylation oxydative) pourraient quant à elles indiquer une **diminution du métabolisme oxydatif prenant part dans les mitochondries**. Ce résultat est renforcé par l'observation que nous avons faite montrant une diminution de la consommation d'oxygène par les branchies antérieures après une acclimatation au Cd. Une fois encore, ces résultats vont dans le sens d'une importante altération des mitochondries par le Cd. **Il est par conséquent hautement probable que l'équilibre énergétique des cellules des branchies antérieures soit affecté par une exposition chronique au Cd**. Afin de caractériser cet équilibre, et notamment la balance ATP/ADP, des études utilisant la spectrométrie à résonance magnétique nucléaire (RMN) pourraient être envisagées (Viant et al., 2002).

L'induction d'une isoforme de la protéine disulfure isomérase (PDI) dans les branchies antérieures de crabes exposés pendant 30 jours à du Cd $50 \mu\text{g l}^{-1}$ est également un résultat marquant. Cette protéine est présente

dans le réticulum endoplasmique et est connue pour catalyser la formation, la réduction et l'isomérisation de ponts disulfures entre les résidus cystéines appropriés (Laboissière et al., 1995 ; Frand et al., 2000 ; Freedman et al., 2002). Elle agit également en tant que chaperone moléculaire en se fixant aux protéines, protégeant les ponts disulfures et augmentant de la sorte le taux de protéines correctement repliées (Noiva et al., 1993). A notre connaissance, notre travail est le premier à révéler la sur-expression de cette protéine en réponse à une exposition à du Cd. Cette sur-expression est très nette sur les gels d'électrophorèse en 2 dimensions puisqu'un facteur d'induction de 4,9 a été calculé. **En conséquence, nous proposons que la sur-expression de la PDI dans les branchies antérieures du crabe chinois intervienne pour permettre une meilleure protection des liaisons disulfures des protéines contre une oxydation qui pourrait être induite par le Cd.**

Nous ne pouvons cependant pas affirmer que la PDI seule suffise à protéger tous les ponts disulfures susceptibles d'être oxydés par le Cd. En effet, nous avons observé aussi bien après une exposition aiguë que chronique, la sous-expression de différentes isoformes de l'alpha tubuline. Le Cd étant connu pour induire la dépolymérisation des microtubules en se fixant sur les nombreux groupements sulfures présents sur la tubuline (Wallin et al., 1977 ; Li et al., 1993 ; Liliom et al., 2000), il est probable que la PDI ne puisse protéger suffisamment la tubuline. Une explication serait la localisation de la PDI dans le réticulum endoplasmique granuleux, ce qui l'empêcherait de protéger la tubuline située dans le cytoplasme. Dans ce cas, la PDI protégerait alors uniquement les protéines en formation dans le réticulum endoplasmique, c'est-à-dire celles destinées à être exportées hors de la cellule ou à être incorporées dans les membranes. Enfin, il est important de rappeler qu'une autre isoforme de la PDI a été identifiée sur des gels 2D dont l'expression n'est pas modifiée suite à une exposition au Cd. Ce résultat ouvre la voie à une recherche visant à caractériser ces deux isoformes et à comprendre pourquoi l'une serait induite par le Cd et l'autre pas.

Pendant une acclimatation au Cd, la capacité de dégradation des protéines dans les branchies antérieures semble augmenter puisque l'on observe la sur-expression de la cathepsine D et d'une sous-unité du protéasome. Ce dernier est un complexe protéique formé de plusieurs sous-unités se trouvant dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (Kopp et al., 1995). C'est le principal lieu de dégradation des protéines anormales. La cathepsine D est quant à elle une protéase aspartique localisée dans les lysosomes. Nous avons donc observé la sur-expression de deux protéines appartenant aux deux principaux systèmes cellulaires impliqués dans la

dégradation des protéines. Ce résultat, s'il se vérifie, pourrait s'expliquer aisément. En effet, aussi bien l'induction de ROS que la liaison du Cd aux ponts disulfures, peuvent engendrer une dénaturation des protéines. Celles-ci rendues non fonctionnelles pourraient être toxiques si elles s'accumulaient dans les cellules (Jungmann et al., 1993). L'augmentation du potentiel de dégradation protéique dans des branchies provenant de crabes acclimatés au Cd permettrait alors d'éviter cette toxicité. Ces résultats s'accordent donc avec nos observations montrant qu'une exposition au Cd induit une sur-expression de la HSP70, ce qui indique une dénaturation des protéines. Toutefois, la prudence s'impose car nous avons seulement observé la sur-expression de deux enzymes protéolytiques alors que les cellules en contiennent beaucoup d'autres. Ici aussi, des études ultérieures devront confirmer cette augmentation éventuelle du potentiel protéolytique.

La réponse « UPR » comme voie de signalisation d'un stress provoqué par le Cd

A ce stade de la discussion, les résultats obtenus grâce à l'analyse protéomique nous ont renseigné sur le niveau d'expression de protéines, alors classées selon des critères fonctionnels, ce qui permet de dégager de possibles voies d'action du Cd et de mettre en évidence des réponses conférant une résistance accrue. Une analyse plus poussée pourrait cependant permettre d'aller plus loin afin de décrypter les mécanismes cellulaires impliqués dans ces réponses. Nous pouvons ainsi nous poser la question de savoir quels senseurs moléculaires permettent à la cellule de réagir face à un stress oxydant ou face à une dénaturation des protéines. Nous pouvons également nous demander quelles voies de transduction du signal permettent à certains gènes d'être transcrits et ainsi à certaines protéines d'être sur-exprimées.

La réponse UPR (*Unfolded Protein Response*) a été décrite chez la levure et chez des eucaryotes supérieurs tels que le ver nématode *Caenorhabditis elegans* et différentes cellules de mammifères (Garlatti et Barouki, 2002 ; Lee et al., 2003 ; Rutkowski et Kaufman, 2004). Elle est à ce jour l'une des voies de réponse cellulaire les mieux comprises suite à un stress. Cette réponse est induite lorsque la quantité de protéines dénaturées ou de conformation anormale augmente dans le réticulum endoplasmique (RE), ce qui accroît leur risque d'agrégation.

Au cours de leur synthèse, à la fois les protéines membranaires et les protéines destinées à être sécrétées sont dirigées vers le RE. Là, elles interagissent avec des protéines chaperones comme la PDI, la BiP/Grp78, ou encore la Grp94, ce qui leur permet d'atteindre la bonne conformation tridimensionnelle. C'est également dans cet organite que les différentes sous-unités peuvent être assemblées. Ce passage dans le RE est nécessaire afin que ces protéines puissent être correctement acheminées vers leur destination et puissent être fonctionnelles.

Dans les branchies antérieures du crabe chinois exposé pendant 30 jours à du Cd $50 \mu\text{g l}^{-1}$, nous avons observé la sur-expression d'une PDI. Or, cette chaperone localisée dans le RE est connue pour être sur-exprimée suite à l'UPR chez le champignon *Trichoderma reesei* (Saloheimo et al., 1999). Nous pouvons par conséquent suggérer que le Cd pourrait, via une oxydation des ponts disulfures de protéines présentes dans le RE, induire une réponse de type UPR et ainsi entraîner la sur-expression de la PDI. A notre connaissance, aucune étude n'a, à ce jour, démontré une réponse UPR suite à une exposition au Cd. Rares sont également les études montrant une sur-expression de protéines chaperones du RE, et aucune ne concerne la PDI. Seule la sur-expression de la Grp94 a été observée dans des thyrocytes de rats exposés au Cd (Kwon et al., 1999).

Si on regarde plus en détail la réponse UPR chez les eucaryotes supérieurs, les caractéristiques suivantes apparaissent (Fig. 5.). Trois protéines transmembranaires localisées dans le RE sont essentielles à la transduction du signal. Il s'agit de l'IRE1 (*Inositol-Requiring Enzyme 1*), de l'ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*) et de la PERK (*double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase*). En condition normale, toutes trois sont liées à la chaperone appelée BiP du côté de la lumière du RE. Par contre, lorsque la quantité de protéines de conformation anormale y augmente, les BiP s'y fixent préférentiellement, libérant de la sorte les 3 senseurs. Les IRE1 et les PERK vont alors s'oligomériser et former des dimères, tandis que l'ATF6 va rejoindre l'appareil de Golgi. Ces processus déclenchent la voie de transduction du signal. Ainsi, l'IRE1 va s'autophosphoryler, ce qui a comme conséquence l'activation de sa fonction d'endoribonucléase. Celle-ci se met alors à exciser un intron des ARNm du facteur de transcription dénommé XBP-1. Cet épissage est nécessaire afin de traduire l'ARNm en XBP-1. Cette dernière peut ensuite rejoindre le noyau pour se fixer sur des séquences cibles des régions régulatrices des gènes codant notamment pour des chaperones et des protéases, et ainsi permettre la transcription de ces gènes. Quant à l'ATF6, elle est clivée dans l'appareil de Golgi par des protéases (S1P et S2P). Sa partie N-terminale est alors libérée et peut se rendre dans le noyau pour y

induire la transcription de certains gènes. Enfin, la PERK va phosphoryler le facteur d'initiation eucaryotique 2 α (eIF2 α) qui atténue globalement le processus de traduction.

Ainsi, la réponse UPR a pour conséquence l'induction de la transcription de certains gènes et le ralentissement de la synthèse des protéines. La plupart des gènes transcrits codent pour des protéines appartenant à la famille des chaperones moléculaires, dont la PDI, qui se dirigent vers le RE pour y maintenir les protéines dans leur bonne conformation tridimensionnelle. D'autres gènes concernent des protéines impliquées dans la dégradation de protéines dénaturées via le système

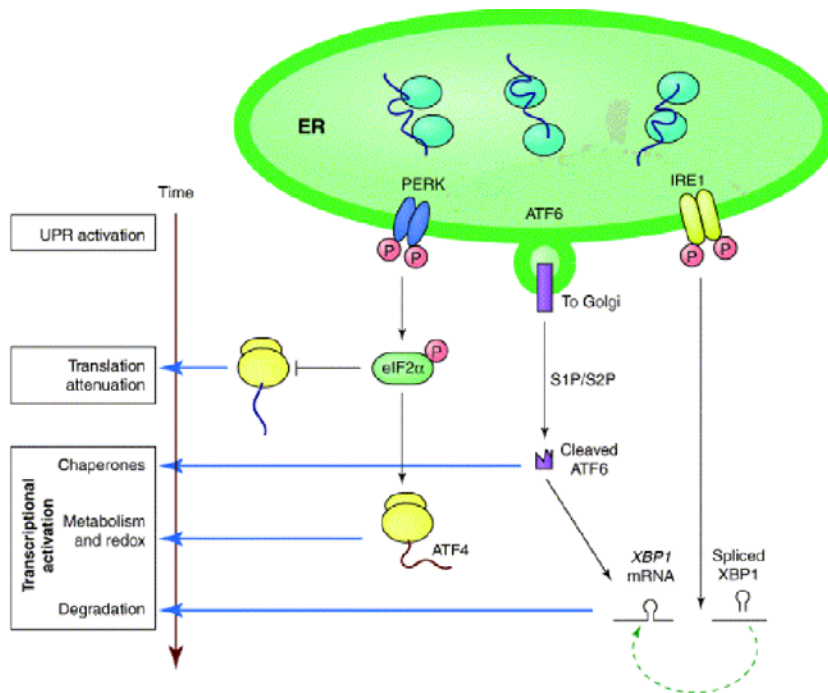


Fig. 5. Différentes composantes de la réponse UPR induite par les senseurs se trouvant dans le réticulum endoplasmique (ER). Pour plus de détails, voir le texte. D'après Rutkowski et Kaufman, 2004

ERAD (*Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*). Ce dernier nous intéresse particulièrement puisqu'il est associé au protéasome situé dans le cytoplasme. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la sur-expression d'une composante du protéasome telle qu'elle fut observée dans ce travail pourrait être un résultat de la réponse UPR. Donc, la conséquence générale

de cette réponse est que, en situation de stress induisant une dénaturation des protéines dans le RE, (1) moins de protéines arrivent dans le RE avec le risque d'y être endommagées, (2) plus de chaperones permettent une meilleure protection des protéines, (3) les protéines endommagées sont davantage dégradées, ce qui limite le risque de toxicité.

Bien sûr, nous n'avons pas de preuve irréfutable que cette voie de transduction du signal soit activée dans notre modèle expérimental. Une telle activation nous paraît cependant suffisamment probable que pour envisager comme étape ultérieure des études tentant de démontrer un rôle possible de l'UPR dans la résistance accrue vis-à-vis d'une exposition au Cd. A notre connaissance, cela n'a jamais été démontré, même sur des modèles cellulaires mieux caractérisés que les cellules branchiales. Si cette voie se révélait être activée dans les branchies antérieures de crabes suite à une exposition chronique au Cd, cela pourrait expliquer un résultat observé dans le présent travail. En effet, nous avons montré (voir chapitre 4) que l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase était diminuée suite à une exposition aiguë seule (0,5 mg Cd l^{-1} pendant 3 jours), alors qu'elle n'était pas modifiée si les animaux avaient subi une exposition chronique préalable (50 μg Cd l^{-1} pendant 30 jours). Or, cette enzyme, formée de deux sous-unités, α et β , est localisée dans la membrane plasmique de toutes les cellules d'eucaryotes supérieurs (Lingrel et Kuntzweiler, 1994). Dans les cellules épithéliales des branchies de crustacés, elle est d'ailleurs uniquement localisée dans la membrane baso-latérale, permettant de la sorte un flux entrant de Na^+ (Lucu et Towle, 2003). Lors de sa synthèse, la Na^+/K^+ -ATPase doit obligatoirement transiter par le RE afin notamment d'y être assemblée en dimère (Rajasekaran et al., 2004). Nous postulons donc que, pendant la période d'acclimatation au Cd, une réponse de type UPR pourrait être induite dans les branchies antérieures et ainsi permettre à la Na^+/K^+ -ATPase d'être correctement repliée et/ou acheminée dans la membrane baso-latérale, où elle maintient ainsi une activité normale.

Il est encore important de signaler que la phosphorylation de l'eIF2 α (Fig. 5.) a une autre conséquence que la diminution générale de la traduction. Sa forme phosphorylée est en effet nécessaire pour induire la traduction de l'ARNm codant pour l'ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*). Ce facteur de transcription provoque la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress, et notamment au stress oxydant (Rutkowski et Kaufman, 2004). C'est ainsi le cas pour différentes enzymes intervenant dans la formation du glutathion (Harding et al., 2003). Si le Cd induit effectivement l'UPR, il serait donc également possible que la sur-expression de protéines antioxydantes en soit une conséquence. Toutefois, la traduction de l'ARNm de l'ATF4 ne

nécessite pas obligatoirement de réponse UPR. D'autres signaux découlant d'un stress oxydant peuvent également induire la phosphorylation de l'eIF2 α via l'activation de protéines kinases encore inconnues à ce jour. On peut dès lors envisager que le Cd puisse provoquer la transcription de gènes contrôlés par l'ATF4, soit via l'UPR, soit via la formation de ROS. Remarquons également que, outre ce système, d'autres voies de transduction du signal sont connues pour être activées suite à un stress oxydant. C'est par exemple le cas de l'ARE (*Antioxidant Responsive Element*). Cette dernière est connue pour induire la transcription de gènes codant pour des enzymes antioxydantes telle que la GST (Wasserman et Fahl, 1997).

Ainsi, cette étude protéomique ouvre la porte à plusieurs hypothèses concernant les mécanismes cellulaires permettant de repérer une situation de stress et d'activer la transcription de gènes codant pour des protéines permettant de lutter contre ce stress. Même si aucune voie ne peut être identifiée actuellement avec certitude, de nouvelles recherches permettront de confirmer ou non l'implication de l'UPR et d'autres voies induisant une réponse contre un stress oxydant.

Résumé des mécanismes d'acclimatation du crabe chinois vis-à-vis du Cd

En résumé, lorsqu'un crabe chinois, en eau douce, est soumis à une exposition chronique de 50 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$, plusieurs réponses biologiques sont mises en place lui permettant de survivre. Tout se passe comme s'il entrait dans un état compensatoire.

L'exposition chronique au Cd utilisée dans ce travail peut s'apparenter à une situation de stress pour le crabe chinois, dans le sens où l'organisme « lutte » face à une nouvelle situation environnementale. Les changements qui s'opèrent pendant l'acclimatation sont loin de concerner uniquement l'induction de protéines pouvant séquestrer le Cd comme les métallothionéines. Ces modifications sont résumées dans la figure 6.

Expression d'un protéome de stress et possible répercussion sur le fitness

Les réponses obtenues dans notre étude au niveau de l'expression des protéines grâce à l'analyse protéomique peuvent être comparées avec ce que Kültz a appelé un « protéome de stress » (2003). Pour lui, la réponse cellulaire au stress est tellement ancienne du point de vue évolutif qu'il est

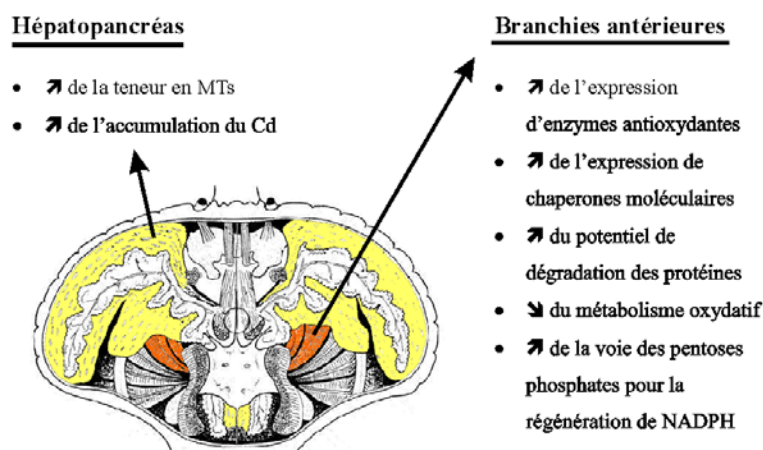


Fig. 6. Résumé des mécanismes d'acclimation mis en place chez le crabe chinois pendant une exposition à $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ pendant 30 jours, tels qu'observés dans ce travail.

probable qu'un protéome de stress minimum soit apparu très tôt dans l'évolution afin d'aider les cellules à survivre dans un environnement variable. Afin de corroborer cette hypothèse, il précise que la plupart des réponses cellulaires au stress sont conservées chez beaucoup d'espèces et peuvent être actionnées sous l'effet d'un grand nombre d'agents stressants différents.

Kültz range les protéines faisant partie du protéome de stress (uniquement sur-exprimées) dans plusieurs catégories : (1) celles qui contrôlent le cycle cellulaire et peuvent l'interrompre en cas de stress ; (2) celles qui ont une fonction de chaperone et qui vont stabiliser d'autres protéines ; (3) celles qui vont réparer et stabiliser l'ADN ; (4) celles qui vont dégrader et évacuer les macromolécules endommagées ; (5) celles qui vont réguler le potentiel redox ; (6) celles qui vont participer à la synthèse des protéines.

Si on regarde de plus près les protéines qui sont sur-exprimées dans les branchies antérieures de crabes chinois exposés à du Cd, elles peuvent toutes entrer dans l'une de ces catégories : PDI (2) ; protéasome, cathepsine D (4); GST, TPx (5). Par contre, nous n'avons pas observé de protéines impliquées dans les catégories (1), (3) et (6). Cela ne veut pas dire que les branchies n'en sur-expriment pas, mais simplement que notre méthode

d'analyse ne les a pas mises en évidence (voir chapitre 8.2). D'un autre côté, les protéines sous-exprimées dans notre modèle expérimental ne se retrouvent pas dans le protéome de stress défini par Kültz. Il nous semble pourtant qu'un état compensatoire inclut aussi bien des protéines sur-exprimées que sous-exprimées, et que la sous-expression de certaines d'entre elles est certainement tout aussi importante afin de résister au stress. Nous proposons donc d'inclure la sous-expression de certaines protéines dans le protéome de stress (notamment certaines enzymes métaboliques).

Un corollaire intéressant découlant du caractère ubiquiste de la RCS, est que l'on observe dans différents systèmes biologiques un phénomène de **tolérance croisée**. En effet, les gènes impliqués dans la protection des macromolécules et contre le stress oxydant étant induits en réponse à un grand nombre d'agents stressants, il est logique d'observer chez un organisme soumis à un stress X, une tolérance accrue lorsqu'il est soumis à un stress Y. Ainsi, Volker et al. (1992) ont montré que la bactérie *Bacillus subtilis* soumise à une augmentation modérée de la température, présentait une tolérance accrue à un stress hyper-osmotique. D'autres études ont également démontré une protection croisée chez des organismes pluricellulaires. Une population de saumons atlantiques préalablement soumise à un choc thermique (+12°C pendant 15 min) présentait un taux de mortalité inférieur lors d'un choc hyper-osmotique (45 g l⁻¹), par rapport à une population directement soumise à cette condition hyper-osmotique (DuBeau et al., 1998). Un choc thermique chez la moule, *Mytilus edulis*, induit également une protection croisée contre une exposition à 20 µg l⁻¹ de cadmium (Tedengren et al., 1999). Citons enfin Mello-Filho et al. (1988) qui ont montré que des cellules de hamsters rendues résistantes au Cd, étaient également résistantes à des stress oxydants. Nous pourrions ainsi nous demander si des crabes chinois acclimatés au Cd présentent également une résistance accrue vis-à-vis d'autres xénobiotiques et, plus généralement, vis-à-vis d'autres agents stressants.

D'autres questions viennent encore à l'esprit lorsqu'on analyse la réponse cellulaire au stress dans un contexte d'acclimatation ou d'adaptation par rapport à un changement de l'environnement. Ainsi Kültz se demande « si l'expression d'un protéome de stress confère une tolérance accrue au dépens d'une baisse du *fitness* dans un environnement stable ».

L'acclimatation est l'ensemble des modifications biologiques qu'un organisme met en place afin de répondre à des modifications de son environnement. Cette notion est par conséquent complètement liée à celle de stress si bien que Travisano (2000) définit un environnement stressant en fonction de l'acclimatation. Pour lui, c'est un environnement dans lequel il y a une acclimatation nécessitant un coût au niveau de ce que les anglo-

saxons appellent « *fitness* » ou encore « *Darwinian fitness* ». Ce « *fitness* », que l'on pourrait traduire littéralement par aptitude ou habilité, intègre deux notions: la survie et le succès de reproduction. Il traduit la probabilité relative qu'a un génotype donné de survivre et de se reproduire. En d'autres termes, les organismes possédant un meilleur « *fitness* » sont ceux qui possèdent les meilleures chances de survie et le meilleur succès de reproduction, et qui ont donc la meilleure probabilité de transmettre leurs gènes (Bock, 2003). D'après cette définition, un organisme qui s'acclimata est incapable de compenser complètement puisqu'il détourne une partie de son énergie afin de répondre aux nouvelles contraintes de son environnement.

En effet, les mécanismes mis en place pendant l'acclimatation sont susceptibles de détourner une partie de l'énergie disponible afin de lutter contre les effets délétères occasionnés par le Cd (Calow, 1991). Par exemple, Barber et al. (1990) ont estimé que la synthèse de MTs représentait un maximum de 5% des dépenses énergétiques chez des daphnies exposées à des niveaux élevés en métaux. Même un coût de cet ordre de grandeur peut être préjudiciable en terme de *fitness* s'il perdure pendant une période suffisamment longue. De plus, nous avons observé que le métabolisme oxydatif du crabe chinois était diminué, induisant probablement un déséquilibre énergétique. Bien sûr, cela n'a été observé que dans les branchies antérieures, si bien qu'une généralisation serait hasardeuse. Toutefois, on peut se demander si l'induction d'un protéome de stress dans les branchies antérieures, ajoutée à l'induction de MTs dans l'hépatopancréas, ne pourrait pas avoir des répercussions sur d'autres fonctions de l'organisme, comme la reproduction, du fait que ces dernières possèderaient alors moins de ressources.

L'idée selon laquelle une modification de l'environnement entraînant une situation de stress, qui n'occasionnerait pas de modification visible au niveau physiologique, puisse tout de même avoir des effets en terme de *fitness*, et peut-être alors se répercuter au niveau populationnel, devrait focaliser l'attention des scientifiques. **En effet, cela voudrait dire que des pollutions même relativement faibles, mais supérieures à un seuil d'acclimatation, pourraient, à moyen terme, perturber des populations naturelles.**

Evaluation de l'état de santé des crabes chinois en fonction du type d'exposition au Cd

La figure 7, qui est une adaptation d'un schéma publié par Depledge (1994), décrit la relation théorique entre l'état de santé d'un individu et les mécanismes physiologiques ayant lieu dans un environnement comprenant un polluant. Les traits noirs reprennent la situation initiale. Pour une faible concentration en polluant, les processus physiologiques maintiennent l'homéostasie, et l'état de santé de l'animal est qualifié de normal. Lorsque la concentration et/ou le temps d'exposition augmente(nt), les mécanismes physiologiques entrent dans un état dit « compensatoire » dans lequel ils doivent lutter pour maintenir les variables physiologiques dans les limites permettant la survie de l'animal. L'organisme est alors qualifié de stressé. Lorsque la concentration et/ou le temps d'exposition augmente(nt) encore, les mécanismes physiologiques peuvent ne plus être suffisants pour compenser les effets délétères du polluant. La santé de l'animal se détériore

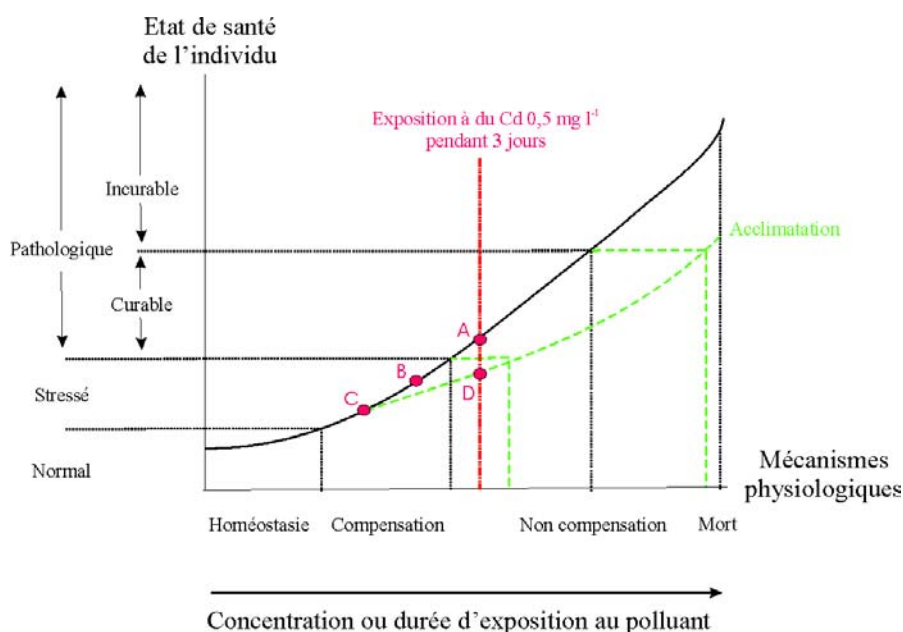


Fig. 7. Représentation schématique de l'évolution de l'état de santé d'un organisme et de l'état de ses mécanismes physiologiques en fonction de la concentration en xénobiotique ou de la durée d'exposition (d'après Depledge, 1994). Adaptation pour le crabe chinois exposé au Cd. Traits verts : courbe théorique obtenue après acclimation. A et D, exposition à 0,5 mg Cd l⁻¹ pendant 3 jours ; B, exposition à 0,5 mg Cd l⁻¹ pendant 1 ou 2 jours ; C, exposition à 5 µg Cd l⁻¹ pendant 30 jours. Voir le texte pour les détails.

et entre dans un état pathologique qui peut être curable, c'est-à-dire que l'organisme peut guérir si le niveau d'exposition diminue, ou au contraire être incurable et aboutir inexorablement à la mort, même si le polluant est retiré du milieu.

Nous avons cherché à retranscrire sur ce schéma les observations faites tout au long de ce travail. Il convient de garder à l'esprit qu'il s'agit d'un schéma théorique et que les limites entre les différents états de santé sont fixées de manière aléatoire. Commençons par une exposition aiguë au Cd. Après 3 jours, on a observé un effet délétère sur la capacité d'hyperosmorégulation du crabe chinois. L'organisme n'est donc pas en mesure de compenser les pertes ioniques. Les mécanismes physiologiques sont alors en non-compensation et l'état de santé de l'animal peut être défini comme pathologique. Cette situation est représentée par le point A. Nous ne pouvons pas dire si cette situation est réversible ou non. Pour ce faire, il faudrait procéder à une exposition de 3 jours, après laquelle les animaux seraient replacés dans un environnement sans Cd. Après 1 ou 2 jours d'exposition, nous n'avons pas observé d'effet sur l'osmorégulation. Il en résulte que les mécanismes physiologiques étaient probablement dans un état compensatoire et l'animal dans un état de stress (point B). Lors d'expositions chroniques pendant 30 jours, nous n'avons observé aucun effet sur l'osmorégulation. Nous savons par contre que des mécanismes compensatoires se mettent en place lorsque la concentration environnante en Cd est de $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$. L'animal est donc stressé (point C). Pour une concentration de $10 \mu\text{g Cd l}^{-1}$, nous ne disposons pas de données suffisantes pour savoir si l'animal se situait dans un état de stress ou dans un état normal.

Nous suggérons que l'exposition chronique à $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ ait un effet sur la courbe mettant en relation l'état de santé de l'individu et les mécanismes physiologiques. Cette courbe serait déplacée vers le bas comme indiqué en traits verts sur la figure 7. De la sorte, la limite entre un état stressé et pathologique est déplacée vers la droite, ce qui veut dire que pour une même exposition (ici $0,5 \text{ mg Cd l}^{-1}$ pendant 3 jours), les mécanismes physiologiques se trouvent maintenant dans un état de compensation et maintiennent l'état de santé de l'organisme dans un état de stress plutôt que pathologique (point D).

8.2. Conclusions sur l'utilisation de l'analyse protéomique en écotoxicologie

L'analyse protéomique est une méthodologie utilisable en écotoxicologie aquatique

Ce n'est que depuis quelques années que l'analyse protéomique a pris son envol dans les laboratoires de biologie moléculaire. C'est logique puisque cette méthodologie est apparue en complément aux analyses génomiques et aux programmes de séquençage des génomes. Il fallait « mettre en musique » les nombreuses séquences nucléotidiques obtenues, c'est-à-dire comprendre de la manière la plus globale possible où, quand et sous quelles conditions les gènes étaient exprimés. Cet objectif est aujourd'hui classé sous le vocable de « génomique fonctionnelle », et concerne essentiellement les niveaux transcriptomique et protéomique. Ainsi, Wilkins et al. (1996) ont défini la protéomique comme étant « l'analyse dans son entièreté, du complément exprimé par un génome au niveau des protéines », c'est-à-dire au niveau final et fonctionnel du produit de l'expression des gènes. Par définition, l'approche protéomique est holistique et permet d'obtenir une vision ponctuelle et sans *a priori* de l'expression des protéines dans un tissu donné, à un moment donné, sous une condition donnée.

Habituellement, on mène une étude protéomique étape par étape (Garin et al., 2001; Graves et Haystead, 2002; Zhu et al., 2003) : (1) solubilisation d'un maximum de protéines, (2) séparation des protéines sur des gels d'électrophorèse en 2 dimensions, (3) analyse informatique du niveau d'expression des spots de protéines et comparaison entre gels, (4) excision et digestion des protéines d'intérêt, (5) identification des protéines d'intérêt grâce à la spectrométrie de masse et la recherche dans des bases de données informatiques.

Ces différentes étapes ont fait l'objet d'avancées techniques importantes ces dernières années rendant de telles études de plus en plus reproductibles et donc comparables entre différents laboratoires. Toutefois, la majorité des résultats ont été obtenus dans le domaine biomédical en utilisant des organismes (ou des lignées cellulaires provenant d'organismes) modèles, c'est-à-dire pour lesquels il existe un nombre élevé

de séquences nucléotidiques et peptidiques dans les bases de données (Walgren et Thompson, 2004; Hanash, 2003). Cette situation permet un rendement élevé d'identification de protéines, soit par comparaison de « cartes de masses peptidiques », soit par comparaison de séquences en acides aminés obtenues par MS/MS.

Lorsque le génome d'une espèce étudiée n'est pas séquencé et lorsqu'il existe peu de séquences nucléotidiques et peptidiques propres à cet organisme, l'identification des protéines nécessite de travailler par homologie et d'aligner les séquences obtenues expérimentalement par MS/MS avec des séquences appartenant à des espèces différentes. De cette manière, si la protéine recherchée a été suffisamment conservée au cours de l'évolution, son identification sera d'autant plus facile que les séquences présentes dans les bases de données appartiennent à des espèces phylogénétiquement proches. Plusieurs outils informatiques ont été développés afin de permettre la comparaison de séquences entre espèces. Celui que nous avons utilisé est le logiciel MS BLAST (*Mass Spectrometry driven Best Local Alignment Search Tool*)¹ (Shevchenko et al., 2001) autorisant la comparaison simultanée de plusieurs séquences peptidiques et rapportant les résultats avec un niveau de signification statistique spécialement étudié pour ce type d'analyse.

A l'évidence, l'utilisation à grande échelle de l'analyse protéomique en écotoxicologie aquatique est freinée par l'importante somme de travail que nécessitent la réalisation et l'analyse de gels 2D pour finalement obtenir un faible niveau d'identification des protéines. A notre connaissance, aucune étude écotoxicologique sur des organismes aquatiques non-modèles n'a pu jusqu'ici identifier des protéines sur- ou sous-exprimées suite à l'exposition à un ou plusieurs xénobiotiques, grâce à l'approche protéomique. Il est toutefois prévisible qu'au fur et à mesure que de nouvelles séquences seront disponibles dans les bases de données, et ce pour des organismes divers, l'identification des protéines se fera de plus en plus aisément. Une autre possibilité pour permettre l'utilisation de l'analyse protéomique à grande échelle sur des organismes non-modèles, serait de lancer un programme de séquençage d'au minimum 1 génome par rang taxonomique (à définir). Ainsi, il existerait toujours un génome séquencé d'une espèce phylogénétiquement proche de celle que l'on étudie. Par exemple, on pourrait lancer un programme de séquençage du génome

¹<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html>

du crabe chinois, qui pourrait alors servir de référence pour les études portant sur des crustacés décapodes !

Notre travail a permis de tester une méthodologie particulière afin d'étudier les variations de l'expression des protéines dans un organe d'une espèce non-modèle (au sens moléculaire du terme) soumis à une exposition à un polluant. L'objectif général de ce type d'étude est de mettre en évidence des profils d'expression de protéines induits suite à une exposition à un xénobiotique donné.

Notre analyse a mis en évidence la sur- ou sous-expression d'un total de 34 spots dans les branchies antérieures de crabes chinois soumis à une exposition aiguë ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$ – 3 jours) ou chronique ($50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ – 30 jours) au Cd, par rapport à des animaux non exposés à ce métal. Si nous considérons qu'en moyenne, nous avons pu détecter 1205 spots par gel, cela représente 3% des spots dont l'expression a été modifiée. On ne peut toutefois, sur base de ce résultat, affirmer que 3% de l'ensemble des protéines ont eu leur expression modifiée par une exposition au Cd.

En premier lieu, les 1205 spots détectés ne représentent qu'une portion de l'ensemble des protéines présentes dans un extrait cellulaire. Nous n'avons pas, par exemple, tenu compte des protéines dont le *pI* était supérieur à 7 ou inférieur à 4. Nous n'avons certainement pas non plus réussi à solubiliser les protéines les moins solubles telles que les protéines très hydrophobes ou membranaires. De plus, la coloration au nitrate d'argent a une limite de sensibilité qui ne permet pas de détecter les protéines présentes en faible quantité ($< 5 \text{ ng}$). Afin d'obtenir un plus grand nombre de protéines, il aurait fallu procéder à une analyse sub-protéomique, c'est-à-dire à un fractionnement de l'échantillon (par exemple en fractions sub-cellulaires ou en fonction du degré de solubilisation des protéines) (Corwell et al., 2000 ; Jung et al., 2000), ou encore focaliser davantage la gamme de pH de la première dimension afin d'augmenter la résolution et ainsi d'éviter la superposition de spots (par exemple, des gammes de pH 3,5-5,0 ; 4,5-5,5 et 5,5-6,7). Il est toutefois évident qu'obtenir un plus grand nombre de spots a un prix, en terme d'argent bien sûr, mais aussi en terme de temps de travail afin de réaliser un plus grand nombre de gels et de les analyser. Il ressort donc qu'une stratégie d'analyse protéomique doit faire le compromis entre ces différents facteurs en fonction des objectifs poursuivis et des moyens disponibles.

Ensuite, nous n'avons pas travaillé sur l'ensemble des spots détectés. En effet, ceux-ci ne se retrouvaient pas systématiquement sur tous les gels. La variabilité interindividuelle, ajoutée à la variabilité de l'expérimentation, peuvent amener à de grandes difficultés d'analyse, et notamment à ne pas pouvoir effectuer de superposition correcte des spots (*matching*). Les

garder tous aurait entraîné un risque d'erreur trop important. Ainsi, comparer les volumes normalisés d'un spot étant uniquement retrouvé 2 fois sur 6 pour les gels de crabes exposés au Cd et 3 fois sur 6 pour les témoins n'aurait pas de sens. Nous avons donc décidé de sélectionner les spots présents sur minimum 5 des 6 gels disponibles par condition expérimentale.

Enfin, il semble que notre méthodologie n'ait pas permis de mettre en évidence des variations d'expression relativement faibles. Un total de 86% de l'ensemble des spots ayant montré une variation d'expression, avaient un facteur d'induction ou de répression supérieur à 2 ou inférieur à 0,5. Cela veut dire que nous avons essentiellement mis en évidence les plus importantes modifications d'expression, celles montrant des protéines sur- ou sous-exprimées plus de 2 fois. Il est donc à peu près certain que d'autres modifications, plus faibles, nous ont échappé. Par exemple, nous n'avons pas mis en évidence une sur-expression de la HSP70 qui aurait pourtant dû se retrouver dans nos gels. Si on regarde les résultats obtenus en slot-blot, la sur-expression observée est de l'ordre de 1,3 fois. Il est donc probable que la méthodologie d'analyse protéomique utilisée dans ce travail n'était pas suffisamment sensible pour la mettre en évidence.

Une explication à cette relative sensibilité est la variabilité des volumes normalisés existant entre les mêmes spots de gels différents. Ainsi, plus ou moins 60% des spots ont montré un coefficient de variabilité supérieur à 50%. Au début de l'analyse, notre crainte était grande que la variabilité observée soit si importante qu'elle empêche de mettre en évidence une quelconque modification de l'expression des protéines. En effet, il ne faut pas oublier que nous avons entrepris une étude sur des animaux entiers, et que chaque gel reprenait les protéines d'une branchie provenant d'un organisme distinct, et possédant donc un génome quelque peu différent. Le risque existait que la variabilité interindividuelle, ajoutée à la variabilité inhérente à l'expérimentation, cachent les effets induits par le Cd. L'emploi de tests statistiques (de type t de Student ou l'équivalent non-paramétrique) prenant en compte cette variabilité a été nécessaire et a permis la mise en évidence des principales modifications de l'expression des protéines.

Afin d'améliorer cette méthodologie d'analyse, c'est-à-dire afin de détecter un plus grand nombre de spots, de diminuer la variabilité entre gels, et de relever des différences d'expression plus faibles, une perspective prometteuse serait d'utiliser ce que l'on nomme l'analyse DIGE (*Differential Gel Electrophoresis*) (Unlu et al., 1997 ; Gharbi et al., 2002, Knowles et al., 2003). La principale différence avec notre méthode est que

la DIGE permet de réaliser un gel 2D comprenant 3 protéomes différents. Les protéines extraites des échantillons sont marquées de manière covalente avec des fluorochromes différents de type CyDyesTM (Cy2, Cy3, Cy5) avant de réaliser les gels. L'analyse informatique nécessite de scanner les gels à trois longueurs d'onde différentes, spécifiques des trois fluorochromes. On obtient ainsi des images qui peuvent être parfaitement superposées. En pratique, on mélange les protéines provenant de 2 conditions expérimentales avec un mélange de protéines provenant de tous les échantillons dont on dispose et qui sert de standard interne. Cette technique n'a pas encore été utilisée en écotoxicologie. Il est toutefois probable qu'elle permettra d'augmenter la qualité des résultats. En effet, la DIGE est plus sensible que l'argent (5X), est hautement reproductible, est quantitative, est compatible avec la spectrométrie de masse, permet de détecter des modifications de l'expression des protéines de l'ordre de 10% avec un coefficient de certitude de 95%, permet la réduction du nombre de gels à réaliser, la réduction du temps de travail, tout en augmentant le degré de certitude vis-à-vis des résultats obtenus !

Après avoir mis en évidence des modifications du profil d'expression protéique, nous avons ensuite tenté d'identifier un maximum de protéines grâce au micro-séquençage de peptides et à une recherche par homologie dans des bases de données. Sur 25 spots que nous avons excisés, 15 ont réussi à être identifiés sans ambiguïté, soit 60%. Ce résultat nous paraît tout à fait prometteur. A notre connaissance, cette étude est la première dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique à avoir identifié des protéines dont l'expression avait été modifiée suite à l'exposition à un xénobiotique. Comme détaillé au chapitre précédent, ces identifications ont permis de mettre en évidence des mécanismes cellulaires mis en place en réponse à une exposition au Cd. **Nous en concluons que la méthodologie employée dans ce travail pourrait être généralisée à d'autres études d'écotoxicologie aquatique avec un succès d'identification de protéines significatif.**

Toutefois, il reste une question qui n'a pas encore été soulevée et qui mériterait que l'on s'y attarde. Les modifications de l'expression des protéines suite à une exposition au Cd sont-elles réellement dues à une modification de la transcription des gènes ? En effet, la quantité d'une protéine présente dans une cellule intègre plusieurs paramètres : le taux de transcription du gène, l'exportation de l'ARNm hors du noyau, la stabilité de l'ARNm, la régulation de la traduction, la dégradation de la protéine. Ainsi, rien ne nous permet d'affirmer, par exemple, que la sous-expression observée de l'alpha tubuline serait le résultat de la répression du gène codant pour cette protéine. Il se pourrait tout aussi bien, et cela nous semblerait même plus probable dans ce cas, que la protéine soit davantage

dégradée par le protéasome. En effet, si l'alpha tubuline est effectivement oxydée par le Cd, il est possible qu'elle soit dirigée vers ce centre protéolytique afin d'être dégradée.

Ce n'est qu'un exemple mais il renforce la nécessité de mener conjointement des études aux niveaux protéomique et transcriptomique. Ce dernier permettrait alors de savoir si la quantité d'ARNm codant pour les protéines sur- ou sous-exprimées est modifiée, ce qui renseignerait de manière plus précise sur le taux de transcription des gènes correspondants. Dans ce contexte, différentes techniques pourraient être utilisées et comparées aux résultats que nous avons obtenus au niveau protéomique. Il s'agit de l'utilisation de puces à ADN (*gene array*) (Larkin et al., 2002; Walsh et al., 2003), du *Differential Display RT-PCR* (DD RT-PCR) (Larkin et al., 2003), de l'analyse différentielle des transcriptomes par construction de banques soustractives par « *Suppressive PCR Subtractive Hybridization* » (SSH) (Shin et al., 2003) ou encore de techniques telles que la SAGE (« *Serial Analysis of Gene Expression* ») ou la SuperSAGE (Matsumura et al., 2003 ; Thomas et Klaper, 2004). Au fur et à mesure que des séquences nucléotidiques vont devenir disponibles pour un plus grand nombre d'espèces, il est certain que ces techniques seront de plus en plus utilisées.

Utilisation de l'analyse protéomique afin de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs d'exposition à un xénobiotique

Un biomarqueur peut être défini comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic et al., 1997). L'utilisation de biomarqueurs en écotoxicologie consiste donc à mesurer un paramètre biologique sur des organismes prélevés dans l'environnement afin d'estimer si celui-ci est, ou a été, en contact avec un xénobiotique. Cette démarche a pour but d'évaluer l'état de santé ou l'état de stress des organismes étudiés et si possible d'extrapoler à l'ensemble d'un écosystème. Les biomarqueurs seraient dans le meilleur des cas des systèmes d'alarme vis-à-vis de pollutions, et permettraient de prendre des dispositions avant que l'écosystème ne soit affecté par le (ou les) polluant(s) de manière irréversible.

Afin d'être utilisé comme système d'alarme, un biomarqueur doit répondre à deux principaux critères : (1) être sensible et donc être observable avant que des effets irréversibles ne soient occasionnés ; (2) pouvoir renseigner sur le type de polluant à incriminer.

Les biomarqueurs cellulaires sont de bons candidats. Généralement, un xénobiotique va d'abord induire des effets sur différentes composantes cellulaires avant que ceux-ci ne se répercutent sur les niveaux d'organisation supérieurs comme le niveau comportemental. Le suivi de tels biomarqueurs pourrait par conséquent renseigner de manière précoce sur une exposition à un polluant. De ce point de vue, l'analyse protéomique que nous avons menée dans ce travail nous fournit de nouveaux candidats biomarqueurs. Il serait en effet intéressant de suivre le niveau d'expression ou l'activité des enzymes mises en évidence dans ce travail, sur des organismes prélevés en milieu naturel. Par exemple, nous proposons comme perspective d'étudier la possibilité d'utiliser le niveau d'expression de la protéine disulfure isomérase comme biomarqueur d'une exposition à un xénobiotique réagissant avec les groupements sulfures (Cd, Hg, Pb, As).

Toutefois, cette étude doit nous inciter à la prudence. Nous avons en effet observé davantage de modifications de l'expression des protéines suite à une exposition dite « chronique ». Par contre, une exposition dite « aiguë » n'a pas montré les mêmes résultats alors que des effets délétères étaient observés aux niveaux physiologique et morphologique. Si nous avons utilisé l'expression de la PDI comme biomarqueur dans le cas d'une exposition aiguë, nous ne nous serions pas aperçu qu'il y avait un problème. C'est pour cette raison que l'évaluation de l'état de santé ou de

stress d'un organisme doit nécessairement utiliser une approche dite multiple (*multi-trail*). Ainsi, Fossi et al. (2000) stipule qu'une telle approche, évaluant différentes réponses biologiques, aussi bien génétiques que physiologiques, est essentielle afin de déterminer l'état de santé d'un organisme.

De plus, afin d'identifier le type de xénobiotique à incriminer, l'utilisation d'un seul biomarqueur ne suffit pas. En effet, certains biomarqueurs sont très généraux et réagissent à un grand nombre de xénobiotiques (ex : HSP70) alors que d'autres sont davantage spécifiques (ex : les MTs vis-à-vis des métaux). Toutefois, un biomarqueur seul n'est jamais suffisamment spécifique pour être associé à un seul xénobiotique. Il est donc nécessaire d'utiliser plusieurs biomarqueurs. Précisons que ce point est différent de celui traité au paragraphe précédent. Il s'agissait alors d'utiliser des biomarqueurs à différents niveaux d'intégration. Ici, nous préconisons l'emploi de biomarqueurs multiples pour un même niveau d'intégration, par exemple le niveau cellulaire. De la sorte, Downs et al. (2000 ; 2001a ; 2001b) ont développé le concept de « système de biomarqueurs moléculaires (SBM) ». En utilisant des paramètres biologiques tels que la peroxydation lipidique, l'expression d'enzymes anti-oxydantes, de protéines de stress, etc., ils arrivent à discriminer le type de polluant auquel différents organismes sont exposés. Cependant, avant d'être utilisables et surtout interprétables sur des animaux prélevés dans l'environnement, où se trouvent non pas un seul mais un ensemble de xénobiotiques, beaucoup d'études devront encore être effectuées.

Nous pensons que l'analyse protéomique pourrait accélérer la mise au point de tels systèmes de biomarqueurs moléculaires. En effet, cette analyse comprend le niveau d'expression d'un grand nombre de protéines. Si nous testions les réponses occasionnées successivement par plusieurs polluants sur un organisme, nous pourrions obtenir des signatures d'expression protéique (SEPs) spécifiques pour chaque polluant. Ainsi, même si une protéine déterminée n'a pas son niveau d'expression spécifiquement modifié suite à l'exposition à un polluant précis, il est probable que l'expression de toutes les protéines ne soit pas modifiée de la même manière par tous les xénobiotiques. Cela a d'ailleurs été montré sur la moule *Mytilus edulis* exposée à du cuivre ou des PCBs (Shepard et al., 2000), ou encore sur des embryons de poissons zèbres *Danio rerio* exposés à différents perturbateurs endocriniens (Shrader et al., 2003).

A partir du moment où différentes SEPs ont été mises en évidence en fonction du type de polluant incriminé, deux possibilités s'offrent à nous. La première serait de continuer à utiliser ces SEPs, et donc de continuer à

réaliser des gels d'électrophorèse 2D, directement sur les organismes prélevés dans l'environnement dans des programmes de *biomonitoring*. Ce système semble cependant difficile à mettre en œuvre car assez lourd et assez cher. Il n'est toutefois pas nécessaire de réaliser chaque fois toute l'analyse puisque nous pouvons dans ce cas nous focaliser exclusivement sur les spots d'intérêt. La deuxième possibilité est de mettre au point un autre système de suivi de l'expression de plusieurs protéines qui auront été identifiées grâce à l'analyse protéomique préalable. Un kit de type ELISA multipuits pourrait semble-t-il très bien convenir. Dans ce cas, l'investissement sera plus important lors de l'élaboration du kit mais son utilisation sera ensuite très rapide et très simple à mettre en œuvre. Il est également probable que le développement de techniques à haut débit va progressivement rendre possible l'élaboration de tests permettant d'évaluer l'expression simultanée de plusieurs centaines de protéines. Les puces à protéines (*protein array*) consistent à faire adhérer des anticorps (ou d'autres molécules) sur une plaque miniaturisée. L'extrait cellulaire est ensuite déposé sur la plaque avant qu'une technique de détection (ex : fluorescence) permette de rendre compte de l'abondance relative des protéines reconnues par les anticorps (Zhu et Snyder, 2003). De telles techniques à haut débit permettraient de suivre sur une même puce, non plus uniquement certaines protéines mises en évidence par l'analyse des gels 2D, mais l'ensemble des protéines étant sur-exprimées suite à l'activation d'une même voie de transduction du signal. Par exemple, dans notre étude, nous pourrions envisager d'élaborer une puce reprenant les protéines induites suite à la réponse UPR. Cela nous permettrait d'obtenir une analyse très fine des réponses au niveau de l'expression des protéines de tissus provenant d'organismes soumis à un stress environnemental.

Terminons en mentionnant l'analyse SELDI (*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation*) comme alternative aux gels 2D afin d'utiliser des systèmes de biomarqueurs moléculaires. Dans ce cas, les protéines interagissent avec une matrice sélectionnée pour ses caractéristiques d'affinité et ne sont plus séparées sur un gel (Merchant et Weinberger, 2000 ; Hogstrand et al., 2002). Toutefois, à notre connaissance, aucune étude n'a encore réussi à identifier des protéines par cette méthode.

8.3. Conclusion générale

Tout organisme vivant peut entrer dans un état de stress lorsque son environnement est modifié. Dans un tel état, il lutte pour survivre et pour s'adapter aux nouvelles conditions. Les pollutions engendrées par les activités humaines peuvent induire cet état de stress, notamment chez les organismes aquatiques. Nous avons en effet montré tout au long de ce travail qu'une exposition du crabe chinois au Cd pouvait déclencher chez ce dernier la mise en place de mécanismes lui permettant d'augmenter sa résistance vis-à-vis du métal.

Afin d'évaluer le plus correctement possible l'état de santé de ce crustacé en fonction de l'exposition au Cd qu'il a endurée, une approche intégrant différents niveaux d'organisation s'est avérée précieuse. En effet, alors qu'une exposition dite « aiguë » induisait des altérations physiologiques, morphologiques et biochimiques observables, relativement peu de modifications de l'expression des protéines ont pu être mises en évidence. Par contre, une exposition dite « chronique » pouvait se traduire par une acclimatation accompagnée de beaucoup moins d'effets aux niveaux d'organisation supérieurs, mais provoquant par contre de nombreuses modifications de l'expression des protéines. A ce titre, l'approche protéomique développée dans ce travail s'est avérée pourvoyeuse d'un grand nombre de données. A l'avenir, il est certain que des approches multiples semblables à celle qui fait l'objet de cette thèse, seront amenées à se développer dans le cadre de programmes de surveillance de l'état de santé des écosystèmes, car elles seules sont capables d'apporter une vision proche de la réalité sur l'état de stress dans lequel se trouvent les organismes.

Notre travail s'est concentré à l'échelon de l'organisme. Pour être tout à fait complète, une évaluation de l'état de santé d'un écosystème devrait aussi se baser sur des données au niveau d'intégration populationnel. Sur base de l'analyse réalisée sur le crabe chinois, nous pouvons en effet nous demander si les altérations induites par le Cd pourraient se répercuter par la suite sur les populations. Autrement dit, l'expression d'un protéome de stress implique-t-il l'existence d'effets secondaires sur le *fitness*, notamment en détournant une partie de l'énergie qui serait autrement disponible pour d'autres fonctions biologiques comme la reproduction ?

Cette question est loin d'être anodine. En effet, le « changement global » de l'environnement prenant place actuellement, implique aussi bien le réchauffement climatique que des pollutions de l'eau par des composés chimiques. Ces modifications environnementales n'occasionnent cependant que très peu d'effets directement visibles et spectaculaires. Nous avons toutefois montré que même si la physiologie d'un organisme semble intacte, un environnement stressant peut induire une réponse biologique au niveau du protéome. La prudence s'impose donc lorsqu'il s'agit d'évaluer l'impact de telles modifications environnementales sur le long terme. Clairement, ces considérations devraient être prises en compte pour tenter de savoir quelles modifications environnementales sont acceptables afin d'éviter d'éventuelles répercussions sur l'évolution des organismes, y compris sur celle de l'homme.

