



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

A Marie-Madeleine et à Vava...

FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
FACULTE DES SCIENCES
RUE DE BRUXELLES, 61, B-5000 NAMUR, BELGIQUE

Réponses à un stress environnemental induit par le cadmium chez un crustacé euryhalin, *Eriocheir sinensis*. Approche intégrative incluant une analyse du protéome

Résumé :

Les xénobiotiques se trouvant dans l'environnement peuvent occasionner des effets délétères aux organismes vivants. Toutefois, nous sommes encore loin de connaître l'ensemble des mécanismes d'action des polluants et des réponses mises en place chez les organismes afin de survivre dans un environnement pollué. Dans ce travail, nous avons utilisé le crabe chinois, *Eriocheir sinensis*, comme modèle d'étude afin de mettre en évidence les réponses à un stress induit par le cadmium dissous dans le milieu aquatique. Nous avons focalisé notre attention sur la fonction d'osmorégulation. Différents types d'exposition ont été testés : une exposition « aiguë » ($500 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ de 1 à 7 jours) ; une exposition « chronique » (10 ou $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ pendant 30 jours). On observe une diminution de la capacité d'hyper-osmorégulation suite à une exposition aiguë. Sous cette condition, les branchies antérieures sont endommagées et les activités de différentes enzymes diminuées. Par contre, le Cd semble sans effet sur les branchies postérieures. Il est par conséquent probable que les branchies antérieures auraient perdu leurs propriétés de perméabilité et laisseraient passer plus librement l'eau et/ou les ions. Une exposition chronique n'affecte pas l'osmorégulation. Cependant, une exposition chronique suivie d'une exposition aiguë montrent que le crabe s'acclimate, c'est-à-dire qu'il devient plus résistant au Cd. Chez ces crabes acclimatés, l'hépatopancréas est capable d'accumuler une plus grande quantité de Cd grâce, en partie du moins, à une teneur accrue en métallothionéines. L'analyse protéomique a permis d'observer que l'expression d'enzymes anti-oxydantes et de chaperonnes moléculaires est augmentée dans les branchies antérieures, suggérant que le Cd affecte les branchies en induisant des espèces réactives à l'oxygène et en oxydant les groupements sulfures des protéines. De plus, le potentiel de dégradation des protéines semble accru. Enfin, plusieurs enzymes impliquées dans différentes voies métaboliques sont sous-exprimées, indiquant que le crabe entre dans un état compensatoire lui permettant de faire face à de fortes quantités de Cd. Ce travail démontre qu'une approche intégrative utilisant des analyses physiologiques, morphologiques, biochimiques et protéomiques, permet de caractériser l'état de stress dans lequel un organisme aquatique se trouve suite à différents types d'exposition à un xénobiotique. Même si une exposition chronique ne montre pas d'effet physiologique, elle peut toutefois induire des changements au niveau du protéome.

Dissertation présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biologiques
Mars 2005
URBO-Unité de Recherche en Biologie des Organismes
Promoteur : Prof. P. Devos

FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
FACULTE DES SCIENCES
RUE DE BRUXELLES, 61, B-5000 NAMUR, BELGIUM

**Stress response to cadmium in an euryhaline crustacean, *Eriocheir sinensis*.
An integrative approach including analysis of the proteome.**

Abstract :

Xenobiotics can induce deleterious effects on organisms. However, our understanding of their mechanisms of action are far from being complete. Moreover, we do not know how resistant organisms can cope with high pollution levels. In the present study, we used the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, as a model to characterize the stress response to waterborne cadmium. We focused the study on osmoregulation. So-called « acute » exposure ($500 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ for 1 to 7 days) or so-called « chronic » exposure (10 or $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ for 30 days) were tested. Results show that osmolality and ionic concentrations of hemolymph are decreased after acute exposure, revealing the loss of hyper-osmoregulatory capacity. Under this condition, « respiratory » anterior gills are highly damaged and enzymatic activities inside these gills are reduced. In contrast, « osmoregulatory » posterior gills are not affected. As a consequence, we suggest that the observed hyper-osmoregulatory capacity impairment is the result of increased dissipative flow of ions and/or water through anterior gills. On the other hand, a chronic exposure does not disturb osmoregulation. Nevertheless, crabs submitted to an acute exposure directly after a chronic exposure are more resistant to Cd. For these acclimated crabs, hepatopancreas can accumulate more Cd due to higher level of metallothioneins. In contrast, these proteins can not explain the observed higher tolerance to Cd in anterior gills. Proteomic analysis was used to point out other resistance mechanisms in this latter organ. Results show over-expression of antioxidant enzymes and molecular chaperones, suggesting that Cd induces reactive oxygen species and interacts with sulfur groups of proteins. Moreover, 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. The present study demonstrates that an integrative approach using physiological, morphological, biochemical and proteomic analyses, is worthwhile to characterize the stress response in an aquatic organism exposed to a pollutant. Even if chronic exposure does not show any physiological effect, it can induce modifications of the proteome.

Ph. D. thesis in Biology
March 2005
URBO- Research Unit in Organism Biology
Advisor : Prof. P. Devos

Liste des abréviations

2-DE – gel d'électrophorèse en deux dimensions
AC -anhydrase carbonique
ADN – acide désoxyribonucléique
Ag - argent
Al – aluminium
ARE - *antioxidant responsive element*
ARN – acide ribonucléique
ARNm – ARN messenger
ATF4 - *activating transcription factor 4*
ATF6 - *activating transcription factor 6*
ATP - adénosine triphosphate
AWP – perméabilité apparente à l'eau
Ca – calcium
CBP – potentiel de séquestration du Cd
CCBP-23 - *crustacean calcium-binding protein 23*
Cd - cadmium
CHAPS - 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHH – hormone hyperglycémiant de crustacé
CHPRA - hydrochlorure de chlorpromazine (2-chloro-10-[3-diméthylaminopropyl]phenothiazine)
CI50 – concentration d'inhibition 50%
Cl - chlore
CL50 – concentration létale 50%
Co - cobalt
Cu – cuivre
Cys – cystéine
DMSO - diméthylsulfoxyde
Ddp – différence de potentiel
DTT – dithiothreitol
ED – eau douce (*FW*)
eIF2 α – *eukaryotic initiation factor-2 α*
ERAD - *endoplasmic reticulum-associated degradation*
ES – eau salée (*SW*)
ESI – *electrospray ionization*
E.T. – écart-type

FW – *freshwater* (ED)
GAPDH - glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GSH – glutathion
GST - glutathion S-transférase
HAPs - hydrocarbures aromatiques polycycliques
Hg - mercure
HSE – *heat shock element*
HSF – *heat shock factor*
HSP – protéine de stress (*Heat Shock Protein*)
ICAT - *isotope-coded affinity tags*
IEF – focalisation isoélectrique (*isoelectric focusing*)
IF – facteur d'induction
IRE1 - *Inositol-Requiring Enzyme 1*
K – potassium
La – lanthane
LC – chromatographie liquide
MALDI – *matrix assisted desorption ionization*
MS – spectrométrie de masse
MS/MS – spectrométrie de masse en tandem
MTLPs – *metallothionein-like proteins*
MTs – métallothionéines
MW – poids moléculaire
N° 7943 - (2-[2-[4-(4-nitrobenzyloxy)phenyl]ethyl]isothiouréa methanesulphonate)
Na - sodium
NADPH - nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Ni – nickel
NKA - Na^+/K^+ -ATPase
NV – volume normalisé
Pb - plomb
PCB – polychloro-biphényles
PDI - protéine disulfure isomérase
PERK - *double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase*
p.f. – poids frais (w.w.)
pI – point isoélectrique
Q-TOF – *quadrupole-time of flight*
RCS – réponse cellulaire au stress
RE – réticulum endoplasmique
RF – facteur de répression

ROS – espèce réactive de l’oxygène
SB 3-10 - *N*-decyl-*N,N*-diméthyl-3-ammonio-1-propane sulfonate
S.D. – *standard deviation* (écart-type)
SDS - sodium dodécyl sulfate
Se - sélénium
SEP – signature d’expression protéique
SW – *saltwater* (ES)
TL50 – temps léthal 50%
TPx - thiorédoxine peroxidase
Tris - Tris-(hydroxyméthylamino-méthane)
UPR – *unfolded protein response*
Zn – zinc

Abréviations des acides aminés

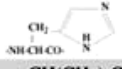
symbol	composition	structure	monoisotopic	average
Ala A	Alanine C_3H_5NO	$\begin{array}{c} CH_3 \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	71.03711	71.0788
Arg R	Arginine $C_6H_{12}N_4O$	$\begin{array}{c} CH_2-(CH_2)_2-NH-C(=NH)-NH_2 \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	156.10111	156.1876
Asn N	Asparagine $C_4H_6N_2O_2$	$\begin{array}{c} CH_2-CONH_2 \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	114.04293	114.1039
Asp D	Aspartic Acid $C_4H_5NO_3$	$\begin{array}{c} CH_2-COOH \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	115.02694	115.0886
Cys C	Cysteine C_3H_5NOS	$\begin{array}{c} CH_2-SH \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	103.00919	103.1448
Gln Q	Glutamine $C_5H_8N_2O_2$	$\begin{array}{c} CH_2-CH_2-CONH_2 \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	128.05858	128.1308
Glu E	Glutamic Acid $C_5H_7NO_3$	$\begin{array}{c} CH_2-CH_2-COOH \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	129.04259	129.1155
Gly G	Glycine C_2H_3NO	$-NH-CH_2-CO-$	57.02146	57.0520
His H	Histidine $C_6H_7N_3O$	$\begin{array}{c} CH_2 \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$ 	137.05891	137.1412
Ile I	Isoleucine $C_6H_{11}NO$	$\begin{array}{c} CH(CH_3)-CH_2-CH_3 \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	113.08406	113.1595
Leu L	Leucine $C_6H_{11}NO$	$\begin{array}{c} CH_2-CH(CH_3)_2 \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	113.08406	113.1595
Lys K	Lysine $C_6H_{12}N_2O$	$\begin{array}{c} CH_2-(CH_2)_3-NH_2 \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	128.09496	128.1742
Met M	Methionine C_5H_9NOS	$\begin{array}{c} CH_2-CH_2-S-CH_3 \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	131.04049	131.1986
Phe F	Phenylalanine C_9H_9NO	$\begin{array}{c} CH_2-Ph \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	147.06841	147.1766
Pro P	Proline C_5H_7NO		97.05276	97.1167
Ser S	Serine $C_3H_5NO_2$	$\begin{array}{c} CH_2-OH \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	87.03203	87.0782
Thr T	Threonine $C_4H_7NO_2$	$\begin{array}{c} CH(OH)-CH_3 \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	101.04768	101.1051
Trp W	Tryptophan $C_{11}H_{10}N_2O$	$\begin{array}{c} CH_2 \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$ 	186.07931	186.2133
Tyr Y	Tyrosine $C_9H_9NO_2$	$\begin{array}{c} CH_2 \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$ 	163.06333	163.1760
Val V	Valine C_5H_9NO	$\begin{array}{c} CH(CH_3)_2 \\ \\ -NH-CH-CO- \end{array}$	99.06841	99.1326

Table des matières

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1. LE CHANGEMENT GLOBAL	2
1.2. LE STRESS : DÉFINITIONS ET NOTIONS APPARENTÉES	4
1.2.1. <i>Acclimatation et adaptation</i>	7
1.2.2. <i>Différents niveaux de réponse au stress : réponses physiologiques et cellulaires</i>	8
1.2.3. <i>Les protéines de stress</i>	10
1.3. ACCLIMATATION ET ADAPTATION SUITE À UN STRESS PROVOQUÉ PAR UN XÉNOBIOTIQUE	15
1.3.1. <i>Acclimatation induite en laboratoire</i>	15
1.3.2. <i>Acclimatation et adaptation observées sur des populations naturelles</i>	19
1.3.3. <i>Mécanismes conférant une résistance accrue à des xénobiotiques</i>	21
1.3.4. <i>Coût d'une résistance à des xénobiotiques</i>	24
1.4. LES MÉTALLOTHIONÉINES.....	26
1.5. LE CADMIUM	31
1.5.1. <i>Effets du cadmium sur l'osmorégulation des organismes aquatiques</i>	35
1.6. LE MODÈLE BIOLOGIQUE : LE CRABE CHINOIS <i>ERIOCHEIR SINENSIS</i> ...38	
1.6.1. <i>Caractéristiques générales</i>	38
1.6.2. <i>Le crabe chinois comme modèle pour étudier l'osmorégulation</i>	41
1.6.3. <i>Le crabe chinois comme modèle pour comprendre les effets de xénobiotiques sur l'osmorégulation</i>	50
1.7. LA PROTÉOMIQUE POUR ÉTUDIER LA RÉPONSE CELLULAIRE AU STRESS PROVOQUÉ PAR UN XÉNOBIOTIQUE	52
1.7.1. <i>La protéomique</i>	56
1.7.2. <i>Méthodologie utilisée dans ce travail pour l'analyse protéomique : les gels 2D couplés à la spectrométrie de masse</i>	61
1.7.3. <i>L'analyse protéomique en écotoxicologie aquatique</i>	66
2. OBJECTIFS DU TRAVAIL	71
3. PASSAGE DU CD À TRAVERS LES BRANCHIES.....	77
3.1. RÉSUMÉ.....	78

3.2. PUBLICATION 1 : UPTAKE OF CADMIUM THROUGH ISOLATED PERFUSED GILLS OF THE CHINESE MITTEN CRAB, <i>ERIOCHEIR SINENSIS</i> .	80
3.3. NOTES COMPLÉMENTAIRES.	91
3.3.1. <i>Influence de la ddp sur le flux entrant de Cd</i> .	91
3.3.2. <i>Effets de certains inhibiteurs sur le flux entrant de Cd</i>	93
4. EFFETS DU CD SUR L'OSMORÉGULATION. ACCLIMATATION PENDANT UNE EXPOSITION CHRONIQUE.	95
4.1. RÉSUMÉ	96
4.2. PUBLICATION 2 : HYPER-OSMOREGULATORY CAPACITY OF THE CHINESE MITTEN CRAB (<i>ERIOCHEIR SINENSIS</i>) EXPOSED TO CADMIUM. ACCLIMATION DURING CHRONIC EXPOSURE.	99
4.3. NOTES COMPLÉMENTAIRES.	117
4.3.1. <i>Effets du Cd sur des crabes chinois acclimatés à de l'eau salée</i> .	117
4.3.2. <i>Autres résultats</i>	120
5. ACCUMULATION DU CD DANS LES TISSUS. RÔLE JOUÉ PAR LES MÉTALLOTHIONÉINES DANS L'ACCLIMATATION...	125
5.1. RÉSUMÉ	126
5.2. PUBLICATION 3 : TISSUE-SPECIFIC CADMIUM ACCUMULATION AND METALLOTHIONEIN-LIKE PROTEIN LEVELS DURING ACCLIMATION PROCESS IN THE CHINESE CRAB <i>ERIOCHEIR SINENSIS</i> .	128
5.3. NOTES COMPLÉMENTAIRES.	142
5.3.1. <i>CBP et relation entre la concentration en Cd et la teneur en MTLs dans les branchies postérieures</i>	142
5.3.2. <i>Pourcentage d'accumulation du Cd dans les différents organes et tissus</i>	143
6. NIVEAU D'EXPRESSION DE LA HSP70 DANS LES BRANCHIES	147
6.1. RÉSUMÉ	148
6.2. PUBLICATION 4: ARE HSP70 INVOLVED IN INCREASED RESISTANCE TO CADMIUM IN THE CHINESE MITTEN CRAB, <i>ERIOCHEIR SINENSIS</i> ?	150

7. MISE EN ÉVIDENCE DES PROFILS D'EXPRESSION DE PROTÉINES DANS LES BRANCHIES	157
7.1. RÉSUMÉ.....	158
7.2. PUBLICATION 5 : DIFFERENTIAL PROTEIN EXPRESSION PROFILES IN ANTERIOR GILLS OF <i>ERIOCHEIR SINENSIS</i> INDUCED BY CADMIUM EXPOSURE. NEW FINDINGS ON ACCLIMATION MECHANISMS.	160
7.3. NOTES COMPLÉMENTAIRES.....	182
8. DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS.....	185
8.1. RÉPONSES À UN STRESS ENVIRONNEMENTAL INDUIT PAR LE Cd CHEZ LE CRABE EURYHALIN <i>ERIOCHEIR SINENSIS</i>	186
8.2. CONCLUSIONS SUR L'UTILISATION DE L'ANALYSE PROTÉOMIQUE EN ÉCOTOXICOLOGIE	215
8.3. CONCLUSION GÉNÉRALE.....	224
9. BIBLIOGRAPHIE	227
10. ANNEXES.....	265
10.1. PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EAU D'OÙ PROVIENNENT LES CRABES CHINOIS	266
10.2. LA TECHNIQUE DE PERFUSION DE BRANCHIES.....	267
10.3. EXEMPLE DE SLOT BLOT	269
10.4. SUPPLÉMENTS À L'ANALYSE PROTÉOMIQUE	270
10.4.1. Gel à large gamme de pH.....	270
10.4.2. Volumes normalisés moyens.....	271
10.4.3. Gels utilisés dans ce travail.....	271